

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ACETOGENINAS ISOLADAS DE SEMENTES DE *ANNONA CORIACEA* DO CERRADO
MATO-GROSSENSE E SUA ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes Aegypti*
(LINNAEUS)**

THAYANA DA CONCEIÇÃO ALVES

CUIABÁ
MATO GROSSO – BRASIL

2012

THAYANA DA CONCEIÇÃO ALVES

**ACETOGENINAS ISOLADAS DE SEMENTES DE *ANNONA CORIACEA* DO CERRADO
MATO-GROSSENSE E SUA ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes Aegypti*
(LINNAEUS)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de Mestre em Química, Área de concentração em Química Orgânica de Produtos Naturais.

CUIABÁ

MATO GROSSO – BRASIL

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

C744a Conceição Alves, Thayana da.
Acetogeninas isoladas de sementes de *Annona coriacea* do cerrado mato-grossense e sua atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* (LINNAEUS) / Thayana da Conceição Alves. - 2012
xix, 142 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Evandro Luiz Dall'Oglio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Programa de Pós-Graduação em Química, Cuiabá, 2012.
Inclui bibliografia.

1. atividade larvicida. 2. acetogeninas. 3. *Annona coriacea*. 4. bullacina. 5. coriapentocina A. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

THAYANA DA CONCEIÇÃO ALVES

**ACETOGENINAS ISOLADAS DE SEMENTES DE *ANNONA CORIACEA* DO CERRADO
MATO-GROSSENSE E SUA ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *AEDES AEGYPTI*
(LINNAEUS)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Química, para obtenção do título de Mestre em Química, Área de concentração em Química Orgânica de Produtos Naturais.

APROVADA: 01 de novembro de 2012

Prof. Dr. Evandro Luiz Dall'Oglio

(Orientador)

Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho

(membro externo – UFRRJ)

Prof^a Dr^a. Virginia Claudia da Silva

(Membro interno – UFMT)

“Tenho sede da tua graça cada dia mais,
Sou mais forte e vou mais longe quando aqui estás,
com palavras de amor, Te Adoro Senhor.
Meu tesouro, minha herança, meu Supremo Bem,
Nem tribulações, nem dor podem nos separar,
e jamais irão romper o que o amor selou.”

Ministério Adoração e Vida

Dedico integralmente esse trabalho à minha tão amada família, minha mãe Joenice, meu pai Jorge e minha irmã Nathalia, que sempre me incentivaram em minha formação profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao meu bom Deus e Senhor, pela vida, saúde, força e determinação para chegar à conclusão deste trabalho e lutar a cada dia pelos meus sonhos.
- ❖ Ao professor Dr. Evandro Luiz Dall'Oglio, pela orientação, ensinamentos, compreensão e ajuda nos momentos de dificuldade no decorrer da realização deste trabalho.
- ❖ À professora Dr^a Virginia Claudia da Silva, pelos ensinamentos, pelas orientações na elucidação estrutural assim como na correção da dissertação e pela imensa ajuda a mim dada sempre que eu necessitava, muito obrigada.
- ❖ Ao professor Dr. Paulo Teixeira de Sousa Junior, pelos ensinamentos e orientações.
- ❖ Ao professor emérito Dr. Raimundo Braz-Filho e ao professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho, pelos ensinamentos, pela imensa colaboração na elucidação das acetogeninas, pela obtenção dos espectros de ressonância e pela valiosa acolhida no Laboratório de Produtos Naturais da UFRRJ, foi um enorme prazer conhecê-los.
- ❖ Ao professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela essencial ajuda nos massas para a elucidação estruturas das acetogeninas, pela participação na banca de defesa, pelas correções do artigo e dissertação e pela ajuda na obtenção dos espectros de massa de alta resolução.
- ❖ Aos técnicos do ressonância, Vitor e Maurício do laboratório de Produtos Naturais do UFRRJ, pela atenção e simpatia ao realizar meus experimentos.
- ❖ Ao professor Dr. Norberto Peporine Lopes do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da USP-Ribeirão Preto pelos espectros de massas alta resolução.
- ❖ Ao técnico especialista José Carlos Tomaz do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da USP-Ribeirão Preto, pela simpatia e pela disposição no fornecimento dos espectros de massas.
- ❖ À professora Mônica Josene Barbosa e aluna de doutorado Marilza Costa (UNEMAT – Tangará da Serra) pelas sementes das espécies e pela realização dos testes de atividade larvicida.
- ❖ À professora Dr^a Tereza Ribeiro, pela companhia, atenção e por ter me recebido gentilmente em sua casa durante a minha ida à UFRRJ, sou imensamente grata.

- ❖ Ao professor Dr. Uir Santana (Departamento de Química–UFMT) pelos ensinamentos e ajuda no entendimento das fragmentações de massas das substâncias.
- ❖ Ao professor Adilson Paulo Senhorin (UFMT-Sinop) pela participação na banca de qualificação e correções/sugestões na dissertação.
- ❖ As alunas de iniciação científica Mariele Rondon e Francyne Correia, pela imensa ajuda em todas as etapas desse trabalho, tanto experimentalmente como pessoalmente através da amizade, companheirismo e incentivo nos momentos de dificuldade. Serei eternamente grata a vocês.
- ❖ A todos os amigos e colegas do LPQPN, pela alegria, companhia e carinho, em especial às amigas, Claudia, Lais, Pâmela e Juliany pelas conversas e incentivos.
- ❖ A todos os amigos e colegas da Central Analítica, pela companhia, carinho, atenção, conversas, em especial Carlos Parizotto, Leonardo, Eduardo e Alan que sempre me ajudaram em diversos momentos do meu trabalho.
- ❖ A todos os colegas do mestrado em Química, em especial os amigos que fiz no decorrer do curso, Márcia, Grasielli, Ariane, Milene, Leticia, Willian e Dr^a Sally.
- ❖ A todos os colegas e professores da UFMT que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.
- ❖ A CAPES pela bolsa concedida e a PROPG pelo auxílio-viagem.
- ❖ À minha avó Tita, pelo incentivo, carinho, orações, amor e por sempre me receber de braços abertos nos momentos de dificuldade.
- ❖ Aos meus pais e meus irmãos pelo carinho, amor, atenção, dedicação, força e incentivo na realização desta pós-graduação e em todos os momentos de minha vida.
- ❖ A todos os meus tios, primos e Luis Felipe que sempre me apoiaram e me incentivaram nessa etapa de minha vida.
- ❖ Às minhas amigas Mayra, Dayana, Maury, Milca, Larissa e Cris pelo apoio e força.
- ❖ Ao meu namorado Leonardo pelo amor, cuidado, carinho e compreensão nos meus momentos de ausência e stress.
- ❖ À família do meu namorado, em especial Neli Rita, Liéggi, Leandro e Marica, pelas orações, incentivo e carinho.

ALVES, Thayana da Conceição. **Acetogeninas isoladas de sementes de *Annona coriacea* do cerrado mato-grossense e sua atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Mato Grosso *campus* Cuiabá. Orientador: Prof^o Dr. Evandro Luiz Dall'Oglio. e-mail: thayanaalves@hotmail.com

RESUMO

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, com índices de casos crescentes a cada ano nos estados brasileiros, especialmente na região Centro-Oeste. Estudos na busca de novas substâncias de origem vegetal com atividade inseticida têm sido amplamente realizados nos últimos anos, assim como o uso de extratos vegetais como um método alternativo no controle do mosquito vetor, *Aedes aegypti*. A família Annonaceae tem destaque no Cerrado brasileiro por possuir uma classe de substâncias que apresentam diversas atividades biológicas como citotóxica, fungicida, dentre outras; algumas espécies desta família apresentaram atividade inseticida sobre larvas e adultos de *A. aegypti*. Esse trabalho envolveu o estudo fitoquímico biomonitorado de sementes de *Annona coriacea* do Cerrado mato-grossense através de ensaios de atividade larvicida frente à *A. aegypti*. Os testes biológicos de extratos e frações mostraram que a espécie é promissora como fonte de compostos inseticidas, além de diversas amostras terem apresentado elevado potencial larvicida com resultados superiores aos de outras espécies do gênero *Annona*. Os resultados da atividade larvicida dos extratos e frações mostraram um aumento direto no potencial biológico com a purificação cromatográfica das amostras. O estudo químico dos extratos ativos hexânico e metanólico de *A. coriacea* permitiu o isolamento/elucidação de três substâncias, sendo duas inéditas: as acetogeninas mono-THF α,α -diidroxiladas denominadas coriapentocina A e B; e uma acetogenina bis-THF α,α -diidroxiladas já descrita na literatura denominada bullacina. Dentre essas, a bullacina mostrou possuir alto potencial larvicida frente *A. aegypti* (100% mortalidade) sendo pela primeira vez relatada tal atividade biológica. Já coriapentocina A apresentou atividade larvicida significativa (75% mortalidade). As atividades encontradas para bullacina e coriapentocina A corroboram com a atividade biológica descrita para acetogeninas e são associadas com a presença de grupo bis-THF e mono-THF nas estruturas.

Palavras-chave: Atividade larvicida, acetogeninas, *Annona coriacea*, bullacina, coriapentocina A, coriapentocina B.

ALVES, Thayana da Conceição. **Acetogenins isolated from *Annona coriacea* seeds cerrado of Mato Grosso and its larvicidal activity on *Aedes aegypti* (Linnaeus)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Mato Grosso *campus* Cuiabá. Adviser: Prof^o Dr. Evandro Luiz Dall'Oglio. e-mail: thayanaalves@hotmail.com

ABSTRACT

Dengue is a major public health problem worldwide, with increasing rates of cases each year in the Brazilian states, especially in the Midwest. Studies in search of new substances from plant with insecticidal activity have been extensively realized in recent years, such as the use of plant extracts as an alternative method to control the mosquito vector, *Aedes aegypti*. The Annonaceae family has featured the Brazilian Cerrado for possessing a class of substances that exhibit various biological activities such as cytotoxic, fungicidal among others and some species of this family showed insecticidal activity against larvae and adults of *A. aegypti*. This work describe the biomonitoring study of phytochemical seeds of *Annona coriacea* from the Cerrado of Mato Grosso through testing larvicidal activity against the *A. aegypti*. The biological testing of extracts and fractions showed that the species is as promising source of compounds insecticides, because several samples have shown high larvicide potential with superior results to those of other species of the *Annona* genus. The results of the larvicidal activity of extracts and fractions showed a direct increase in the biological potential with chromatographic purification of the samples. The chemical study of *A. coriacea* hexane and methanol active extracts allowed to the isolation/elucidation of three substances, including two novel: the mono-THF acetogenins α,α -dihydroxylated, named coriapentocina A and B, and a bis-THF α,α -dihydroxylated acetogenin already described in literature and known as bullacina. Among these, the bullacina acetogenin showed high larvicide potential against *A. aegypti* (100% mortality) a biological activity reported for the first time for this acetogenin. Already coriapentocina A showed significant larvicidal activity (75% mortality). The activities found for bullacina and coriapentocina A corroborate to the biological activity described for acetogenins which are associated with the presence of bis-THF and mono-THF group.

Keywords: Larvicidal activity, acetogenins, *Annona coriacea*, bullacina, coriapentocina A, coriapentocina B.

INDICE DE ESQUEMA

	Página
Esquema 1 - Obtenção dos extratos de <i>A. coriacea</i> - coleta 1.....	49
Esquema 2 - Obtenção dos extratos de <i>A. coriacea</i> - coleta 2.....	50
Esquema 3 - Purificação da fração metanólica (FMEHCo) do extrato hexânico de <i>A. coriacea</i> – Grupo M-2.....	52
Esquema 4 - Purificação da fração metanólica (FMEHCo) do extrato hexânico de <i>A. coriacea</i> – Grupo M-3.....	53
Esquema 5 – Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de <i>A. coriacea</i> – Grupo B.....	54
Esquema 6 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de <i>A. coriacea</i> – Grupo C.....	55
Esquema 7 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de <i>A. coriacea</i> – Grupo D.....	55
Esquema 8 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de <i>A. coriacea</i> – Grupo E.....	56
Esquema 9 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de <i>A. coriacea</i> – Grupo F.....	56
Esquema 10 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de <i>A. coriacea</i> – Grupo G.....	57
Esquema 11 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de <i>A. coriacea</i> – Grupo H.....	57
Esquema 12 – Correlações verificadas no mapa de contornos COSY (A) e HMBC (B) para substância ACG1.....	72
Esquema 13 - Correlações $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ verificados no HMBC de ACG1.....	73
Esquema 14 – Proposta de configuração relativa do sistema bis-THF de ACG1 com base em dados experimentais.....	74
Esquema 15 - Correlações verificadas no mapa de contornos COSY de ACG1.....	74
Esquema 16 – Propostas de fragmentações de perdas de H ₂ O para justificar alguns picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de ACG1. Espectros em Figuras 26-29.....	88
Esquema 17 – Propostas de fragmentações para justificar os valores de picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de ACG1. Espectros em Figura 26-27.....	89
Esquema 18 - Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de ACG1. Espectros em Figura 26-29.....	90

Esquema 19 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI). Espectros em Figura 26 e 27	91
Esquema 20 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de ACG1. Espectros em Figura 26-29.....	92
Esquema 21 – Correlações verificadas no mapa de contornos g COSY (A) e HMBC (B) de M3-22.	94
Esquema 22 – Correlações $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ verificadas no HMBC da amostra M3-22.....	95
Esquema 23 – Proposta de configuração relativa do sistema mono-THF para as amostras M3-22 e F2-C com base em dados experimentais	95
Esquema 24 – Correlações verificadas para as posições 1,3-diol no mapa de contornos COSY (A) e HMBC (B) para as substâncias ACG2 e ACG3	97
Esquema 25 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de ACG2. Espectros Figura 46-47.....	99
Esquema 26 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de ACG3. Espectros Figura 46-49.....	100
Esquema 27 – Propostas de fragmentações de perdas de H ₂ O para justificar alguns picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de ACG2. Espectros em Figuras 46-49...	110
Esquema 28 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de ACG2. Espectros em Figuras 46-49.....	111
Esquema 29 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de ACG2. Espectros em Figura 46-47.....	112

ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Quadro 1 – Acetogeninas isoladas de <i>A. coriacea</i>	31
Quadro 2 - Atividades biológicas de extratos de <i>Annona coriacea</i>	32
Quadro 3 – Classificação das acetogeninas em relação ao anel THF.	35
Quadro 4 - Classificação das acetogeninas em relação ao anel γ -lactônico.....	36
Quadro 5 – Testes utilizados para obtenção de perfil cromatográfico por CLAE.	44
Quadro 6 – Prospecção fitoquímica de extratos de <i>A. coriacea</i>	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Ocorrência e distribuição da dengue no mundo - 2010.....	23
Figura 2 - Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	24
Figura 3 - Exemplos de piretroides (A), rotenoides (B) e rianoides (C)	27
Figura 4 – Distribuição geográfica do gênero <i>Annona</i> pelo mundo	29
Figura 5– Árvore e fruto de <i>Annona coriacea</i>	30
Figura 6 – Estrutura da acetogenina uvaricina	33
Figura 7 - Hipótese para a biossíntese de anéis tetraidrofurânicos em acetogeninas de Annonaceae.	34
Figura 8 – Perfil cromatográfico do extrato hexânico de <i>A. coriacea</i> (EHex-c1) em modo isocrático com ACN:DCM (7:3) + 0,1% TFA com fluxo de 1,0 mL/min em CLAE-ELSD...63	
Figura 9- Perfil cromatográfico do extrato hexânico de <i>A. coriacea</i> (EHex-c1) com valores de <i>m/z</i> em modo isocrático com ACN:DCM (7:3) + 0,1% TFA, fluxo de 0,5 mL/min em CLAE-EM e faixa de <i>m/z</i> 50-2000.	64
Figura 10 – Perfil cromatográfico de EHex-c1 obtido em coluna analítica C18 Varian (A) e C18 Gemini (B) com sistema isocrático ACN:DCM (7:3) + 0,1% TFA, f= 0,5 mL/min e faixa de <i>m/z</i> 50-2000.....	65
Figura 11 – Cromatograma de M1-30A obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução com modo de ionização positivo.	67
Figura 12 – Cromatograma de M1-30A obtido em CLAE-EM-ESI alta resolução com modo de ionização positivo.	67
Figura 13 – Cromatograma de M3-22 obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução com modo de ionização positivo.	68
Figura 14 – Cromatograma de M3-22 obtido em CLAE-EM-ESI alta resolução.....	68
Figura 15 – Cromatograma de F2-C em CLAE-EM-ESI baixa resolução com modo de ionização positivo	69
Figura 16 – Espectro na região do infravermelho (IV) de ACG1 em pastilha KBr.	71
Figura 17 – Proposta estrutura parcial para ACG1.....	75
Figura 18 – Proposta estrutural para ACG1 com fragmentações verificadas no espectro de massas (ESI-MS)	75
Figura 19 – Estrutura de ACG1 - Bullacina.....	76
Figura 20 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) de ACG1, obtido em CD ₃ OD. *impurezas...78	
Figura 21 – Espectro de RMN ¹³ C-DEPT-Q (125MHz) de ACG1 em CD ₃ OD.	78

Figura 22 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de ACG1 em CD_3OD	79
Figura 23 - Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMQC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de ACG1 em CD_3OD	79
Figura 24 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMBC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de ACG1 em CD_3OD	80
Figura 25 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) ^1H - ^1H -COSY (500MHz) de ACG1 em CD_3OD	81
Figura 26 – Espectro de massas de baixa resolução da ACG1 obtido através de ionização por eletrospray (EM-ESI)	81
Figura 27 – Espectros/ampliação de massas de ACG1 obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução em modo positivo.	82
Figura 28 – Espectro de massas alta resolução de ACG1 obtido através de ionização por eletrospray (EM-ESI) em modo positivo	83
Figura 29 – Espectros/ampliação de massas de ACG1 obtido em CLAE-EM-ESI alta resolução em modo positivo	84
Figura 30 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de ACG1a obtido em CDCl_3	85
Figura 31 – Ampliação do espectro de RMN ^1H de ACG1a obtido em CDCl_3	85
Figura 32 – Espectro DEPT-Q- ^{13}C (125 MHz) de ACG1a obtido em CDCl_3	86
Figura 33 – Ampliação do espectro DEPT-Q- ^{13}C de ACG1a obtido em CDCl_3	86
Figura 34 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMBC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de ACG1a em CDCl_3	87
Figura 35 – Espectro na região do infravermelho (IV) de M3-22 (A) e F2-C (B) em pastilha de KBr.	93
Figura 36 – Proposta estrutura parcial para ACG2 e ACG3	96
Figura 37 – Propostas estruturais da porção alifática α -lactona das posições dos grupamento hidroxí para as ACG2 e ACG3	98
Figura 38 – Estrutura de ACG2	99
Figura 39 – Estrutura de ACG3	101
Figura 40 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de ACG2 obtido em CD_3OD	103
Figura 41 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de ACG2 em CD_3OD	103
Figura 42 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de ACG2 em CD_3OD	104
Figura 43 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMQC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de ACG2 em CD_3OD	104

Figura 44 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMBC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de ACG2 em CD_3OD	105
Figura 45 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) COSY (^1H :500 MHz) de ACG2 em CD_3OD	105
Figura 46 – Espectro de massas de baixa resolução de ACG2 obtido através de ionização por eletrospray (EM-ESI).....	106
Figura 47 – Espectros/ampliação de massas de ACG2 obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução em modo positivo.....	106
Figura 48 – Espectro de massas de alta resolução de ACG2 obtido através de ionização por eletrospray (EM-ESI).....	107
Figura 49 –Espectros/ampliação de massas de ACG2 obtido em CLAE-EM-ESI alta resolução em modo positivo.....	107
Figura 50– Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de ACG2a obtido em CDCl_3	108
Figura 51 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de ACG2a obtido em CDCl_3	108
Figura 52 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de ACG2a em CDCl_3	109
Figura 53 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de ACG2a em CDCl_3	109
Figura 54 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de ACG3 obtido em CD_3OD	114
Figura 55 – Espectro de RMN ^{13}C DEPT-Q (125MHz) de ACG3 em CD_3OD	114
Figura 56 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C DEPT-Q (125MHz) de ACG3 em CD_3OD	115
Figura 57 - Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMQC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de ACG3 em CDCl_3	115
Figura 58 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMBC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de ACG3 em CDCl_3	116
Figura 59 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) ^1H - ^1H -COSY (500MHz) de ACG3 em CDCl_3	116
Figura 60 - Espectro de massas de baixa resolução da amostra ACG3, obtido através de ionização por eletrospray.....	117
Figura 61 – Espectros/ampliação de massas de ACG3 obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução em modo positivo.....	117
Figura 62 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de ACG3a obtido em CDCl_3	118
Figura 63 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de ACG3a obtido em CDCl_3	118
Figura 64 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de ACG3a em CDCl_3	119

Figura 65 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de ACG3a em CDCl_3
..... 119

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Atividade larvívica de extratos e frações de <i>A. coriacea</i> frente à <i>Aedes aegypti</i>	59
Tabela 2 - Atividade larvívica de frações e amostras purificadas de <i>A. coriacea</i> frente à <i>Aedes aegypti</i>	59
Tabela 3 – Dados de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de modelos usados para comparação na determinação estrutural e configuração relativa das unidades tetraidrofurânicas.....	73
Tabela 4 - Dados de RMN ¹ H (500MHz) e ¹³ C (125MHz) da fração M1-30A contendo ACG1, incluindo-se resultados obtidos através de espectros 2D HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos em δ (ppm) e valores de constantes de acoplamentos (J) em .	77
Tabela 5 – Dados de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) de modelos usados para comparação na determinação estrutural e configuração relativa (MCLAUGHLIN et al., 1999; BERMEJO et al., 2005). Deslocamentos químicos em δ (ppm).	95
Tabela 6 - Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) das substituições hidroxiladas na cadeia alifática (McLAUGHLIN et al., 1995b;c) em comparação com as substância ACG2 e ACG3.....	97
Tabela 7 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da amostra M3-22 (ACG2), incluindo-se resultados obtidos através de espectros 2D HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos em δ (ppm) e valores de constantes de acoplamentos (J) em Hz*.....	102
Tabela 8 – Dados de RMN ¹ H (500MHz) e ¹³ C (125MHz) da amostra F2-C contendo ACG3, incluindo-se resultados obtidos através de espectros 2D HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos em δ (ppm) e valores de constantes de acoplamentos (J) em Hz*.....	113

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico em partes por milhão
J	Constante de acoplamento em Hz
m/z	Relação massa/carga
ACGs	Acetogeninas
ACN	Acetonitrila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
EI-EM	Espectrometria de massas por impacto eletrônico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DL ₅₀	Dose letal a 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELSD	Detector por Espalhamento de Luz
ESI-EM	Espectrometria de massas por ionização electrospray
FAB-EM	Espectrometria de massas por bombardeamento por átomos rápidos
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
FT-IR	Infra-Vermelho com transformada de Fourier
HMBC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
LPQPN	Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais
MS/SVS	Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde
MS/MS	Espectrometria de massas
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TMS	Tetrametilsilano
THF	Tetrahydrofurano
THP	Tetrahidropirano
TFA	Ácido trifluoroacético

OBS.: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. Dengue	23
2.1.1. Mosquito transmissor <i>Aedes aegypti</i>	23
2.1.2. Prevenção e combate ao <i>Aedes aegypti</i>	24
2.2. Inseticidas sintéticos	25
2.2.1. Consequências no uso de inseticidas sintéticos.....	25
2.3. Inseticidas de origem vegetal.....	26
2.3.1. Inseticida vegetal contra <i>Aedes aegypti</i>	27
2.4. Aspectos Químicos e Farmacológicos	28
2.4.1. Generalidades sobre a família Annonaceae e gênero <i>Annona</i>	28
2.4.2. A espécie <i>Annona coriacea</i> Mart	30
2.4.2.1. Fitoquímica de <i>Annona coriacea</i>	30
2.4.2.2. Estudo biológico de extratos de <i>Annona coriacea</i>	32
2.5. Acetogeninas de Annonaceae	33
2.5.1. Classificação estrutural das ACGs.....	35
2.5.2. Elucidação estrutural e padrão de fragmentação de ACGs	36
2.5.3. Atividade biológica e Mecanismo de ação	37
2.5.4. Propriedades inseticidas	37
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivos gerais	39
3.2. Objetivos específicos.....	39
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	40
4.1. Equipamentos e reagentes	40
a) Solventes.....	40
b) Material Cromatográfico	40
c) Reveladores.....	40
d) Equipamentos.....	40
4.2. Reação de acetilação com anidrido acético.....	41
4.3. Teste biológico e prospecção fitoquímica	41
a) Atividade inseticida frente à larvas de <i>Aedes aegypti</i>	41

b) Prospecção fitoquímica	42
4.4. Perfil Cromatográfico via CLAE	42
a) Solventes e amostras	42
b) Material cromatográfico	42
c) Equipamentos	43
4.4.1. Perfil cromatográfico dos extratos hexânicos	44
4.5. Material Botânico	48
4.6. Secagem e pulverização das sementes.....	48
4.7. Obtenção, partição e fracionamento dos extratos de sementes de <i>A. coriacea</i> ..	48
4.7.1. Coleta 1 – sementes <i>A. coriacea</i> MS.....	48
4.7.2. Coleta 2 – sementes <i>A. coriacea</i> MT	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1. Prospecção fitoquímica.....	58
5.2. Atividade inseticida frente às larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	58
5.3. Perfil cromatográfico via CLAE	62
5.4. Análise química e perfil cromatográfico das frações	66
5.4.1. Extrato hexânico (EHex-c2) de <i>A. coriacea</i>	66
a) Grupo M-2.....	66
b) Grupo M-3.....	67
5.4.2. Extrato metanólico (EMet-c2) de <i>A. coriacea</i>	68
a) Grupo B	68
b) Grupo C	69
c) Grupo D	69
d) Grupo E	69
e) Grupo F.....	69
f) Grupo H	70
5.5. Elucidação estrutural de acetogeninas de <i>A. coriacea</i>	70
5.5.1. Substância ACG1 (amostra M1-30A).....	70
5.5.2. Substâncias ACG2 e ACG3 (amostras M3-22 e F2-C).....	92
6. CONCLUSÕES	120
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

ANEXOS 136

1. INTRODUÇÃO

O cerrado é um dos 25 sítios de maior biodiversidade do mundo e por esse motivo, possui o reconhecimento de bioma mundialmente mais rico (MYERS et al., 2000). É o segundo maior bioma no Brasil em área, ocupando 21% do território nacional, localizado principalmente na região central do país (KLINK & MACHADO, 2005; RATTER et al., 2006). No entanto, cerca de 67% da cobertura original tem sido retirada nas últimas décadas em decorrência da intensiva e acelerada expansão da produção agrícola, acarretando em perda dos recursos naturais, biodiversidade e viabilidade das espécies a longo prazo (IBGE, 2012; COUTINHO, 2002; RATTER et al., 2006). Apenas uma área de 33 mil km² deste montante é destinada à conservação, no qual estima-se que 20% das espécies endêmicas e ameaçadas não se encontram nessas áreas protegidas legalmente (KLINK & MACHADO, 2005).

Dentre as famílias botânicas mais representativas no Cerrado, a Annonaceae são conhecidas por ocupar o nono lugar em abundância e tem sido apontada por possuir grande valor de riqueza florística em todo país (ALMEIDA et al., 1998b) e por apresentar uma classe de substâncias denominada “acetogeninas de Annonaceae”, que apresentam diversas atividades biológicas como citotóxica, antitumoral, antimicrobiana, entre outras (NASCIMENTO et al., 2003). Esse grande potencial farmacológico tem incentivado nos últimos anos estudos químicos e biológicos de diversas espécies desta família.

Algumas espécies de Annonaceae são reconhecidas por apresentarem propriedade inseticida no controle do mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti*, doença tropical que possui maior ocorrência no Centro-Oeste do país (MONZON et al., 1994; GOSWAMI & RABHA, 2007; LIMA, 2005, MENDONÇA et al., 2005; BOBADILLA et al., 2005; HENAO et al., 2007; MORAES, 2009). O combate ao mosquito transmissor é realizado principalmente com uso de inseticidas sintéticos. No entanto, visto as desvantagens da contaminação ambiental, à saúde do homem e formação de populações resistentes, há necessidade na busca de alternativas mais sustentáveis e seguras.

Neste contexto, o presente trabalho possui a perspectiva de realizar estudo químico biodirigido da espécie *Annona coriacea* a fim de isolar substâncias bioativas frente à larvas de *Aedes aegypti* e obter perfil cromatográfico dos extratos/frações bioativas na busca da determinação da presença de acetogeninas nos mesmos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Dengue

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo e é considerada a mais importante arbovirose que afeta o ser humano. As epidemias da doença ocorrem geralmente no verão (MORAIS & CAVALCANTI, 2007). Até o momento são conhecidos quatro sorotipos da doença: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (BRASIL, 2007).

Os países tropicais são os principais locais em que ocorre e dissemina-se a doença, devido às condições do meio ambiente que acabam favorecendo o desenvolvimento e proliferação do mosquito transmissor (BRASIL, 2005). As áreas de distribuição de maior risco da dengue no mundo são países da América Central, América do Sul (exceto Chile e Argentina), México, África, Austrália, Caribe, China, Ilhas do Pacífico, Índia, Sudeste Asiático e Taiwan (**Figura 1**).



Figura 1 - Ocorrência e distribuição da dengue no mundo - 2010

Fonte: WHO, International Travel and Health - http://www.wpro.who.int/health_topics/dengue

No Brasil, o mosquito vetor se faz presente em cerca de 3600 municípios brasileiros, com destaque para as regiões Central, Sudeste e Nordeste (MORAIS E CAVALCANTI, 2007).

2.1.1. Mosquito transmissor *Aedes aegypti*

Diversas doenças que afetam a saúde humana como a dengue, febre amarela, leishmaniose, malária e filariose apresentam como vetores algumas espécies de mosquitos. No caso da dengue, a transmissão da doença é realizada por mosquito do gênero *Aedes*, tendo como principal vetor o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culidae), embora outras espécies como *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) e *Aedes polynesiensis* (Marksem, 1951) também possam transmitir a doença (GUZMÁN & KOURI, 2001; BRASIL, 2005).

O *Aedes aegypti*, da ordem *Dipterae* e família *Culicidae*, também vetor da febre amarela urbana, é considerado um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade

hematofágica diurna e utiliza-se de água limpa para colocar seus ovos (FURTADO et al., 2005). Distinguem-se de outros mosquitos por possuírem cor preta com pequenos riscos brancos no dorso, na cabeça e nas pernas, as asas são translúcidas, emitem ruído praticamente imperceptível ao ser humano e são de menor porte que os mosquitos comuns.

O macho se alimenta de frutas, já a fêmea busca sangue para suprir suas necessidades protéicas no período de ovoposição. Os ovos são depositados separadamente nas paredes internas de objetos em locais próximos a extensas superfícies de água limpa, no entanto mesmo que não haja água no local, os ovos não morrem e eclodirão logo ao primeiro contato com a água. Se os ovos forem colocados por uma fêmea contaminada pelo vírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae, os mesmos após completarem seu ciclo evolutivo irão transmitir a dengue (TEIXEIRA et al., 2006).

Essa espécie se desenvolve por metamorfose completa (cerca de dez à quinze dias), tendo seu ciclo de vida basicamente quatro fases que são ovo (A), larva (B), pupa (C) e mosquito adulto (D) (**Figura 2**). O período de eclosão dos ovos após contato com água varia de um a três dias, o período de fase larval varia de cinco a dez dias, compreendem quatro etapas chamadas ínstar, possuindo em todos os ínstares grande mobilidade, alimentando-se de materiais orgânicos e microrgânicos (fungos, bactérias e protozoários) presentes na água. A pupa também possui mobilidade, possui duração de aproximadamente dois dias e o mosquito adulto tem tempo de vida entre trinta a quarenta e cinco dias (TEIXEIRA et al., 2006; WHO, 1997).

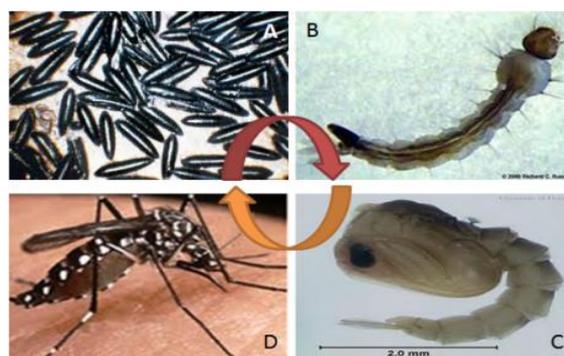


Figura 2 - Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*

2.1.2. Prevenção e combate ao *Aedes aegypti*

Pesquisas para o desenvolvimento de uma vacina contra o vírus da dengue tiveram início durante a II Guerra Mundial, no entanto fatores como a falta de informação dos mecanismos patogênicos, a ocorrência de quatro sorotipos (DEN 1, 2, 3, 4) e falta de

incentivos econômicos dificultaram os avanços nessa área (HOMBACH, 2007). Embora atualmente, as vacinas para dengue estejam em vários estágios de desenvolvimento, até o momento não há uma vacina validada para a utilização.

Visto isso, a prevenção da dengue baseia-se em alguns programas integrados de vigilância epidemiológica (eliminação de criadouros naturais, aplicação de inseticida para larvas e adultos), educação ambiental e principalmente a integração com a sociedade em ações voltadas na redução de potenciais locais de desenvolvimento de formas imaturas (larvas) (GUBLER, 1998).

Esses controles acima citados são classificados como mecânicos que consistem em medidas direcionadas a vasilhames providenciando a remoção/alteração de suas condições para que não possam acumular água e proliferar formas imaturas do mosquito, além do controle químico que consiste na aplicação de produtos químicos em locais e arredores de criação, abrigo e/ou repouso do vetor, sendo ainda dividido em duas classes, larvicida e aduicida (MARCONDES, 2001; TAUIL, 2001).

São também utilizados alguns repelentes à base de DEET (*N,N*-dietil-3-metilbenzamida), à base de mistura de óleo da semente de andiroba com parafina e à base de óleo de citronela. No entanto o uso em larga escala de inseticidas sintéticos tem sido utilizado para reduzir a população de mosquitos adultos, como no uso do “fumacê” (MORAIS & CAVALCANTI, 2007).

2.2. Inseticidas sintéticos

Os inseticidas tradicionalmente mais utilizados tem sido os piretroides sintéticos, organofosforados, seguidos pelos carbamatos e organoclorados que tiveram seu uso descontinuado e são proibidos em vários países, embora o seu uso ainda permaneça até os dias atuais (AUGUSTO & NETO, 2005; BRAGA & VALLE, 2007).

2.2.1. Consequências no uso de inseticidas sintéticos

O amplo espectro de atividade dos inseticidas sintéticos, a ação rápida e eficiente no combate do mosquito *Aedes aegypti* são algumas das principais vantagens em seu uso no país, porém o uso frequente acarreta uma série de desvantagens, como a contaminação ambiental, alta toxicidade para a saúde do homem e da formação de populações resistentes, processo que ocorre com frequência, pois morrem os indivíduos suscetíveis, mas sobrevivem os resistentes o que aumenta a sua população (BRAGA et al., 2004; MORAIS & CAVALCANTI, 2007).

A velocidade de formação de populações resistentes é influenciada por diversos mecanismos como fatores genéticos, biológico-ecológicos e operacionais, sendo que somente esses últimos o homem pode controlar com intuito de reduzir o aparecimento da resistência, significando que para o inseticida continuar eficiente faz-se necessário a aplicação de dosagens cada vez maiores (VIEIRA et al., 2001).

A seleção de população de mosquitos resistentes aos atuais inseticidas já foi registrada em vários países como Tailândia, Panamá, Cuba, Peru, Venezuela e em diversos estados brasileiros, como Paraíba, São Paulo, Rio de Janeiro, Sergipe, Alagoas, Ceará, no Distrito Federal e na cidade de Campo Grande (JIRAKANJANAKIT et al., 2007; BISSET et al., 2003; RODRÍGUEZ et al., 2007; BESERRA et al., 2007; LUNA et al., 2004; CARVALHO et al., 2004; BRAGA et al., 2004; LIMA et al., 2006a; CAMPOS & ANDRADE, 2001).

As diversas consequências causadas pelo uso de inseticidas químicos justificam a necessidade de alternativas mais sustentáveis (menos agressivas ao meio ambiente e à saúde humana) e do desenvolvimento de inseticidas mais seguros com novos modos de ação (VIEIRA & FERNANDES, 1999; WHO, 2003).

2.3. Inseticidas de origem vegetal

As plantas produzem diversos metabólitos especiais como um mecanismo de defesa contra predação e infecção, adquirindo diversas atividades biológicas como repelência, fagoinibidora e inseticida. Esta observação incentivou a procura de novos inseticidas de origem vegetal (VIEIRA & FERNANDES, 1999). Em meados de 1940, o uso de inseticidas derivados de produtos naturais foi amplamente utilizado no combate aos insetos da agricultura, no entanto, a partir da II Guerra Mundial, o surgimento dos inseticidas sintéticos substituiu por completo o uso de agentes naturais (MORAIS & CAVALCANTI, 2007; VIEIRA et al., 2001).

A busca de compostos de origem vegetal com ação inseticida tem sido interesse em diversos grupos de pesquisa de todo o mundo, pois fatores como a viabilidade econômica, aliada ao panorama político global e a menor toxicidade em relação aos inseticidas sintéticos fez com que esta tendência tenha criado grandes oportunidades para o desenvolvimento de inseticidas naturais em laboratórios de pesquisas em universidades e indústrias (MORAIS & CAVALCANTI, 2007).

Os inseticidas derivados de produtos naturais não são persistentes, ou seja, degradam-se com maior velocidade que os sintéticos, não deixando resíduos no alimento

ou no meio ambiente. São considerados menos tóxicos ao meio ambiente e eficaz contra as pragas domésticas, moscas e mosquitos (MORAIS & CAVALCANTI, 2007).

Para ser comercialmente viável, uma substância com potencial inseticida deve preencher uma série de requisitos, como seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em mamíferos, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade. Além de preencher alguns critérios como ser originada de matéria-prima abundante, baixo custo, facilidade para caracterização e padronização dos compostos ativos em variedades naturais da planta-fonte e potencial para patentear a tecnologia de obtenção dos compostos inseticidas (MORAIS & CAVALCANTI, 2007).

Alguns praguicidas naturais também vêm sendo usados como compostos protótipos para síntese de análogos sintéticos, como os piretróides, rotenóides e rianóides (Figura 3).

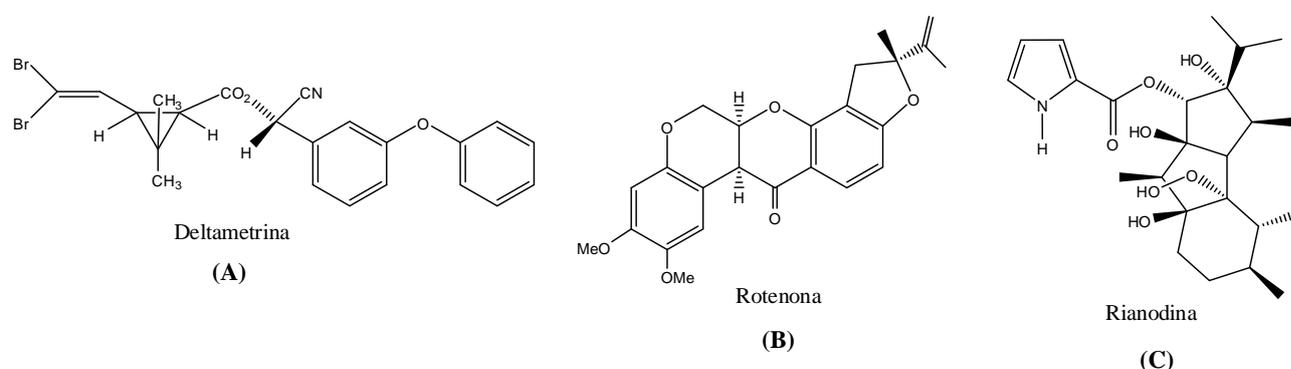


Figura 3 - Exemplos de piretróides (A), rotenóides (B) e rianóides (C)

2.3.1. Inseticida vegetal contra *Aedes aegypti*

É crescente o estudo de extratos vegetais ativos eficientes no combate ao mosquito vetor da dengue (VIEIRA & FERNANDES, 1999). Estudo realizado em 1950 apresentou que de 2500 espécies de plantas analisadas, 180 mostraram atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (MORAIS & CAVALCANTI, 2007).

Famílias botânicas como Asteraceae (GREEN et al., 1991), Annonaceae (SANCHEZ et al., 1997), Boraginaceae (IOSET et al., 2000), Caesalpiniaceae (SANCHEZ et al., 1997), Curpessaceae (CHENG et al., 2003), Fabaceae (SANTIAGO et al., 2005), Flaviviridae (SIMAS et al., 2004), Labiatae (CICCIA et al., 2000), Lauraceae (CHENG et al., 2003), Lamiaceae (ARIVOLI & TENNYSON, 2011), Leguminosae (GUSMÃO et al., 2002), Meliaceae (SANCHEZ et al., 1997; SIDDIQUI et al., 2000; WANDSCHEER et al., 2004), Menispermaceae (CICCIA et al., 2000), Piperaceae (SIDDIQUI et al., 2004), Papaveraceae (SAKTHIVADIVEL; THILAGAVATHY., 2003), Rutaceae (SIVAGNANAME & KALYYANASUNDARAM, 2004), Sapindaceae (ARRUDA et al., 2003), Solanaceae

(SANCHEZ et al., 1997) e Taxodiaceae (CHENG et al., 2003) se destacaram por apresentarem grande potencial larvicida ao vetor da dengue.

Das famílias acima citadas, Annonaceae vêm sendo amplamente estudada, pois possuem substâncias potencialmente ativas e é amplamente distribuída pelo território brasileiro (NASCIMENTO et al., 2003; BERMEJO et al., 2005). Algumas espécies desta família já tiveram comprovadas sua atividade inseticida sobre o mosquito *Aedes aegypti*, como *A. squamosa* (MONZON et al., 1994; GOSWAMI e RABHA, 2007; KAUSSHIK e SAINI, 2009; SANT'ANA et al., 2007), *A. crassiflora* (SANT'ANA et al., 2007), *A. coriacea* (DILL, 2011), *A. muricata* (BOBADILLA et al., 2005; HENAO et al., 2007; MAGADULA et al., 2009; SANT'ANA et al., 2005; SANCHEZ et al., 1997; DOMINGUEZ-MARTINEZ, 2003; SANT'ANA et al., 2007), *A. glabra* (MENDONÇA et al., 2005; SANT'ANA, et al., 2007), *A. cherimola*, *A. bullata* e *A. densicoma* (SANABRIA et al., 2009).

2.4. Aspectos Químicos e Farmacológicos

2.4.1. Generalidades sobre a família Annonaceae e gênero *Annona*

Annonaceae é uma das maiores famílias da Ordem Magnoliales e entre as Angiospermas, com cerca de 135 gêneros e 2.500 espécies, com distribuição pantropical, constando de árvores, arbustos e lianas (PONTES et al., 2004). Amplamente encontrada no Brasil, com registro de 26 gêneros e cerca de 260 espécies distribuídas nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (CHATROU et al., 2004; MAAS et al., 2010). Engloba uma grande variedade de frutos comestíveis que possuem intensa semelhança entre si (ALMEIDA et al., 1998a).

A família se destaca pela grande variedade de constituintes químicos pertencentes a vários grupos fitoquímicos como amidas (LIMA, 2005; SANTOS et al., 1996a), terpenos (CHANG et al., 1998), esteroides (MOREIRA et al., 2003), taninos, flavonoides (LEBOEUF et al, 1982; PRADO et al., 2008), óleos voláteis, resinas, ligninas (FERREIRA et al., 2009; BRITO et al., 2008), principalmente alcaloides (SIQUEIRA et al., 2007) e acetogeninas (MCLAUGHLIN et al., 1999). Os maiores gêneros da família são *Guatteria* (250 sp), *Uvaria* (175 sp), *Xylopi*a (160 sp), *Polyalthia* (150 sp) e *Annona* considerado o mais importante com cerca de 150 espécies (NASCIMENTO, 2008).

O gênero *Annona* possui ampla distribuição em países tropicais (**Figura 4**) estendendo-se desde o norte do México, sul da Flórida, ilhas do Caribe, África tropical, oeste da Índia, Madagascar, com maior concentração no continente americano, ocorrendo praticamente em todo o Brasil (LORENZI & SOUZA, 2008; MAAS et al., 2010).

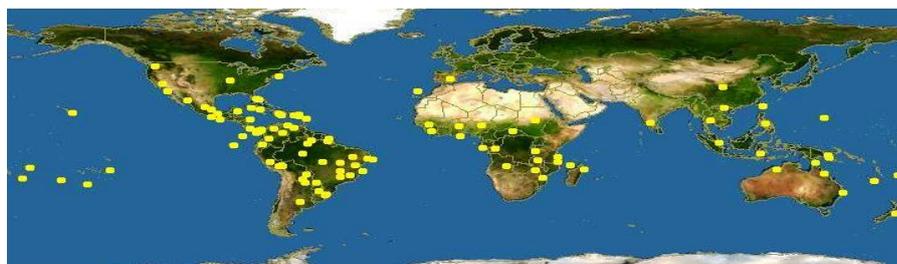


Figura 4 – Distribuição geográfica do gênero *Annona* pelo mundo

Fonte: http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map&kind=Annona&guide=Dicotyledoneae

Diversas espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular no tratamento de diabetes, febre, doenças dos olhos, estômago e intestino, aftas, dermatoses e outras doenças de pele de crianças e animais, irritações, malária, úlcera péptica, cólicas, diarreias, doenças venéreas, furúnculos, ulcerações, para induzir a supuração, como vermífugo, inseticida, abortivo e em acidentes ofídicos (SONNET et al., 1971; SANTOS, 1993; LORENZI, 2002; CORREA, 1984; LEAMAN et al., 1995). Ainda são atribuídas a estas as propriedades adstringentes, antidiarreicas, antitumoral, esterilizante, reumática, anti-helmíntica, parasiticida, carminativas, entre outras (CORREA, 1984; SHIRWAIKAR et al., 2004).

As principais substâncias encontradas no gênero *Annona* são alcaloides (SIQUEIRA et al., 2007), esteroides (CHEN & WU, 2001), terpenos (CHANG et al., 1998), flavonoides (SANTOS & SALATINO, 2000; DESAI et al., 2011) e acetogeninas (ACGs) (MCLAUGHLIN et al., 1999). Nesse gênero é apresentado o maior número de ACGs isoladas, já foram relatados mais de 700 ACGs desde 1982 até os dias atuais em apenas 37 espécies estudadas.

No ano de 2005 foi publicado na literatura o último artigo de revisão de ACGs de Annonaceae (BERMEJO et al., 2005), partindo-se dessa informação, foi realizado um levantamento bibliográfico utilizando-se como ferramenta de busca o Portal de Periodicos Capes e *Scifinder*TM com varredura de 2006 à 2012. Nesta busca foram relatados isolamento de mais de 62 ACGs no gênero *Annona* e diversas atividades biológicas como antioxidante *in vitro*, citotóxica *in vitro*, inibitória do complexo mitocondrial I, antitumoral *in vivo*, nematicida, antifúngica e antimicrobiana (BARDÓN et al., 2009-2010; BOAVENTURA et al., 2010; CHAMPY et al., 2009a-b; CORTES et al., 2006; FENG et al., 2011; LI et al., 2008; 2009; 2011; LIMA et al., 2009; NASCIMENTO, 2008; PIMENTA et al., 2006; RAHMAN et al., 2005; SANTOS et al., 2007; SCHLIE-GUZMÁN et al., 2009; KIM et al., 2011; WU et al., 2005; 2008; YANG et al., 2009).

São escassos relatos de ACGs com atividade inseticida frente à larvas e mosquitos adultos de *Aedes aegypti*, sendo descrita apenas a acetogenina rolinicina (**Figura 7**) isolada de sementes de *A. crassiflora* que apresentou 100% de mortalidade das larvas com 10 ppm (LIMA, 2005).

2.4.2. A espécie *Annona coriacea* Mart

Popularmente conhecida por marolinho e cabeça-de-negro, a espécie *Annona coriacea* (**Figura 5**) é uma árvore nativa que ocorre em fisionomias campestres de Cerrado, podendo ser encontrada no DF e nos estados da BA, PA, TO, RO, MA, PI, CE, PB, PE, SP, MG, GO, MT e MS (ALMEIDA et al., 1998a-b; MASS et al., 2010).



Figura 5– Árvore e fruto de *Annona coriacea*

Fonte: Material fotográfico cedido pela equipe de coleta UNEMAT – Tangará da Serra

É uma espécie arbórea com altura de 3 a 7 metros, com folhas simples e grandes pétalas carnosas. Sua madeira é leve e mole, utilizada em ornamentação e paisagismo. O fruto é globoso ou alongado, polpa branca, aquosa, mole, envolvida por uma casca lisa ou recoberta por escamas carnosas. São apreciados pela fauna e consumidos *in natura* e na forma de suco pela população. O período de floração e frutificação ocorre nos meses de novembro e dezembro (LORENZI, 1992).

Na medicina popular, a espécie é utilizada no tratamento de diarreia, furúnculo, úlceras, parasitoses, inflamações, dores no estomago, gases intestinais, nevralgias, cefaleia, estomatite, reumatismo, em compressas e bochechos, como anti-helmíntico e antirreumático (AGRA, 1977; CRUZ, 1985; VALADARES et al., 2005; BERMEJO et al., 2005; SOUZA et al., 2007).

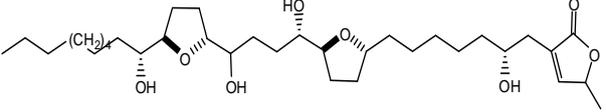
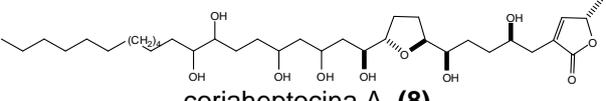
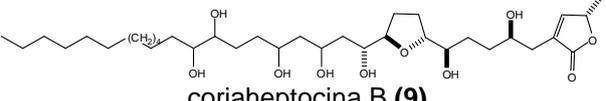
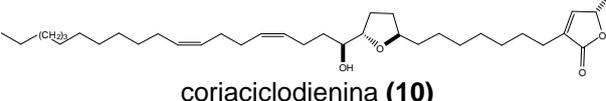
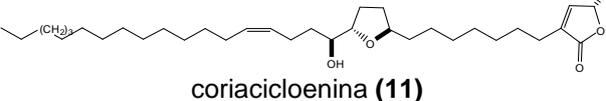
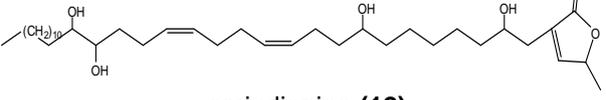
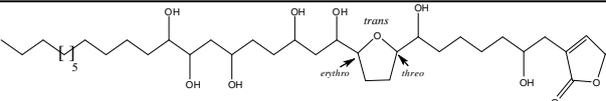
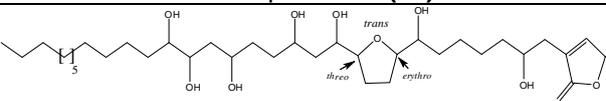
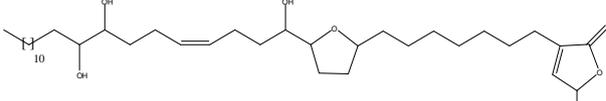
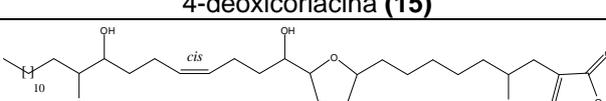
2.4.2.1. Fitoquímica de *Annona coriacea*

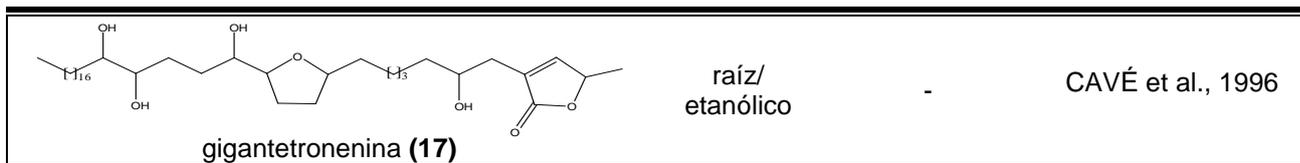
Desta espécie foi isolado um diterpenoide com esqueleto clerodano que apresentou atividade citotóxica contra linhagem celular de câncer de ovário humano e mostrou atividade (IC_{50} 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra fungos fitopatogênicos como *Leptosphaeria*

nodurum, *Phytophthora infestans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Septoria tritici* entre outros (ORSINI & PELLIZONI, 1977; ADOU et al., 2005).

São descritos o isolamento de 11 acetogeninas nesta espécie, sendo a primeira isolada em 1994, das quais apenas duas apresentaram atividade biológica significativa (Quadro 1).

Quadro 1 – Acetogeninas isoladas de *A. coriacea*

Estrutura	Parte da planta/ extrato	Atividade	Referência
 gigantecina (7)	semente/ etanólico	citotoxicidade celular tumoraes humanas	YU, et al., 1994
 coriaheptocina A (8)	raiz/ etanólico	-	CAVÈ et al., 1997a
 coriaheptocina B (9)	raiz/ etanólico	-	CAVÈ et al., 1997a
 coriaciclodienina (10)	raiz/ etanólico	-	MENESES DA SILVA et al., 1997
 coriacicloenina (11)	raiz/ etanólico	-	MENESES DA SILVA et al., 1997
 coriadienina (12)	raiz/ etanólico	citotoxicidade celular tumoraes humanas e animais	CAVÈ et al., 1996
 annoheptocina A (13)	raiz/ etanólico	-	LAPRÉVOTE et al., 1998
 annoheptocina B (14)	raiz/ etanólico	-	LAPRÉVOTE et al., 1998.
 4-deoxicoriacina (15)	raiz/ metanólico	-	CAVÈ et al., 1995
 coriacina (16)	raiz/ metanólico	-	CAVÈ et al., 1995



- Não apresentaram atividade biológica significativa

Também foi isolado uma proteína lectina das sementes de *A. coriacea*, que provocou processo inflamatório em camundongos (COELHO et al., 2006) e atividade inseticida contra larvas de *Anagasta kuehniella* (traça da farinha) e *Corcyra cephalonica* (traça do arroz), sendo que para *A. kuehniella* promoveu aproximadamente 50% de mortalidade (COELHO et al., 2007).

Trabalho recente apresentou os constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas de *A. coriacea*, analisados por cromatografia gasosa acoplada à detector de massas por ionização química (CG-EM) e de ionização de chama (CG-FID), sessenta compostos foram identificados em uma mistura complexa de sesquiterpenos monoterpenos. O óleo volátil apresentou atividade anti-leishmania (promastigotas para quatro espécies de *Leishmania*) e tripanocida (tripomastigotas de *T. cruzi*), mostrando ser mais ativo contra *Leishmania chagasi* com IC_{50} 39.93 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FISCHER et al., 2011).

2.4.2.2. Estudo biológico de extratos de *Annona coriacea*

Apesar de muito recente, estudo de extratos de *A. coriacea* (**Quadro 2**) apontam grande potencial biológico, como mutagênico, antiplasmodial *in vitro*, alelopático, antimicrobiano, citotóxico, analgésico e anti-inflamatório (SOUZA et al., 2007; VALADARES, et al., 2005; FISCHER et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2011; FORMAGIO et al., 2010; TEMPONE et al., 2005).

A espécie apresenta atividade inseticida sobre ovos e ninfas do barbeiro (*Rhodnius neglectus*) vetor da doença de Chagas (CARNEIRO et al., 2011), sobre ninfas do percevejo de milho *Dichelops melacanthu* (SOUZA et al., 2007) e alto potencial larvicida em *Aedes aegypti* (100% de mortalidade na concentração de 50 ppm) (DILL, 2011).

Quadro 2 - Atividades biológicas de extratos de *Annona coriacea*

Parte da planta	Solvente de extração	Atividade biológica	Referência
Sementes	EtOH	Inseticida	SOUZA et al., 2007 CARNEIRO et al., 2011
		Citotóxica	OLIVEIRA et al., 2011
		Larvicida	DILL, 2011
		Mutagênico	VALADARES, et al., 2005
	MeOH	Inseticida	SOUZA et al., 2007
	Hexano	Inseticida	SOUZA et al., 2007
Folhas	MeOH	analgésica e anti-inflamatória	SOUZA et al., 2007

		Alelopático	FORMAGIO et al., 2010
	EtOH	antiplasmodial <i>in vitro</i>	FISCHER et al., 2004
		Antimicrobiano	TEMPONE et al., 2005
		Citotóxica	OLIVEIRA et al., 2011
	Fração alcaloídica	Antimicrobiano	TEMPONE et al., 2005
		antiplasmodial <i>in vitro</i>	FISCHER et al., 2004
Polpa do fruto	EtOH	Citotóxica	OLIVEIRA et al., 2011
Caule	MeOH	Alelopático	FORMAGIO et al., 2010

2.5. Acetogeninas de Annonaceae

A partir dos anos 80, o estudo fitoquímico da família foi amplamente difundido devido ao isolamento da acetogenina (ACG) uvaricina (**Figura 6**) que apresentou excelente potencial antitumoral *in vivo* sobre a leucemia linfocítica em ratos (JOLAD et al., 1982), despertando grande interesse mundial por essa nova classe de compostos bioativos, denominada “acetogeninas de anonáceas”.

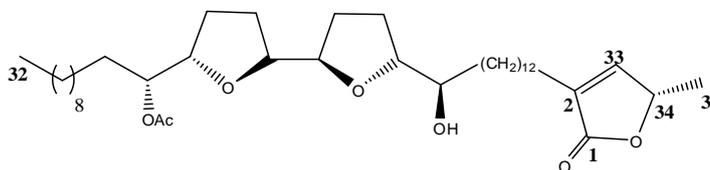


Figura 6 – Estrutura da acetogenina uvaricina

Estas substâncias apresentam-se como uma série de produtos naturais caracterizados por conter estrutura básica de 35 a 37 átomos de carbono. São compostos de origem policetílica, derivados de ácido graxo com cadeias contendo C-32/C-34 que combinados com uma unidade de 2-propanol em C-2 formam um anel metil-substituído α,β -insaturado γ -lactônico terminal.

Apesar de não haver relatos de trabalhos experimentais sobre a biossíntese de ACGs, análise retrossintética de substâncias conhecidas revelou que as acetogeninas são biossintetizadas através de mecanismos semelhantes à rota biossintética de ácidos graxos, com combinações lineares de duas ou três unidades de carbono (ácido acético e propanóico) via Acetil-CoA, malonil CoA e propanil-CoA.

Os anéis tetraidrofurânicos (THF) adjacentes ou não podem ser formados devido epoxidação de intermediários insaturados dieno, trieno e cetotrienona ao longo da cadeia de ácido graxo, com subsequente ciclização para formar de uma a três unidades de (**Figura 7**).

A estereoquímica dos anéis THF e dos grupos hidroxilas adjacentes são dependentes da posição das ligações duplas, da forma de abertura e fechamento dos anéis epóxidos e dos anéis THF e da face da epoxidação. (1990, 1997, 1999). Em relação

ao anel lactônico, a proposta refere à sua formação devido a uma condensação do tipo aldólica e um precursor contendo três átomos de carbono.

Ao longo da cadeia alifática podem ser encontrados grupos oxigenados como hidroxila, cetona e anel epóxido, algumas podem apresentar anéis tetraidropirânicos (THP), além de ligação dupla e tripla. A presença de acetogeninas de cadeias lineares com ligações duplas, anéis epóxidos e duplas e com mais de um anel epóxido, indica que estas podem ser precursoras das demais existentes (MCLAUGHLIN et al., 1999; 1990).

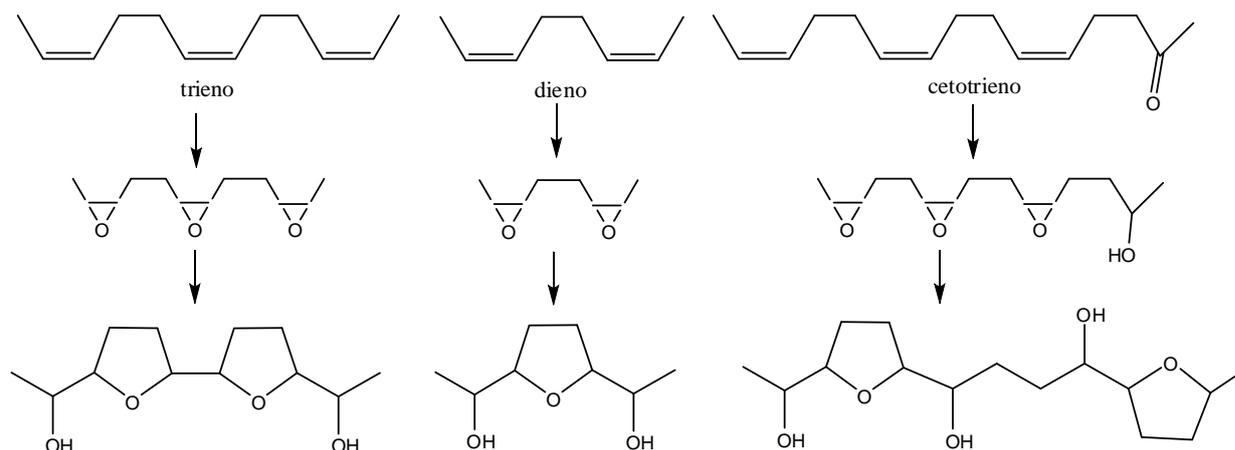


Figura 7 - Hipótese para a biossíntese de anéis tetraidrofurânicos em acetogeninas de Annonaceae.

As ACGs podem possuir diversas polaridades, que variam das muito polares como as extraídas em água (PÉREZ-PACHECO et al, 2004), etanol (SANTOS et al., 1996b), acetona (KHALEQUZZAMAN & SULTANA, 2006), até as não-polares extraídas em clorofórmio (PARVIN et al., 2003), hexano (FONTANA et al., 1998) e éter de petróleo (OLIVEIRA et al., 1994).

Diversas ACGs já foram identificadas nos gêneros *Annona*, *Anomianthus*, *Artabotrys*, *Asimina*, *Dasymaschalon*, *Disepalum*, *Goniothalamus*, *Ophrypetalum*, *Polyalthia*, *Porcelia*, *Rollinia*, *Saccopetalum*, *Sassopetalum*, *Uvaria* e *Xylopia*, sendo isoladas em diversas partes das plantas, como folhas, ramos e principalmente em sementes (MCLAUGHLIN et al., 1999; BERMEJO et al., 2005); podem apresentar diferentes características físicas como sólido ceroso esbranquiçado; cristais; cera incolor e amarelo-pálido; pó branco, cristalino e amorfo; e nas formas de óleo branco, amarelo e transparente (MCLAUGHLIN et al., 1999).

2.5.1. Classificação estrutural das ACGs

As ACGs são caracterizadas com base em sua estrutura química. São classificadas quanto ao número, presença e/ou ausência de anéis (THF), de subunidades de γ -lactonas e de anel epóxido (BERMEJO et al., 2005).

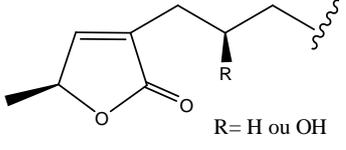
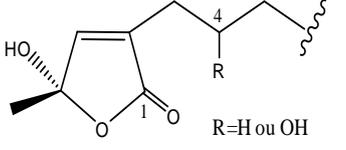
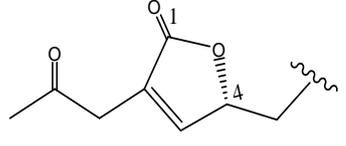
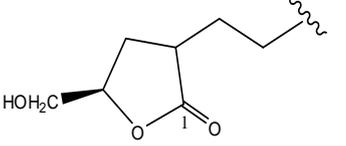
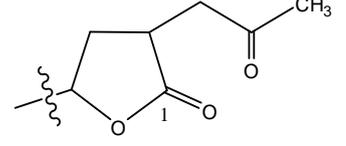
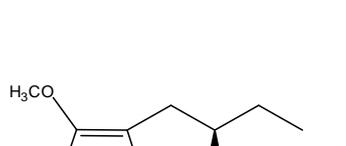
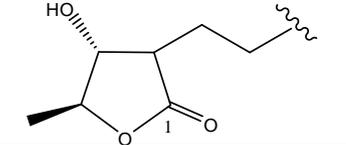
Em relação ao anel THF, as acetogeninas podem se apresentar como *mono*-THF, *bis*-THF adjacentes, *bis*-THF não adjacentes, *tri*-THF adjacentes, as que não possuem anel THF e às não clássicas. Os anéis THF e/ou THP podem ser α,α' -dihidroxiados ou α -hidroxiados (MCLAUGHLIN et al., 1999) (**Quadro 3**).

Quadro 3 – Classificação das acetogeninas em relação ao anel THF.

Classes de acetogeninas	Tipos de anéis THF e THP em sistemas α -hidroxiados
mono – THF	
bis – THF adjacente	
bis – THF não adjacente	
tri – THF adjacente	
Sem anel THF	 R= $-(CH_2)-$; epóxido; cetona; álcool
Não-clássicas (THP)	

Em relação ao anel lactônico (**Quadro 4**), o padrão de substituição do anel pode variar nas estruturas, podendo apresentar γ -lactona substituída, variações de cetolactona ou anel hidroxilado (MCLAUGHLIN et al., 1999).

Quadro 4 - Classificação das acetogeninas em relação ao anel γ -lactônico.

Subclassificação	Sub-tipo do anel lactônico	Subclassificação	Sub-tipo do anel lactônico
lactona substituída		Anel hidroxilado α,β -insaturado	
α - acetona- α,β -insaturada- γ -lactona		γ - hidroximetil- γ -lactona saturado	
<i>cis</i> ou <i>trans</i> cetolactona		β -metoxi- γ -metileno- α,β -insaturado- γ -butirolactona	
Anel hidroxilado			

2.5.2. Elucidação estrutural e padrão de fragmentação de ACGs

A elucidação estrutural de ACGs é realizada através da combinação de vários métodos espectroscópicos, principalmente ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EI-EM, ESI-EM, MS/MS e/ou FAB-EM) (LAPRÉVOTE et al., 1998). De forma particular, o estudo da espectrometria de massas fornece diversos dados importantes como fórmula molecular e massa molecular exatos em casos de multihidroxilas incluindo uso de derivados tetrametilsilano, estabelecer a posição do anel THF com presença/ausência de grupo(s) OH adjacentes, verificar a presença de OH no C4, quando houver e ainda verificar outros grupos funcionais adicionais como hidroxilas individuais, dióis vicinais e ligações dupla na cadeia alifática (BERMEJO et al., 2005; TOUBOUL et al., 2010).

Verifica-se nas análises das fragmentações de ACG que é comum a perda de H_2O da molécula (a partir do $[MH]^+$); perda de H_2O nas fragmentações quando houver grupo hidroxila; quebra na ligação adjacente ao anel-THF; fragmentação entre o anel THF com a cadeia lateral alquílica terminal; quebra nas ligações α com C-OH na cadeia alifática.

A análise de fragmentações de ACG é complexa, pois um grande número de ACGs pode ser encontrado com a mesma massa molecular $[MH]$ e, além disso, essas ACG podem ser de classes diferentes. Como por exemplo, para o íon molecular 638 m/z são encontrados mais de 64 ACGs de diferentes classes como *mono*-THF com OH em C4; *bis*-THF adjacente com e sem OH em C4, *bis*-THF adjacente α -monohidroxilado; *bis*-THF

não-adjacente com e sem OH em C4; com ceto-lactona; anel THP e THF não adjacentes; sem THF, com grupo cetona na cadeia alifática, tetraidroxilada com e sem OH em C4; tetraidroxilada com OH em C5 (MCLAUGHLIN et al., 1996; BERMEJO et al., 2005).

2.5.3. Atividade biológica e Mecanismo de ação

As ACGs apresentam uma gama de atividades biológicas importantes como antitumorais, pesticidas, antimicrobianas, citotóxicas, antiparasitária, vermícidas, imunossupressoras, anti-helmínticas, abortivas, antiprotozoárias, fago inibidora do apetite, antimaláricas, antieméticas, dentre outras (MCLAUGHLIN et al., 1999; ZENG et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2003; BERMEJO et al., 2005).

Estudos apontam que as ACGs atuam como potentes inibidores da NADH mitocondrial: ubiquinona oxidoreductase (enzima essencial no complexo I do sistema transportador de elétrons) e da ubiquinona oxidase peculiar da NADH (enzima que permite as funções de fosforilação citosólica) para as membranas plasmáticas de células tumorais humanas, no qual ocorre para ambos a privação de ATP, com resultado esperado a apoptose (morte celular programada) (WU et al., 1997; GALLARDO et al., 1998; MCLAUGHLIN et al., 1999; BERMEJO et al., 2006; ZENG et al., 1996).

2.5.4. Propriedades inseticidas

Quanto ao seu uso em insetos, inicialmente foi observado que as toxicidades causadas pelas ACGs resultavam em letargia. Insetos tratados apresentaram níveis substancialmente inferiores de adenosina trifosfato (ATP), semelhantes aos efeitos da antimicina A (conhecido inibidor do sistema de transportador de elétrons mitocondrial), por induzirem o processo de apoptose em células tumorais com concentração muito baixa e por sua capacidade de inibir complexo mitocondrial I, as ACGs são compostos citotóxicos que encontram-se em expansão no uso como inseticidas (MCLAUGHLIN, 2008; BERMEJO *et al.*, 2006).

Algumas apresentaram atividade mais potente que os inseticidas comerciais, como as ACGs bullatacina e trilobacina com 2,5 a 5 vezes maior potencial inseticida que a rotenona inibindo o complexo I mitocondrial, sobre larvas do mosquito da febre amarela e sobre baratas (segundo e quinto instar). A fração metanólica do extrato etanólico da casca de *Asimila triloba* (Annonaceae) apresentou 30% mais eficaz do que a rotenona em um ensaio de larvas do mosquito da febre amarela. Em um ensaio com o nematoide (*Caenorhabditis elegans*), a mesma fração mostrou letalidade de 100% a 10 ppm após 72

h, enquanto que as piretrinas não apresentaram nenhuma atividade nematocida nas mesmas condições (GUPTA et al., 2011).

De uma maneira geral, as ACGs têm ação de intoxicação sobre os insetos via ingestão alimentar, inibição de crescimento, oviposição, inclusive ação repelente. Compostos citotóxicos que agem sobre a cadeia respiratória celular provocam 70% de mortalidade em alguns insetos como o *Aedes aegypti* (CORDEIRO et al., 2000). Estudos que elucidam o mecanismo de ação de ACGs em larvas de *Aedes aegypti* são escassos, mas recentemente um trabalho verificou alterações morfológicas das células epiteliais do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* causadas pela exposição de extrato hexânico de sementes de *A. coriacea*, confirmando a via de acesso desses compostos pelo trato digestivo nas larvas (COSTA, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O presente trabalho visa realizar estudos relacionados aos aspectos químicos e atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* de extratos de sementes de *Annona coriacea* contribuindo para o conhecimento da biodiversidade mato-grossense sobretudo na busca de potenciais biocidas.

3.2. Objetivos específicos

- Obter extratos hexânicos e metanólicos de sementes de *Annona coriacea*;
- Avaliar o potencial inseticida dos extratos de *A. coriacea* frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*;
- Realizar o fracionamento cromatográfico biodirigido dos extratos biologicamente ativos utilizando partição líquido/líquido, técnicas cromatográficas como adsorção em gel de sílica, exclusão por volume, líquida de alta eficiência (CLAE), além de cristalização visando o isolamento e purificação das substâncias que os compõem.
- Isolar e realizar elucidação estrutural de substâncias/acetogeninas com potencial inseticida frente larvas de *A. aegypti*, por meio de técnicas espectrométricas convencionais como IV-FT, EM, RMN ^1H e de ^{13}C usando técnicas uni e bi-dimensionais.
- Obter perfil cromatográfico via CLAE com detector de ELSD e massas (EM) dos extratos e frações bioativos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Equipamentos e reagentes

a) Solventes

Os solventes utilizados na preparação dos extratos, fracionamentos cromatográficos, purificações das amostras e reações de acetilações foram de grau PA das marcas Vetec, Tedia, Dinâmica, Quimex, Isofar, Grupo Química, Merck e Sigma Aldrich.

b) Material Cromatográfico

Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada (CCDA) foram utilizadas cromatoplasmas de alumínio de gel de sílica F₂₅₄ da Merck e/ou placas de vidro preparadas com 9 g de Sílica Gel 60 PF₂₅₄ da marca Merck e 4 g de Sílica Gel 60 G F₂₅₄ das marcas Merck e Vetec, ativadas por 2h à 110°C em estufa. Nas separações cromatográficas em coluna foram utilizados como adsorvente gel de sílica 60 (70-230 mesh - 0,063-0,200 mm) das marcas Sorbent Technologies, Macherey- Nagel e gel de sílica 60 (230-400 mesh-0,04-0,063 mm) das marcas Vetec e Macherey-Nagel. O SephadexTM LH-20 utilizado foi da marca GE Healthcare e a Celite 545 da marca Dinâmica. As colunas de vidro utilizadas foram de vários tamanhos e diâmetros, eluídas a pressão ambiente. A quantidade de fase estacionária utilizada foi de 20 a 30 vezes a quantidade de amostra a ser cromatografada. Os critérios de pureza adotados foram à verificação de uma única mancha em CCD, variando-se a fase móvel.

c) Reveladores

As placas cromatográficas foram visualizadas por irradiação com luz no ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm em equipamento Spectroline Model CC-80 e/ou uso de reveladores químicos e/ou por imersão em cuba com vapores de iodo. Como reveladores químicos foram utilizados, Reagente de Dragendorff (NASCIMENTO et al., 2003; SANTOS et al., 2007; LIAW et al., 2008) e de Kedde (SANTOS et al., 2007; WU et al., 2008) para o diagnóstico para γ -lactona α,β -insaturada (coloração rosa avermelhada).

d) Equipamentos

Na trituração das sementes foi utilizado moinho de facas TECNAL modelo Willye TE-650 e Willye TE-648. A secagem de extratos e frações foi realizada em estufa COLE-PARMER modelo C05053-22 e em estufa à vácuo MARCONI modelo MA 030/12, ambas

em temperatura de 35°C. A ativação das placas cromatográficas de sílica foi realizada em estufa FANEM. Para a evaporação/recuperação de solventes utilizou-se o equipamento rota-evaporador dos modelos BUCHI R-210 com bomba à vácuo BUCHI V-700 e GEHAKA IKA RV 10. A secagem de amostras aquosas foi realizada em liofilizador TERRONI modelo LS3000. A pesagem de amostras foi realizada em balança analítica da GEHAKA modelo BG400 com capacidade de 400g e balança analítica SHIMADZU modelo AEG-220G com capacidade de 220g. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro FT-IR BOMEM, modelo MB 100, utilizando pastilhas de KBr. As bandas de absorção foram expressas em unidades de número de onda (cm^{-1}). Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro da marca BRUKER AVANCE-500 (^1H : 500 e ^{13}C : 125 MHz) realizados no Laboratório de Produtos Naturais da UFRRJ, utilizando como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Os solventes deuterados utilizados (CDCl_3 , CD_3OD e D_2O) foram das marcas Merck e Tedia.

4.2. Reação de acetilação com anidrido acético

As amostras foram solubilizadas em anidrido acético e piridina (1:1) e a solução deixada em agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente (26°C). Após esse tempo foram adicionados 10 mL de água ultrapura gelada, colocada em funil de separação para extração da fase orgânica com clorofórmio (3x10 mL). A fase orgânica assim obtida foi lavada com solução de HCl 10% (3x10 mL) e seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Após evaporação do solvente obtiveram-se as amostras acetiladas.

4.3. Teste biológico e prospecção fitoquímica

a) Atividade inseticida frente à larvas de *Aedes aegypti*

Os ensaios biológicos foram realizados na Universidade do Estado de Mato Grosso *campus* Tangará da Serra, no Laboratório de Entomologia, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Mônica Josene Barbosa. Os insetos para criação massal do mosquito foram obtidos de acordo com a metodologia de SILVA et al. (1998) e para os bioensaios foi utilizado metodologia seguindo o protocolo padronizado pela Organização Mundial de Saúde - WHO (2005). Todos os bioensaios foram realizados em quadruplicata e acompanhados de uma série controle, contendo o mesmo número de larvas em DMSO (2%) ou Tween (2%) e água. O solvente solubilizante (2% em água) das amostras não

apresenta mortalidade das larvas. O tempo de exposição da amostra para realização da leitura das larvas foi de 24 horas.

b) Prospecção fitoquímica

Os testes de prospecção fitoquímica foram realizados utilizando metodologia descrita por Matos (1988), visando à detecção de possíveis grupos químicos presentes nos extratos hexânico e metanólico das sementes de *A. coriacea*. Foram verificadas, através de reações químicas, as seguintes classes de metabólitos especiais: flavonoides, alcaloides, esteroides, fenóis simples, taninos, flavonóis, flavononas, flavononois, xantonas, triterpenoides, saponinas, catequinas, antraquinonas e cumarinas.

4.4. Perfil Cromatográfico via CLAE

Para a obtenção de perfil cromatográfico dos extratos/frações bioativos, foram variadas as fases estacionárias e móveis, fluxos e parâmetros específicos dos detectores a fim se detectar acetogeninas nos mesmos.

a) Solventes e amostras

Os solventes espectroscópicos (CLAE) utilizados nas análises cromatográficas de alta eficiência foram das marcas Tedia e Vetec e água ultrapura deionizada utilizada foi obtida através do sistema de filtração em aparelho Milli-Q (Millipore). As fases móveis utilizadas em CLAE-EM foram acidificadas com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA; $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) grau espectroscópico da Tedia. As amostras injetadas foram previamente filtradas com seringa 1000 μL Hamilton e filtro com membrana de nylon de 13 mm de diâmetro e 0,45 μm de tamanho de poro. As soluções com extratos hexânicos de *Annona coriacea* e *Annona crassiflora* foram preparados utilizando 1 μL da amostra solubilizados em 10 mL de diclorometano (DCM).

b) Material cromatográfico

As colunas analíticas utilizadas nas análises por CLAE foram C18 Gemini (5 μm , 250x4,60 mm, 110A^o, Phenomenex), Microsorb-MV 100CN (5 μm , 250x4,6 mm, 110^o, Varian), Microsorb-MV C18 (5 μm , 250x4,60 mm, 110A^o, Varian), Microsorb-MV C4 (5 μm , 250x4,60 mm, 300 A^o, Varian). Foram utilizados holder com cartuchos de pré-coluna C18 Gemini (5 μm , 3x4,6 mm, 110 A^o, Phenomenex) e C18 (5 μm , 10x4,6 mm, 100 A^o, Kromasil).

c) Equipamentos

CLAE-EM alta resolução: Cromatógrafo líquido da marca Shimadzu, composto de duas bombas modelo LC-20AD, degaseificador da marca Shimadzu modelo DGU-20A-3, detector modelo micrOTOF_Q II – ESI-TOF da Bruker e fonte de ionização eletrospray, operando em modo positivo. Calibração interna realizada com solução de NA-TFA 10 mg/mL (TOF). A voltagem do cone foi de 120 V, com varredura na faixa de 50-1500 *m-z*. Gás nebulizador: Nitrogênio; Pressão do nebulizador: 4,5 Bar (65,3 psi); Fluxo do gás de secagem: 0,6 mL/min; Temperatura de gás secagem: 250 °C; Voltagem do cone (referência): 500.0 volts; Tensão da agulha: (+) 4500 volts. Aparelho pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da USP-Ribeirão Preto sob coordenação do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

CLAE-EM baixa resolução: Cromatógrafo líquido da marca Varian, auto injetor ProStar 410, composto de duas bombas modelo ProStar 210, degaseificador da marca MetaChem, detector de massas Varian modelo 500-MS, com analisador ion trap e fonte de ionização eletrospray, operando em modo positivo. A voltagem do cone foi de 80 V, com varredura na faixa de 50-700 *m/z* e 50-2000 *m/z*. Com os parâmetros: Temperatura da fonte: 50°C; Gás nebulizador: Nitrogênio; Pressão do nebulizador: 35 psi; Gás de secagem (auxiliar): Gás sintético (O₂; Air Liquide); Pressão do gás secagem: 10.0 psi; Fluxo do gás de secagem: 0,8 mL/min; Temperatura de gás secagem: 350 °C; Voltagem do cone (referência): 600.0 volts; Tensão da agulha: (+) 5000 volts; Seringa (Hamilton): 250 µL; Volume do loop: 100 µL; Volume de injeção de amostra: 10 µL. O equipamento foi gerenciado pelo software Varian MSWorkstation versão 6.9.2. Aparelho pertencente à Central Analítica do LPQPN da UFMT.

CLAE-ELSD: Cromatógrafo líquido da marca Varian, modelo ProStar 210 injeção manual, loop e volume de injeção de 20 µL, composto de duas bombas modelo Prepstar 218 com detector ProStar 325 UV-Vis da Varian com comprimento de onda de 220 nm (análises com coluna semi-preparativa) e detector por Espalhamento de Luz (ELSD) da Varian, modelo PL-ELS 2100, com parâmetros de análise: Temperatura do Evaporador de 50°C, Temperatura do Nebulizador de 30°C e Fluxo de Gás (N₂) de 1,4 SLM. O equipamento foi gerenciado pelo software Varian MSWorkstation versão 6.9. Aparelho pertencente à Central Analítica do LPQPN da UFMT.

4.4.1. Perfil cromatográfico dos extratos hexânicos

Foram realizadas diversas injeções do extrato hexânico de sementes de *A. coriacea* coletadas em MS (**EHex-c1**) variando-se a fase móvel, o modo de eluição (gradiente e isocrático), fluxo da fase móvel e fase estacionária com colunas analíticas C4, CN e C18 (marca Varian e Gemini), para obtenção de perfil cromatográfico utilizando o equipamento CLAE com detectores ELSD e EM (**Quadro 5**).

Quadro 5 – Testes utilizados para obtenção de perfil cromatográfico por CLAE.

Fase Móvel	Sistema		Fluxo (mL/min)	Coluna	Detector	
	Tempo (min)	Proporção (A:B)				
A= ACN B= Hex	0-10 20-40 50-60	100% A 100% B 100% A	1,0 ^G	C4	ELSD	
A= ACN + 0,1% TFA B=Hex + 0,1% TFA	0-60	80:20	1,0 ^I	C18 V	ELSD	
	0-60	90:10	0,5 ^I			
	0-60	80:20				
	0-60	75:25				
	0-60	70:30				
A= H ₂ O + 0,1% TFA B= ACN + 0,1% TFA	0-30 40 50-60	15:85 100% B 100% A	1,0 ^G	C4	ELSD	
	0-60	2,5:97,5	1,0 ^I			
	0-60	1:1				
	0-40 50 60	15:85 100% B 100% A	1,0 ^G	C18 V		
			0,5 ^G			
	0-60	10:90	0,5 ^I	C18 G		EM
	0-60	3:97	0,8 ^I			
	A= ACN + 0,1% TFA B= DCM + 0,1% TFA	0 40 60	100% B 100% A 100% B	1,0 ^G		C4
0-60		70:30	1,0 ^I	C18 V		
0-60		98:2	0,5 ^I	C18G	CLAE-EM	
0-60		99,5:0,5				
0-60		90:10				
0-60		90:10				
0-60		80:20				
0-60		70:30				
0-60		60:40				
0-60		50:50				
0-60	70:30	C18 G				
A= ACN B= DCM	0 40 60	100% B 100% A 100% B	1,0 ^G	C4		ELSD
	0-60	70:30	1,0 ^I	C18 V		
	0-5 10-25 30-40 60	20:80 15:85 10:90 5:95	0,9 ^G	C18 V		
	0-60	10:90	0,5			
A= MeOH + 0,1% TFA B=DCM + 0,1% TFA	0-5 10 25	100% A 95:5 90:10	0,5 ^G	C18 G	CLAE-EM	

	30 40-50	50:50 100%A			
	0 50 60	100%A 90:10 100%A			
	0-60	99:01	0,5 ^l		
	0-60	98:2			
	0-60	97:03			
	0-60	95:05			
	0-60	90:10			
	0-60	80:20			
	0-60	50:50			
A= MeOH + 0,1% TFA B= Hex + 0,1% TFA	0-5 55-60 0-60	98:2 2:98 90:10	0,8 ^G 0,5 ^l	C18 V	ELSD
A= MeOH B= Hex	0 10-25 40 60	99,5:0,5 99:1 95:5 90:10	1,0 ^G	CN	
	0-10 20-30 40'-60	100%A 70:30 100%A	0,5 ^G	C18 G	CLAE-EM
A= MeOH B= Hept	0-10 25 40 60	99,5:0,5 99:1 95:5 90:10			CN
	0-25 50-60 0-40 50-60	70:30 100% A 90:10 100% A	1,0 ^G		
A= MeOH + 0,1% TFA B=CHCl ₃ + 0,1% TFA	0 50 60	100%A 90:10 100%A	0,5 ^G	C18 G	CLAE-EM
A= IPA + 0,1% TFA B= AcOEt + 0,1% TFA	0 60 0 50-60	5:95 100% A 100% A 100% B	1,0 ^G	C18 V	ELSD
A= MeOH B= ACN	0-60 0-60	90:10 10:90	1,0 ^l		
	0-60 0-60	90:10 50:50	0,5 ^l	C18 G	CLAE-EM
A= MeOH + 0,1% TFA B= ACN + 0,1% TFA	0 60 0 60 0 50	100% A 100% B 100% A 100% B 80:20 100% B	0,9 ^G 0,5 ^G	C18 V	ELSD
	0-20 60	100% B 100% A			
A= IPA B= DCM	0-60 0-60	100% B; 100% A 100% A; 100% B	1,0 ^G		
A= IPA B= Hex	0-60 0-60 0-10 30 60	0,5:99,5 10:90 0,01;99,9 2:98 100%B 1:99 100% A			

	0-10 25 40 60 80	0,1:99,9 0,3:99,7 2:98 10:90 90:10					
	0 10-25 40 60	0,5:99,5 1:99 5:95 10:90					
	0-60	0,5:99,5	1,0 ^l				
A= ACN + 0,1% TFA B=CHCl ₃ + 0,1% TFA	0-60	95:5	0,5 ^l	C18 G	CLAE-EM		
	0-60	90:10					
	0-60	80:20					
	0-60	90:10	0,8 ^l				
	0-60	90:10	0,6 ^l				
	0-60	90:10	0,4 ^l				
A= MeOH + 0,1% TFA	0-60	100% A	0,5 ^l				
A= MeOH 100%	0-60	100% A	1,0 ^l	C18 V	ELSD		
A= ACN + 0,1% TFA	0-60	100% A	0,5	C18 G	CLAE-EM		
A= ACN 100%	0-60	100% A	1,0 ^l	C18 V	ELSD		
B= DCM + 0,1% TFA	0-60	100% B	0,5	C18 G	CLAE-EM		
B= Hexano 100%	0-60	100%B	1,0 ^l	CN	ELSD		
B= Heptano100%	0-60	100%B					
A= H ₂ O + 0,1% TFA B= ACN:MeOH:DCM (32:29:29) + 0,1% TFA	0-20 60	10:90 100% B	1,0 ^G	C18 V			
A= H ₂ O + 0,1% TFA B= ACN:MeOH:DCM (32:29:20) + 0,1% TFA	0-20 25-60	19:81 100% B					
A=H ₂ O:MeOH:ACN (19:29:32) + 0,1% TFA B= DCM + 0,1% TFA	0-20 30-60 0-20 30-60	20:80 100% B 80:20 100%B					
B= ACN:MeOH:DCM:H ₂ O (32:29:25:14)	0-60	100% B	1,0 ^l				
A= H ₂ O + 0,1% TFA B= MeOH:ACN (98:2) + 0,1% TFA	0 30 35-60	20:80 5:95 100% B	1,0 ^G				
A= H ₂ O + 0,1% TFA B= MeOH:ACN (80:20) + 0,1% TFA	0 40 60	50:50 90:10 50:50					
	0-15 20 25 30 50-60	98:2 95:5 90:10 80:20 35:65					
	0 25 60	100% B 1:99					
	0-30 60	100% A 50:50 100% A	0,5 ^G			C18 G	CLAE-EM
	0-60	95:5	0,5 ^l				
	0-60	90:10					
A= ACN: MeOH: H ₂ O (17:3:80) + 0,1% TFA	0-60	100% A	1,0 ^l		C4	ELSD	
A= IPA 100% B= ACN:DCM (1:1) + 0,1% TFA	0-15 40-60	5:95 95:5	1,0 ^G				

A= ACN: MeOH (8:2); B= DCM 100%	0-20 30-60	100% A 100% B						
A= ACN: MeOH (1:1); B= DCM 100%	0-10 50-60	100% A 100% B						
A= H ₂ O + 0,1% TFA B= ACN:CHCl ₃ (9:1) + 0,1% TFA	0-60	10:90	0,5	C18 G	CLAE-EM			
A= MeOH:ACN (90:10) + 0,1% TFA B= DCM + 0,1% TFA	0-60	98:2						
A= MeOH:ACN (98:2) + 0,1% TFA B= DCM + 0,1% TFA	0-60	98:2						
A= MeOH:ACN (96:4) + 0,1% TFA B= DCM + 0,1% TFA	0-60	98:2						
A=H ₂ O + 0,1% TFA B=ACN/MeOH (1:1) + 0,1% TFA	0-60	30:70	1,0 ^I	C4	ELSD			
	0-60	50:50						
	0-60	20:80						
	0-60	40:60						
	0-60	35:65						
	0-50 50-60	30:70 100% B	1,0 ^G					
A= MeOH + 0,1% TFA B= ACN:DCM (70:30) + 0,1% TFA	0-60 0-60	2:98 10:90	1,0 ^I 0,5 ^I	C18 V C18 G	CLAE-EM			
A= MeOH/H ₂ O (85:15) + 0,1% TFA B= ACN:DCM (7:3) + 0,1% TFA	0-35 45-75	100% A 100% B	1,0 ^G	C18 V	ELSD			
A= MeOH/H ₂ O (1:1) + 0,1% TFA B= ACN:DCM (1:1) + 0,1% TFA	0 60	70:30 100% B						
A= MeOH/H ₂ O (7:3) + 0,1% TFA B= ACN:DCM (7:3) + 0,1% TFA	0 60	40:60 100% B						
A= MeOH/H ₂ O (6:4) + 0,1% TFA B= ACN:DCM (4:6) + 0,1% TFA	0 60	40:60 100% B						
A= MeOH:ACN (1:1) + 0,1% TFA B= ACN:DCM (1:1) + 0,1% TFA	0-25 60	100% B 100% A						
A= MeOH:ACN (1:9) + 0,1% TFA B= ACN:DCM (6:4) + 0,1% TFA	0-25 40-60	100% B 100% A						
A= MeOH:ACN (2:8) + 0,1% TFA B= ACN:DCM (6:4) + 0,1% TFA	0 50 70	100% B 2:98 100% A						
A= MeOH:ACN (1:1) + 0,1% TFA B= ACN:DCM (3:7) + 0,1% TFA	0-30 40-50 60	100% 98:2 100% B						
A= ACN:MeOH (9:1) B= ACN: DCM (7:3)	0-50 60-70	100% B 100% A					C4	
A= MeOH:H ₂ O (85:15) + 0,1% TFA	0-60	100% A				1,0 ^I	C18 V	
A= ACN: DCM (7:3) + 0,1% TFA	0-60	100% A				0,5 ^I	C18 G	CLAE-EM
A= ACN:DCM (7:3) + 0,1% TFA	0-60	100% B				1,0 ^I	C18 V	ELSD
	0-60	100% A				0,5 ^I	C18 G	CLAE-EM
	0-60	100% A				1,0 ^I	C4	ELSD
A= ACN:DCM (6:4) + 0,1% TFA	0-60	100% A	0,5 ^I	C18 G	CLAE-EM			

A= ACN: CHCl ₃ (9:1) + 0,1% TFA	0-60	100% A			
B= ACN:DCM (6:4) + 0,1% TFA	0-60	100% B	1,0 ^l	C18 V	ELSD
A= H ₂ O:ACN (2:8) + 0,1% TFA	0-60	100% A	0,8 ^l	C18 G	CLAE-EM
A= H ₂ O:ACN (15:85) + 0,1% TFA	0-60	100% A	0,8 ^l	C18 G	CLAE-EM
B= MeOH:ACN (98:2)	0-60	100% B	1,0 ^l	C18 V	ELSD

G=gradiente; l=isocrático; IPA=isopropanol; TFA=ácido trifluoroacético; C18 V=C18 Varian; C18 G=C18 Gemini.

4.5. Material Botânico

A identificação da espécie foi realizada pela Prof^a Msc. Aline Fernandes Pontes do Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais da UFMT *campus* Sinop. Amostras-testemunho estão depositadas no Laboratório de Botânica do Centro de Pesquisas, Estudos e Desenvolvimento Agro-Ambiental (CPEDA) da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) *campus* Tangará da Serra. Foram realizadas duas coletas para a espécie *Annona coriacea*. A primeira foi na chácara São Sebastião localizado no município de Bela Vista - MS, em dezembro de 2009 e a segunda coleta foi realizada em estradas vicinais no município de Tangará da Serra - MT, nos meses de outubro a dezembro 2010, com número de exsicata 269, ambos por equipe de coleta UNEMAT (Tangará da Serra).

4.6. Secagem e pulverização das sementes

Após a coleta, os frutos foram despulpados e as sementes das espécies foram secas à sombra, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram transferidos para estufa com circulação de ar, à temperatura de 40°C, onde permaneceram por 3 dias. O material seco foi triturado em moinho de facas (30-45° C) obtendo-se as sementes trituradas.

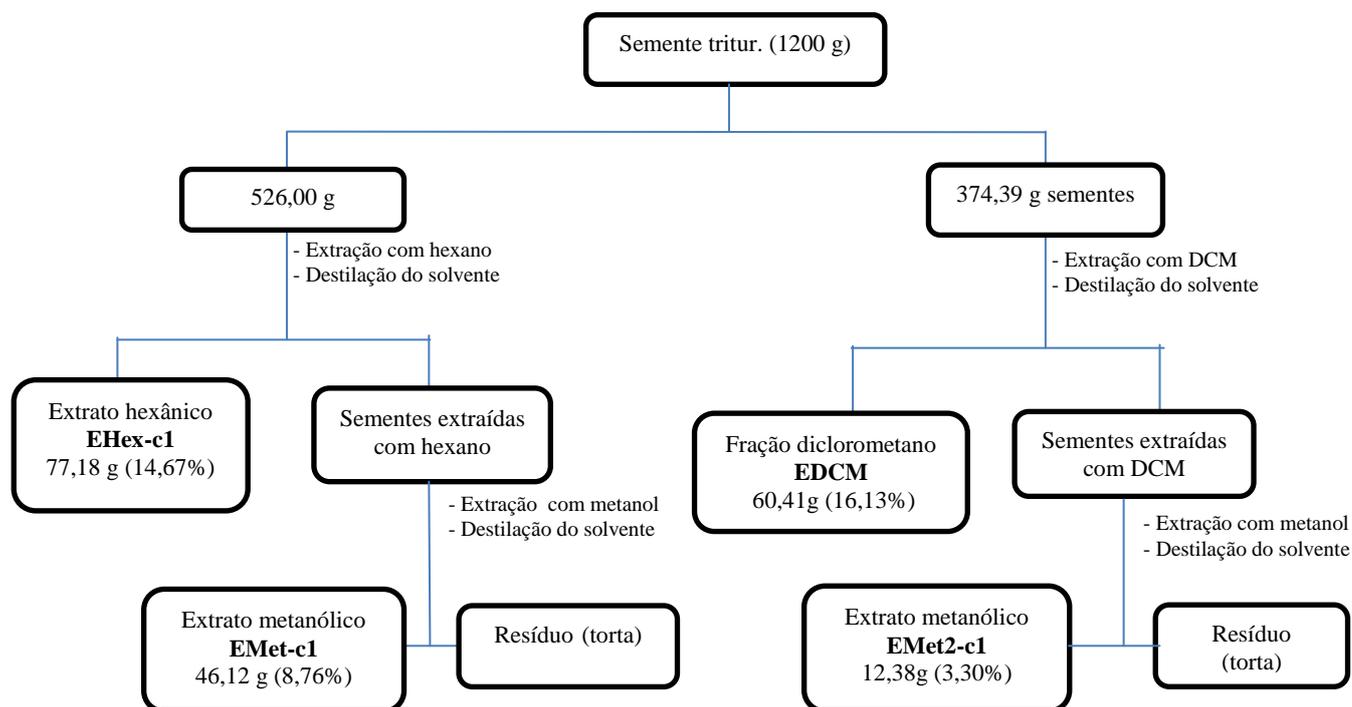
4.7. Obtenção, partição e fracionamento dos extratos de sementes de *A. coriacea*

4.7.1. Coleta 1 – sementes *A. coriacea* MS

As sementes trituradas (1200 g) foram divididas em duas partes para realização de diferentes extrações (**Esquema 1**). Uma parte das sementes trituradas (526,0 g) foi submetida à extração em temperatura ambiente com hexano, posteriormente foram extraídas com metanol. Foram obtidos 77,18 g (14,67% rendimento) de extrato hexânico (**EHex-c1**) e 46,12g (8,76%) de extrato metanólico (**EMet-c1**).

A outra parte das sementes trituradas (374,39 g) foi submetida à extração com diclorometano e posteriormente com metanol. Foram obtidos 60,41 g (16,13%) de extrato diclorometano (**EDCM**) e 12,38 g (3,30%) de extrato metanólico (**EMet2-c1**). Alíquotas

dos quatro extratos foram encaminhadas para teste de atividade larvica frente *Aedes aegypti*.

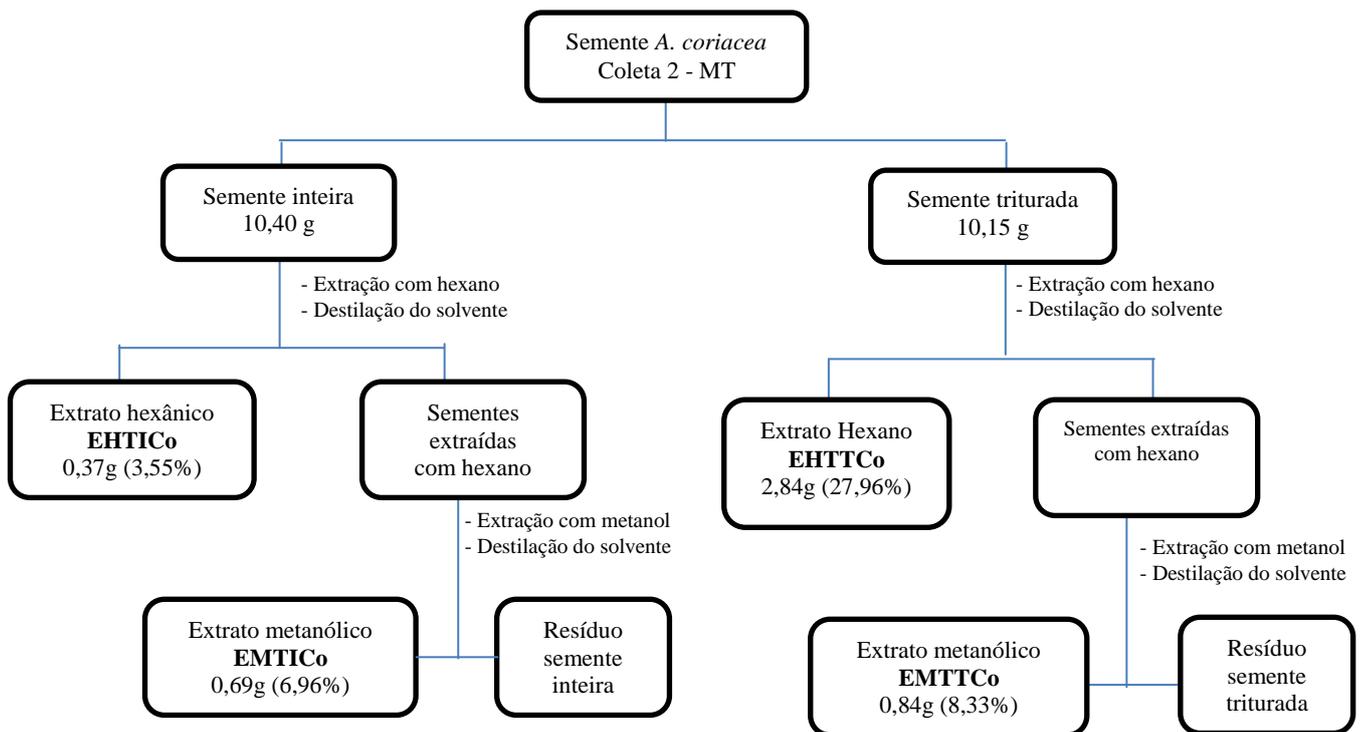


Esquema 1 - Obtenção dos extratos de *A. coriacea* - coleta 1

4.7.2. Coleta 2 – sementes *A. coriacea* MT

No processo de trituração das sementes em moinho de facas, notou-se a ocorrência de aquecimento do equipamento (30-45 °C), então a fim de constatar se esse evento altera o rendimento de extração e/ou os resultados de atividade larvica dos extratos, foram realizadas extração hexânica e metanólica em sementes trituradas e inteiras de *A. coriacea* (**Esquema 2**).

As sementes inteiras (10,40 g) e trituradas (10,15 g) foram extraídas em temperatura ambiente com hexano e posteriormente com metanol. Da extração de sementes inteiras, foram obtidos 0,37 g (3,55% rendimento) de extrato hexânico (**EHTICo**) e 0,69 g (6,96%) de extrato metanólico (**EMTICo**). Da extração de sementes trituradas, foram obtidos 2,84 g (27,96% rendimento) de extrato hexânico (**EHTTCo**) e 0,84 g (8,33%) de extrato metanólico (**EMTTCo**). Alíquotas dos quatro extratos foram encaminhadas para teste de atividade larvica frente *Aedes aegypti*.



Esquema 2 - Obtenção dos extratos de *A. coriacea* - coleta 2

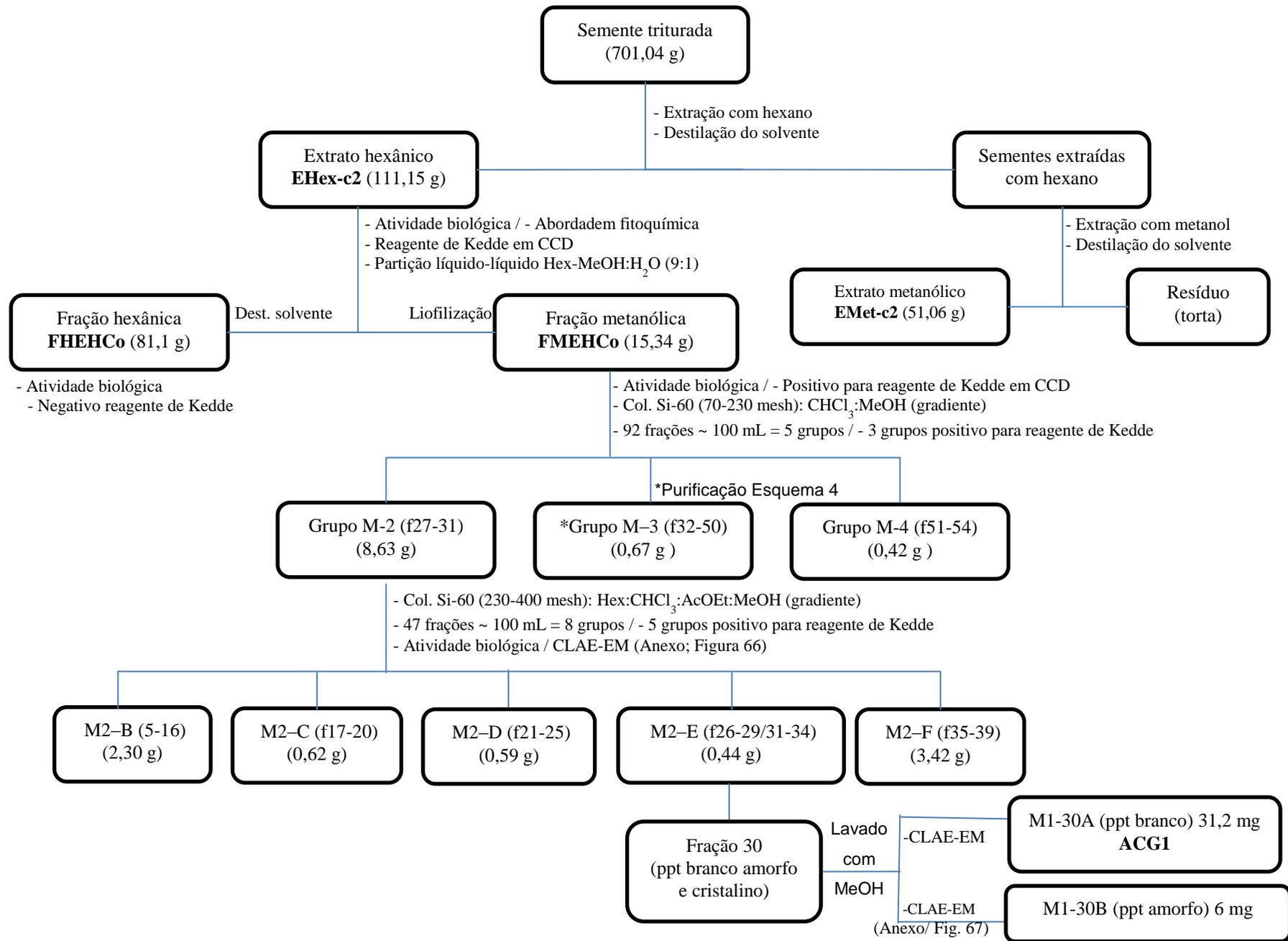
Após verificação do rendimento das extrações e dos resultados dos testes de atividade larvívora dos extratos, realizou-se a trituração das sementes restantes (701,04 g) e preparou-se os extratos totais hexânico e metanólico de sementes de *A. coriacea* utilizando-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Foram obtidos 207,07 g (29,53%) de extrato bruto hexânico (**EHex-c2**) e 51,06 g (7,28%) de extrato metanólico desengordurado com hexano (**EMet-c2**). Após testes de atividade biológica, os extratos hexânico (**Esquema 3**) e metanólico (**Esquema 5**) foram submetidos à partição líquido-líquido com hexano e MeOH-H₂O (9:1) e suas respectivas frações metanólicas foram submetidas à cromatografia em coluna com gel de sílica 60, utilizando-se como eluentes clorofórmio e metanol em ordem crescente de polaridade. As frações coletadas após evaporação dos solventes à pressão reduzida foram analisadas por CCDA e reunidas em grupos com base na semelhança de perfil observado.

Os grupos de subfrações foram submetidos a sucessivas recromatografias em coluna gel de sílica 60 (70-230 e 230-400 mesh) com gradiente de solventes, Sephadex LH-20. Os procedimentos para o fracionamento cromatográfico das subfrações analisadas estão representados nos **Esquemas 3-11**.

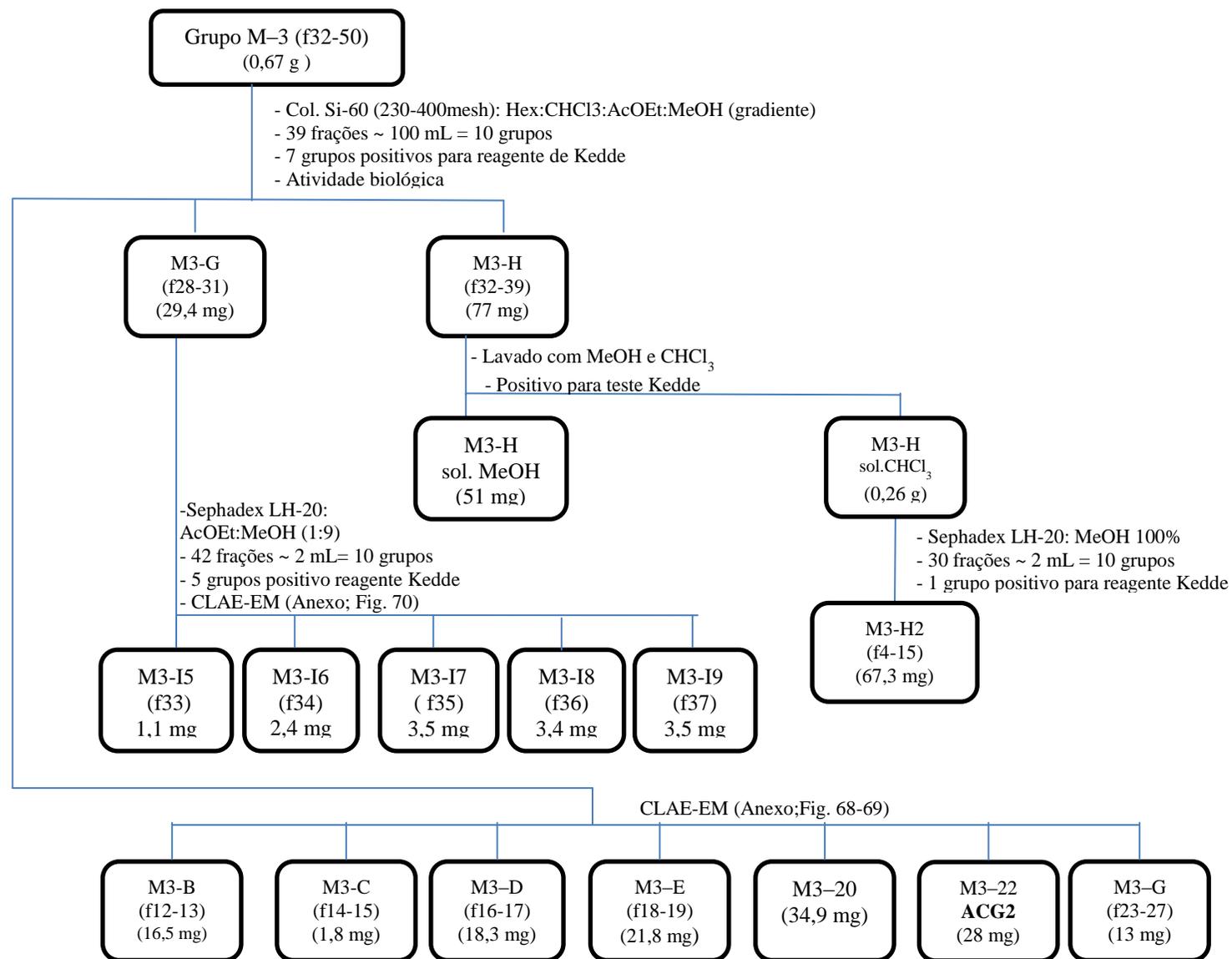
A purificação da fração metanólica (**FMEHCo**; 15,34 g) forneceu os grupos M-2, M-3 e M-4. De M-2, a fração 30 forneceu um precipitado branco amorfo que foi lavado com metanol, fornecendo as amostras M1-30A (**ACG1**, 31,2 mg) e M1-30B (6 mg) (**Esquema**

3). E de M-3 as frações M3-20 (34,9 mg) e M3-22 (**ACG2**, 28 mg) se apresentaram como sólidos brancos (**Esquema 4**).

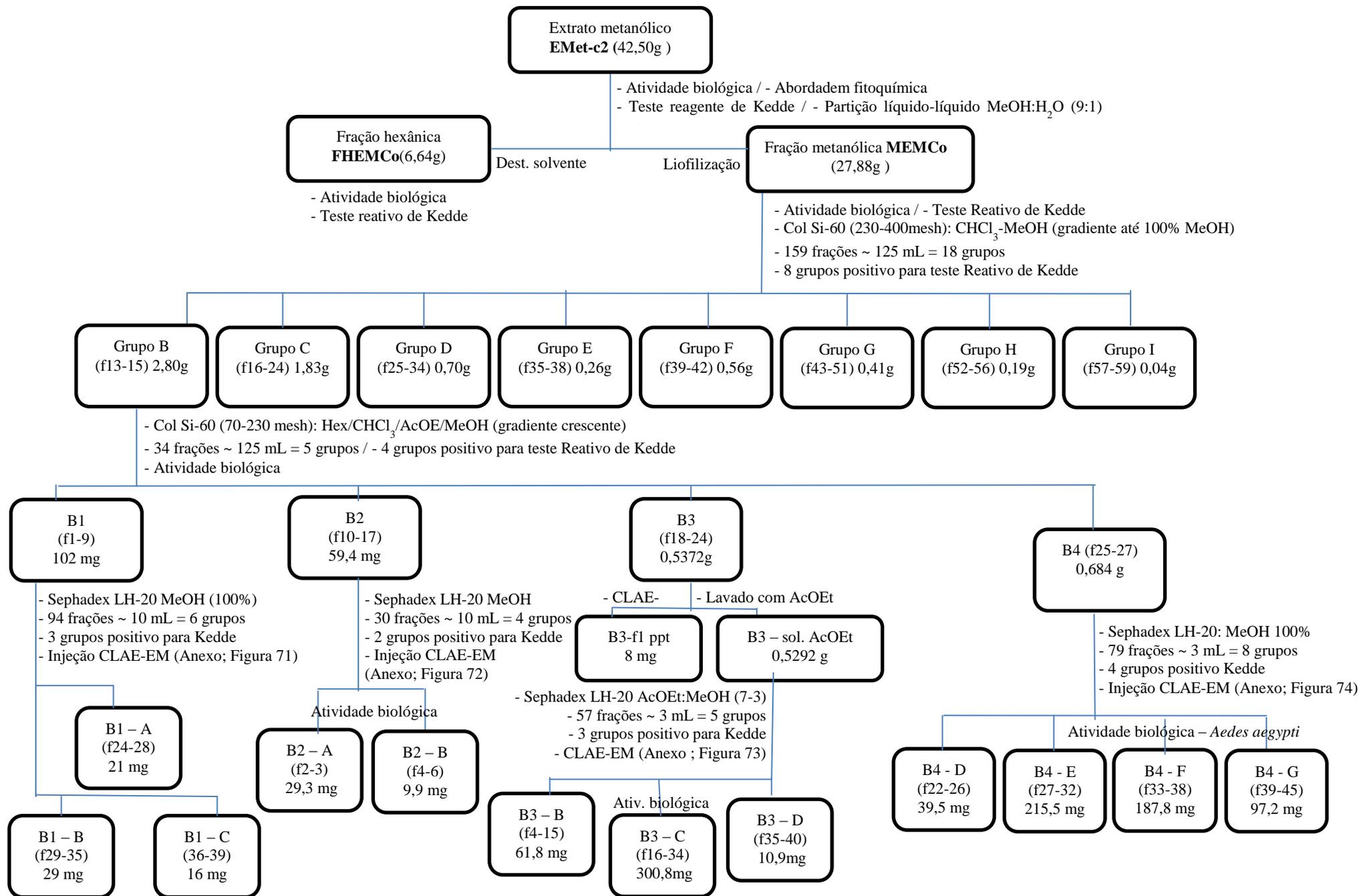
A purificação da fração metanólica (**FMEMCo**; 27,88 g) forneceu oito grupos (**Esquemas 5-11**). Do grupo B, a fração B3 apresentou precipitado branco graxo denominado B3-f1 (8 mg) (**Esquema 5**). Do grupo D, a fração D8 apresentou cristal incolor e foi encaminhado para teste de atividade larvicida em *Aedes aegypti* (**Esquema 7**). No grupo E, da fração E3 obteve-se um precipitado cristalino denominado E3-ppt (7 mg) (**Esquema 8**). Do grupo F, a fração F2-C apresentou um precipitado branco amorfo (**ACG3**; 0,41 mg) (**Esquema 9**). O grupo H forneceu dois sólidos amarelos graxos, ppt52-56C (1,7 mg) que foi encaminhado para teste de atividade biológica em *Aedes aegypti* e o ppt52-56M (2,2 mg) (**Esquema 11**). O cromatogramas das frações analisadas por CLAE-EM são encontrados em **ANEXOS (Figuras 66-82)**.



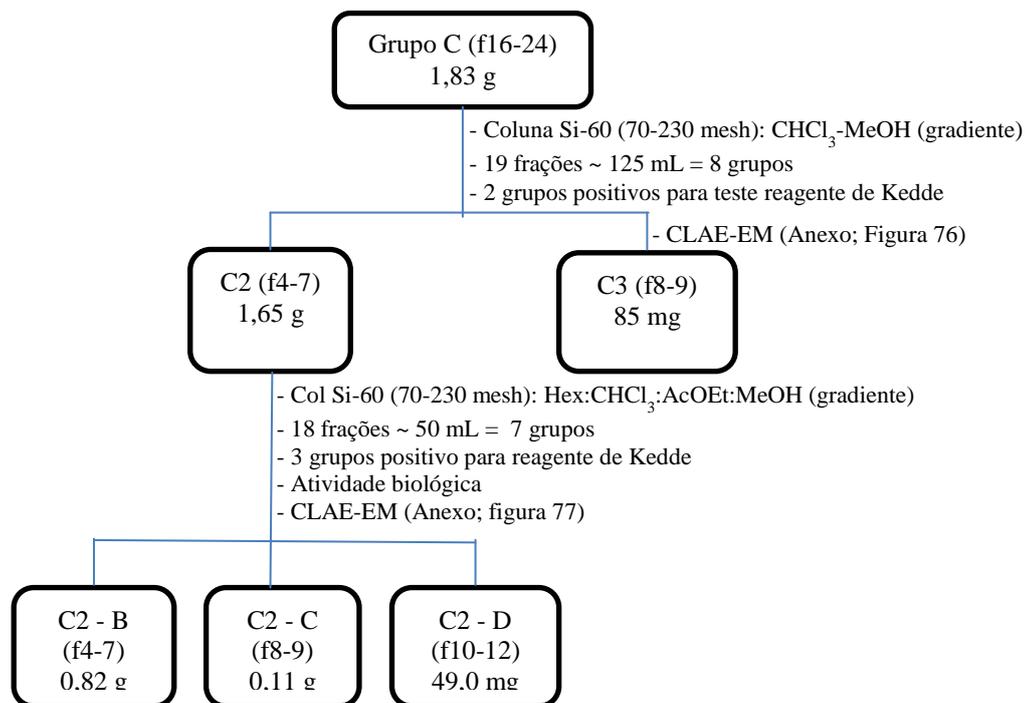
Esquema 3 - Purificação da fração metanólica (FMEHCo) do extrato hexânico de *A. coriacea* – Grupo M-2



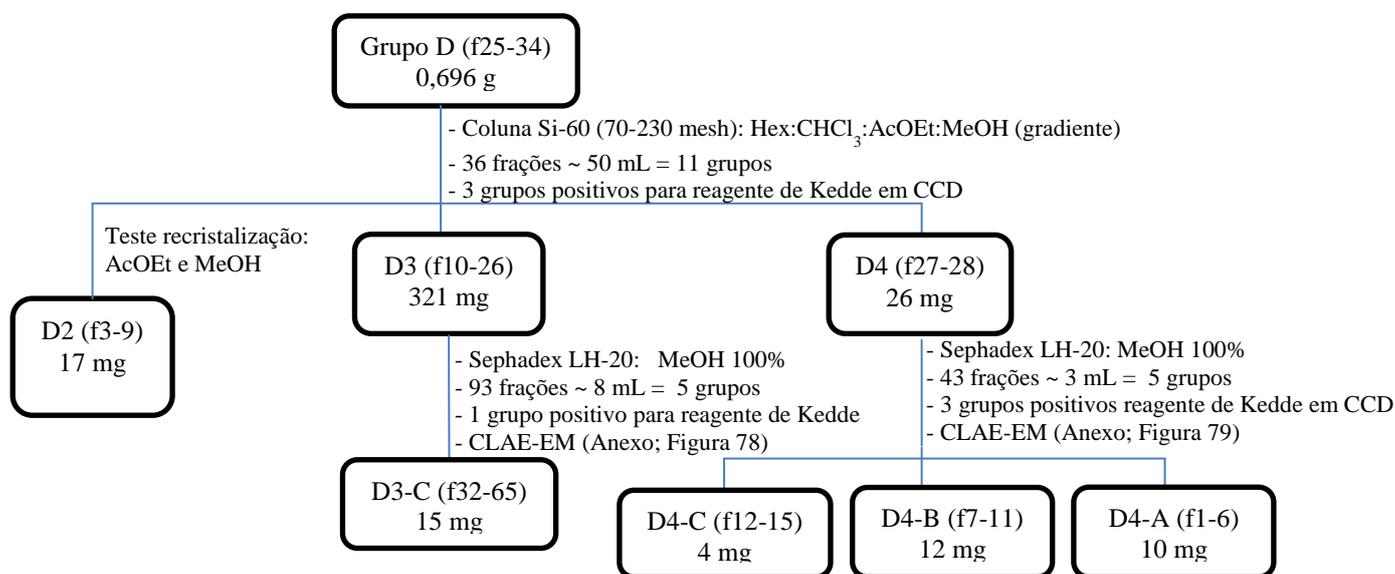
Esquema 4 - Purificação da fração metanólica (FMEHCo) do extrato hexânico de *A. coriacea* – Grupo M-3



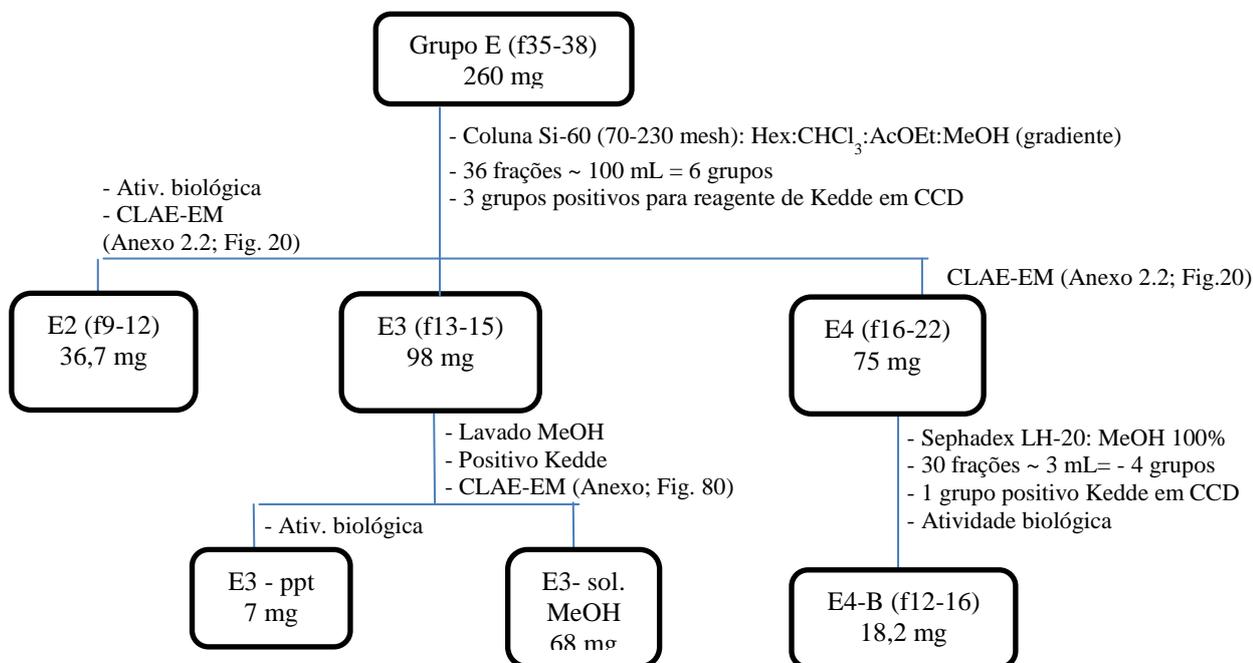
Esquema 5 – Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de *A. coriacea* – Grupo B



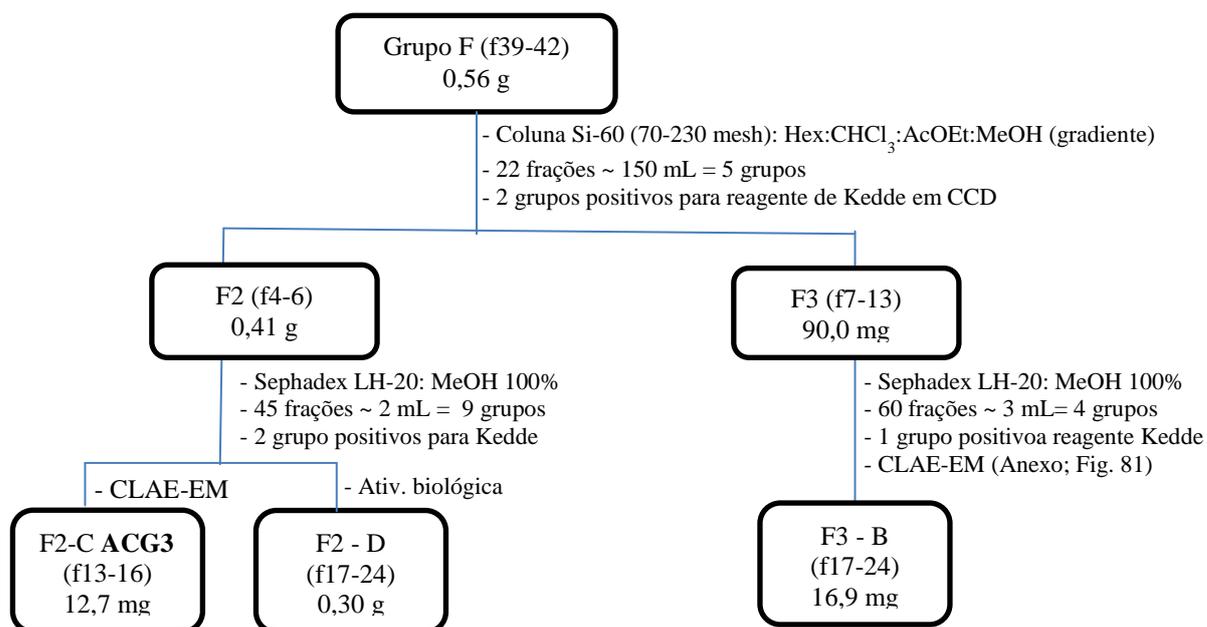
Esquema 6 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de *A. coriacea* – Grupo C



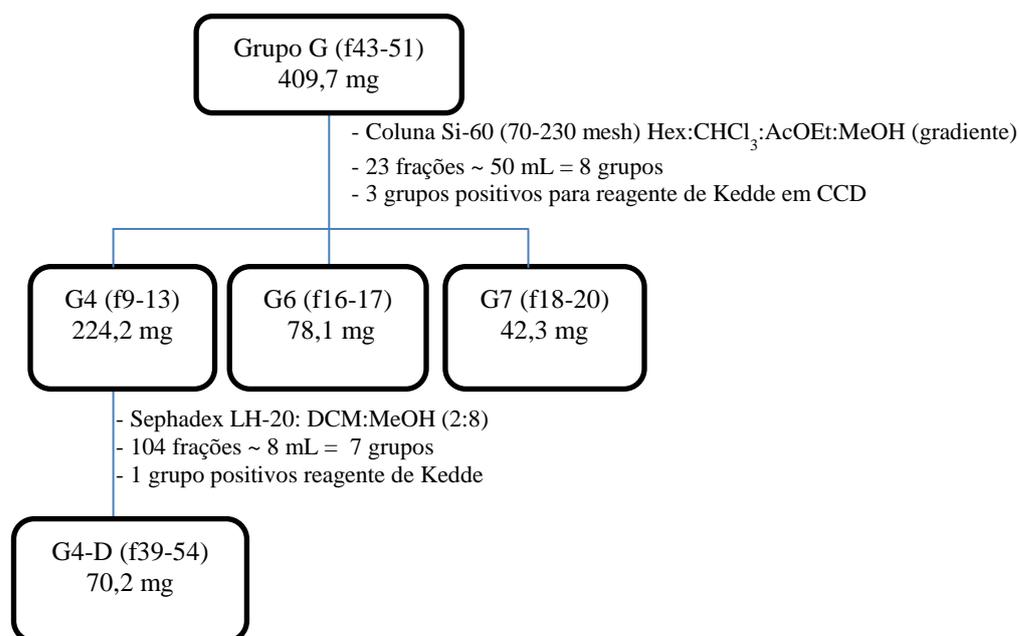
Esquema 7 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de *A. coriacea* – Grupo D



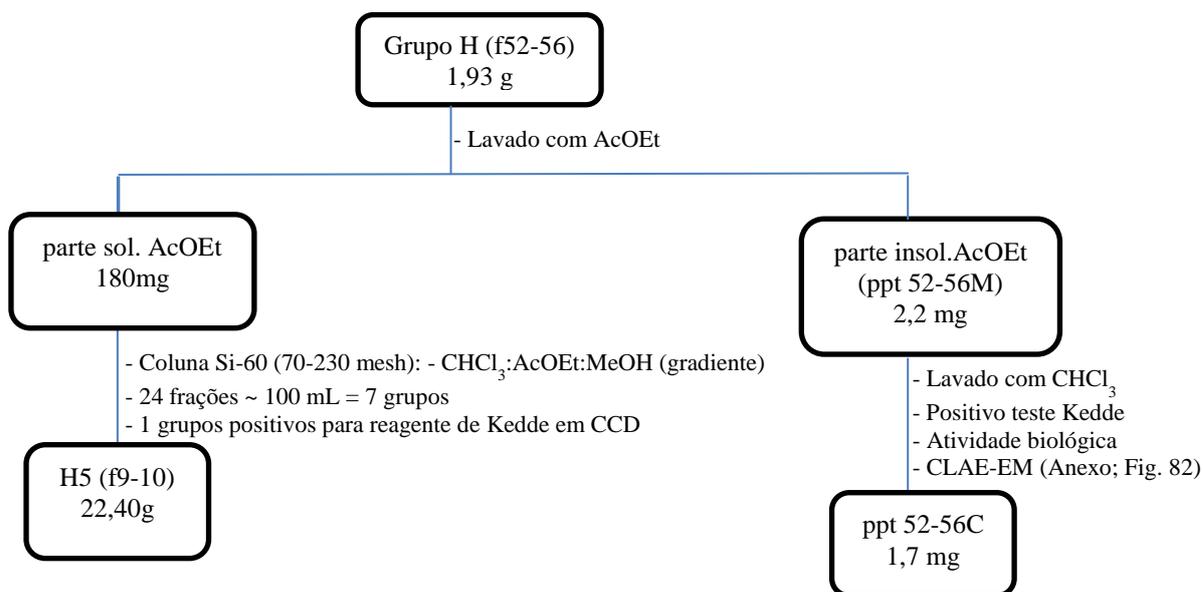
Esquema 8 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de *A. coriacea* – Grupo E



Esquema 9 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de *A. coriacea* – Grupo F



Esquema 10 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de *A. coriacea* – Grupo G



Esquema 11 - Purificação da fração metanólica (FMEMCo) do extrato metanólico de *A. coriacea* – Grupo H

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Prospecção fitoquímica

Nos ensaios de prospecção fitoquímica (**Quadro 6**), alcaloides e cumarinas foram identificados em ambos extratos testados de *Annona coriacea*. Os extratos metanólicos apresentaram presença de flavonoides, esteroides, taninos e antronas. Já triterpenoides foram identificados apenas no extrato hexânico de *A. coriacea*.

Quadro 6 – Prospecção fitoquímica de extratos de *A. coriacea*

Metabólitos especiais	<i>Annona coriacea</i>	
	Extrato hexânico (EHex-c2)	Extrato metanólico (EMet-c2)
Flavonoide	-	+
Alcaloide	+	+
Esteroides	-	+
Fenol simples	-	-
Tanino	-	+
Flavonóis	-	-
Flavonona	-	-
Flavononois	-	-
Xantona	-	-
Triterpenoide	+	-
Saponina	-	-
Catequina	-	-
Antraquinona	-	+ Antrona
Cumarina	+	+

As classes detectadas no ensaio de prospecção fitoquímica condizem com a literatura do gênero *Annona* e família Annonaceae (SIQUEIRA et al., 2007; CHEN & WU, 2001; SANTOS & SALATINO, 2000).

5.2. Atividade inseticida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*

Os resultados da avaliação da atividade inseticida dos extratos/frações das sementes de *A. coriacea* podem ser verificados na **Tabela 1** E os resultados para as frações e amostras purificadas estão descritos na **Tabela 2**. O agente solubilizante das amostras analisadas foi Tween20 a 2% em H₂O.

Tabela 1 – Atividade larvicida de extratos e frações de *A. coriacea* frente à *Aedes aegypti*

Espécie	Extrato/Fração	Sigla	Solvente solubilizante (2% em H ₂ O)	Concentração (ppm)	Mortalidade (%)
<i>Annona coriacea</i>	Extrato hexânico sem. inteira	EHTICo	Tween20	1000	100
	Extrato metanólico sem. inteira	EMTICo	DMSO	100	100
	Extrato hexânico sem. triturada	EHTTCo	Tween20	100	98,75
	Extrato metanólico sem. triturada	EMTTCo	DMSO	100	100
	Extrato hexânico	EHex-c2	Tween20	100	100
	Fração hexânica	FHEHCo	Tween20	1000	92,5
	Fração metanólica	FMEHCo	DMSO	10	100
	Extrato metanólico	EMet-c2	DMSO	200	100
	Fração hexânica	FHEMCo	Tween20	1000	40
	Fração metanólica	FMEMCo	DMSO	100	58,75

* tempo de exposição 5 horas; # tempo exposição 10 horas

Tabela 2 - Atividade larvicida de frações e amostras purificadas de *A. coriacea* frente à *Aedes aegypti*

Espécie	Extrato	Amostra	Concentração (ppm)	Mortalidade (%)
<i>Annona coriacea</i>	EHex-c2	M2-B	253,12	75
		M2-C	10	100
		M2-D	10	100
		M2-E	19	100
		M2-F	10	100
		M1-30A*	19	100
		M3-C	11	88,8
		M3-D	53	97,5
		M3-E	20	100
		M3-22*	195	75
	M3-G	216	66,25	
	EMet-c2	B1	10	100
		B1-B	1,8	100

	B2	80	100
	B2-A	7	73,75
	B2-B	3,75	48,75
	B3	18	100
	B3-C	15	100
	B4	10	100
	B4-E	2,75	100
	B4-F	1,8	100
	B4-G	1,4	100
	C2-B	14	100
	C2-C	7	86,25
	C2-D	23	100
	D2	95	97,5
	D3	42	98,75
	D4	5	100
	D8	40,62	0
	E2	20	100
	E3	7	82,5
	E4	8	78,75
	F2-D	5	86,25
	ppt52-56C	4	0

* Frações contendo acetogeninas elucidadas.

O extrato hexânico de *A. coriacea* obtidos de sementes coletadas em MS apresentou (**EHex-c1**) atividade inseticida de 100% mortalidade das larvas com 100 ppm em tempo de exposição de 5 horas, já o extrato metanólico (**EMHDCo**) necessitou de maior concentração (1000 ppm) para eliminar as larvas.

Os extratos hexânicos (**EHex-c2**) e metanólicos (**EMet-c2**) obtidos de sementes coletadas de MT também apresentaram atividade larvicida com 100% de mortalidade das larvas necessitando de 100 ppm e 200 ppm respectivamente, ambos com tempo de exposição de 24h. Esses resultados de atividade larvicida encontrados para os extratos de *A. coriacea* foram mais ativos que os encontrados em *A. crassiflora* e também são similares aos encontrados na literatura do gênero *Annona* (MAGADULA et al., 2009; SANT'ANA et al., 2005; HENAO et al., 2007).

Devido a diferença no potencial inseticida de **EHex-c1** e **EHex-c2** em relação ao tempo de exposição sobre as larvas, selecionou-se o extrato hexânico (**EHex-c1**) para obtenção de perfil cromatográfico via CLAE (**Tópico 5.3**).

A fração metanólica (**FMEHCo**) do extrato hexânico apresentou alta atividade larvicida, eliminando as larvas com apenas 10 ppm, isto é, necessitou de 90% menos concentração da amostra para eliminar a mesma percentagem de mortalidade de larvas (100%) do extrato bruto, sugerindo que com a purificação cromatográfica ocorre um aumento na atividade larvicida.

Na fração metanólica (**FMEMCo**) do extrato metanólico verificou-se o mesmo comportamento, no qual apresentou 58,75% de mortalidade das larvas com 100 ppm, mais ativo que o extrato bruto (**EMet-c2**).

Das frações de *A. coriacea* verificou-se que diversas amostras apresentaram resultados de atividade larvicida similares, independentemente do extrato de origem trabalhado, como as amostras dos grupos M2, M3, B1, B3, B4, C2 e E2 que se apresentaram muito ativas com 100% de mortalidade das larvas necessitando de 10 a 20 ppm de concentração (**Tabela 2**). Esses resultados obtidos foram próximos do apresentado pela acetogenina rolinicina de *A. crassiflora* testadas frente à *Aedes aegypti* (LIMA, 2005).

Desses grupos ativos, foi elucidada uma ACG *mono*-THF α - α -dihidroxiada (amostra M3-22) e outra *bis*-THF adjacente α - α -dihidroxiada (amostra M1-30A), ambas com grupo hidroxila na cadeia alifática e subunidade do tipo γ -lactona α,β -insaturada (elucidação discutida em **Tópico 5.5**), no qual os resultados de atividade larvicida frente à *A. aegypti* encontrados (**Tabela 2**) corroboram com dados de estrutura-atividade encontrados na literatura relacionado ao potencial citotóxico das ACGs (MCLAUGHLIN et al., 1990; 1999), visto que a ACG *bis*-THF apresentou maior potencial larvicida (100% mortalidade com 19 ppm) que a ACG *mono*-THF (75% de mortalidade com 195 ppm); e ainda para a ACG *bis*-THF (M1-30A) a literatura destaca sua alta seletividade e excelente atividade citotóxica (um milhão de vezes mais ativa que o controle Adriamicina) confirmada em células tumorais humanas (MCLAUGHLIN et al., 1998).

Destas, as amostras purificadas do extrato metanólico apresentaram-se mais ativas que a fração metanólica trabalhada (**FMEMCo**), comprovando que a purificação concentra as ACGs, aumentando a atividade larvicida frente à *Aedes aegypti*.

No entanto, dessas amostras as que foram purificadas do extrato hexânico apresentaram-se com a mesma atividade larvicida que a fração metanólica trabalhada (**FMEHCo**), mostrando que apesar de maior purificação, as ACGs presentes nessas amostras continuam ativas na mesma concentração.

Em outras frações purificadas de *A. coriacea* apresentaram excelente atividade larvicida frente à larvas de *Aedes aegypti*, como B1-B, B4-E, B4-F, B4-G e D4 que apresentaram 100% de mortalidade das larvas necessitando de apenas de 1,8, 2,75, 1,8, 1,4 e 5 ppm respectivamente. E notou-se que todas essas são do extrato metanólico de *A. coriacea*. Esses resultados obtidos são melhores do que o apresentado pela acetogenina Rolinicina (LIMA et al., 2005).

A análise dos resultados de atividade larvicida frente à *Aedes aegypti* dos extratos/frações de *A. coriacea* confirma que apesar da indicação de presença de outros metabólitos secundários nos extratos avaliados na prospecção fitoquímica (**Tópico 5.1**), o estudo fitoquímico biomonitorado comprovou que a purificação de amostras que contenham ACGs (positivas ao reagente de Kedde) aumenta a atividade larvicida (mais de 90%), comprovando que são as ACGs as responsáveis pelo imenso potencial biocida da espécie *Annona coriacea*.

5.3. Perfil cromatográfico via CLAE

Foram muitas as tentativas na obtenção de perfil cromatográfico para o extrato bruto hexânico de sementes de *A. coriacea* (**EHex-c1**) utilizando colunas cromatográficas analíticas C4, CN e C18 com detectores ELSD e EM.

Foi obtido um bom perfil cromatográfico do extrato hexânico de *A. coriacea* (**EHex-c1**) com a coluna C18 (Varian) em CLAE-ELSD com fluxo de 1,0 mL/min (**Figura 8**) e em CLAE-EM com fluxo de 0,5 mL/min (**Figura 9**) em sistema isocrático de eluição ACN:DCM (70:30) acidificado com 0,1% TFA. No qual apesar de apresentar sobreposição de alguns picos no início do cromatograma, proporcionou melhor separação e resolução dos picos entre todos os outros sistemas testados.

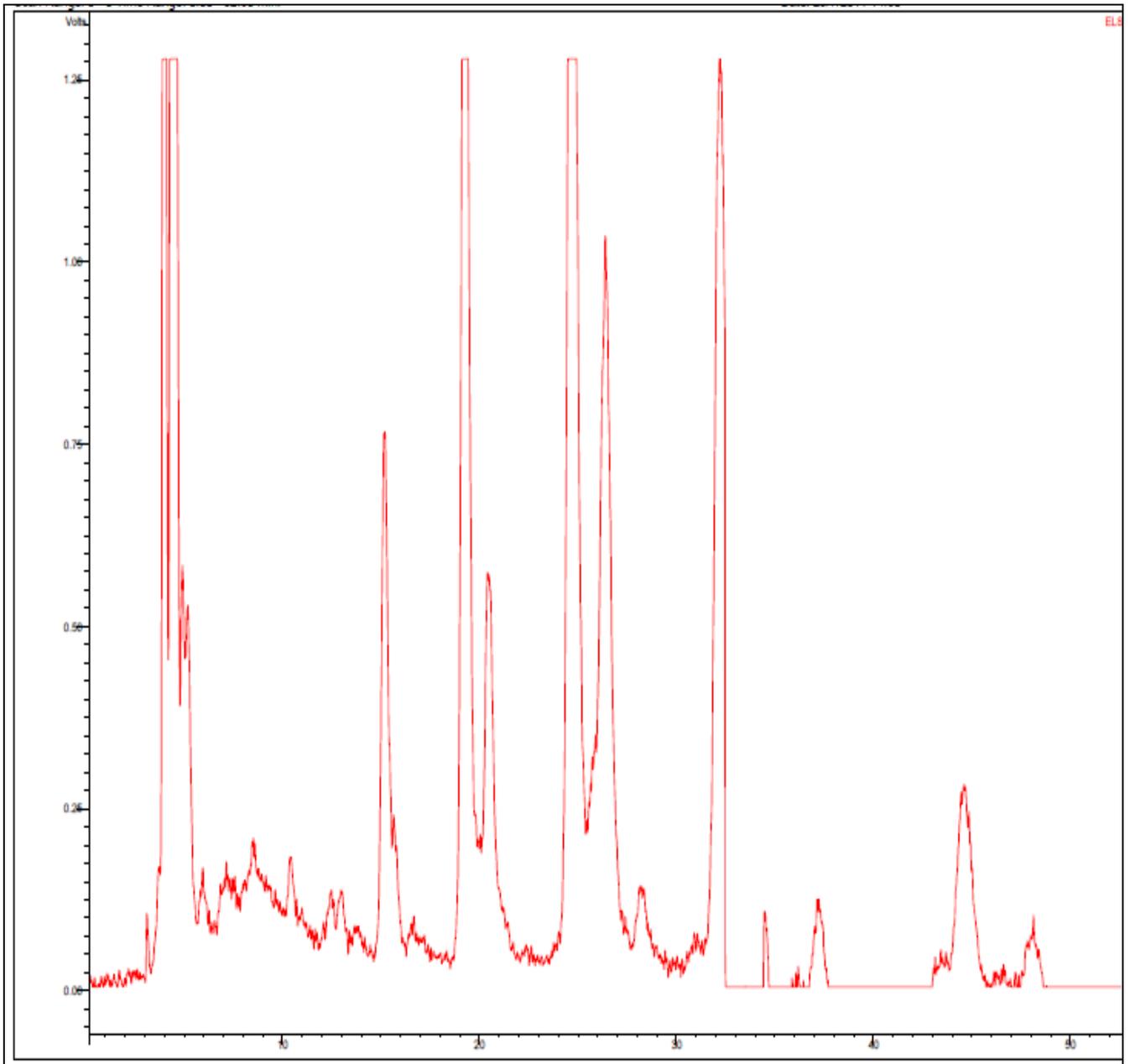


Figura 8 – Perfil cromatográfico do extrato hexânico de *A. coriacea* (**EHex-c1**) em modo isocrático com ACN:DCM (7:3) + 0,1% TFA com fluxo de 1,0 mL/min em CLAE-ELSD.

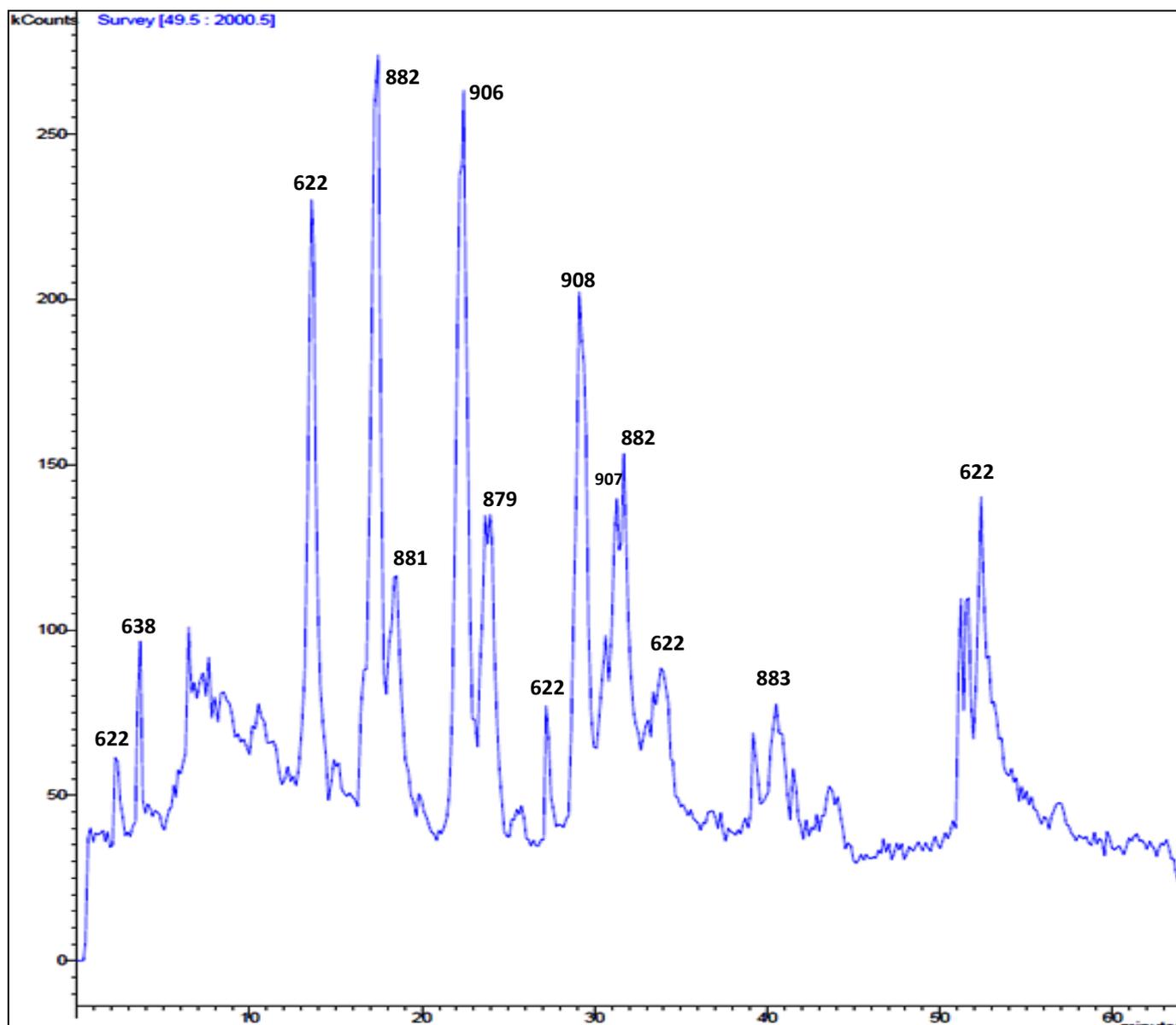


Figura 9- Perfil cromatográfico do extrato hexânico de *A. coriacea* (**EHex-c1**) com valores de m/z em modo isocrático com ACN:DCM (7:3) + 0,1% TFA, fluxo de 0,5 mL/min em CLAE-EM e faixa de m/z 50-2000.

Pôde-se verificar que os cromatogramas de **EHex-c1** (**Figura 8 e 9**) apresentaram-se semelhantes com picos majoritários exibindo o mesmo perfil, no entanto com o detector EM, houve aparecimento de alguns picos em torno de 45 min e ausência dos picos agrupados nos minutos iniciais do cromatograma.

Com o detector EM foi possível verificar vários picos com alta massa molecular ($< m/z$ 600) presentes no cromatograma da amostra (**Figura 9**). Dos picos detectados, apenas os com razão m/z 661 e 645 apresentaram fragmentações-padrão de acetogeninas (ACGs) e sendo respectivamente m/z 638 e 623 adicionados ao íon sódio $[M+Na]^+$, esses valores de massa molecular e as fragmentações verificadas são típicos de

ACGs encontradas na família Annonaceae (McLAUGHLIN et al., 1996; YU et al., 1994). Os valores de massa molecular superiores à razão m/z 700 são típicos de triacilgliceróis (TAGs) adicionados ao ion sódio $[TAG + Na]^+$ (MURPHY et al., 2001; CAMPOS, 2010; GROSS & HAN, 1994).

No entanto, com a realização das análises para os extratos hexânico de *A. coriacea* (**EHex-c2**) verificamos problemas com a coluna analítica C18 da marca Varian, pois não estava ocorrendo reprodutibilidade nos cromatogramas, sendo assim houve a necessidade de obtenção de nova coluna analítica C18.

Então, com nova coluna analítica C18 Gemini da marca Phenomenex foi injetado o extrato hexânico de *A. coriacea* (**EHex-c1**) em CLAE-EM mantendo-se os mesmos parâmetros do detector em modo isocrático de ACN:DCM (7:3) acidificado com TFA 1% e verificou-se que o perfil cromatográfico da amostra foi muito diferente do resultado obtido anteriormente (**Figura 10**).

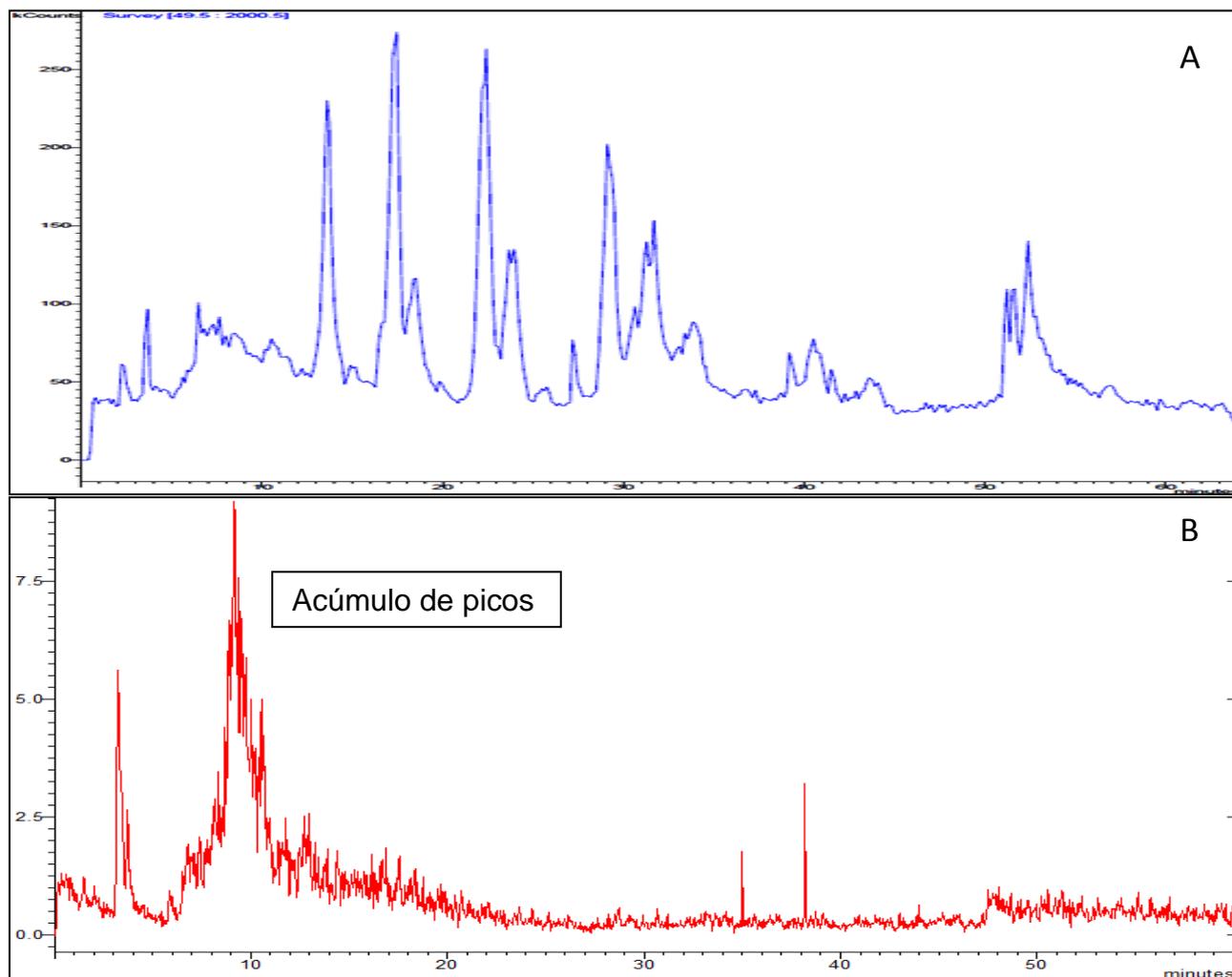


Figura 10 – Perfil cromatográfico de **EHex-c1** obtido em coluna analítica C18 Varian (**A**) e C18 Gemini (**B**) com sistema isocrático ACN:DCM (7:3) + 0,1% TFA, $f = 0,5$ mL/min e faixa de m/z 50-2000.

Com essa brusca diferença no perfil cromatográfico, foi necessário à realização de novas tentativas de obtenção de perfil de **EHSC** com a coluna analítica C18 Gemini. No qual foram testados exaustivamente 49 sistemas de composição de fase móvel (**Quadro 5**), no entanto sem obtenção de cromatograma representativo para verificação de perfil cromatográfico do extrato hexânico de *A. coriacea* (**EHex-c1**) a fim de determinar presença de ACGs e analisar distinções entre os extratos analisados.

5.4. Análise química e perfil cromatográfico das frações

As frações das espécies trabalhadas foram injetadas em CLAE-EM-ESI de baixa resolução utilizando MeOH:H₂O (85:15) acidificada com 0,1% TFA com fluxo de 0.5 mL/min na coluna analítica C18 Gemini. Essa fase móvel é descrita na literatura para verificação de pureza de amostras de ACGs (LAPRÉVOTE, et al., 1998; CAVÉ et al., 1997b).

Os cromatogramas dessas amostras de *A. coriacea* (**ANEXO; Figuras 66-82**) indicaram de maneira geral, que apesar das etapas de purificação cromatográfica (**Esquemas 3-11**), foram detectados picos característicos de triacilgliceroís (TAGs) e picos com massa molecular e fragmentações-padrão características de ACGs nos mesmos.

5.4.1. Extrato hexânico (EHex-c2) de *A. coriacea*

a) Grupo M-2: Nos cromatogramas das amostras M2-B a M2-F (**Anexo; Figuras 66-67**) foram detectados muitos picos característicos de ACGs com razão m/z 622, 604, 606 e 580.

O cromatograma da amostra M1-30A em CLAE-EM-ESI de baixa resolução (**Figura 11**) apresentou dois picos majoritários característicos de ACGs como mistura de isômeros de razão m/z 623,3 (pico 1 detectado em 6,27min.) e 623,2 (pico 2 – majoritário em 57,62 min.).

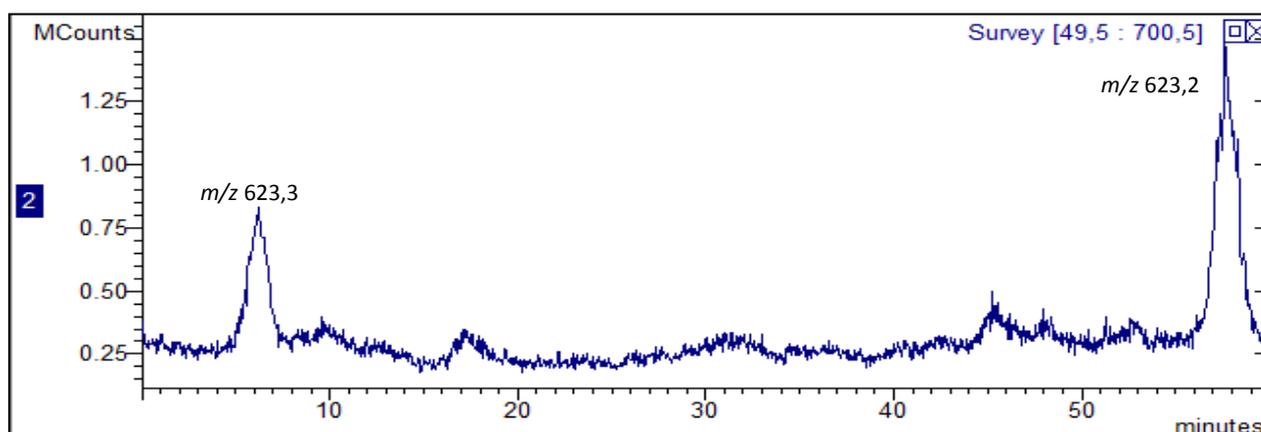


Figura 11 – Cromatograma de **M1-30A** obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução com modo de ionização positivo.

Esta amostra também foi analisada em CLAE-EM-ESI de alta resolução (**Figura 12**) obtendo perfil similar, com picos de razão m/z 623,48895 detectado em 19,9 min. (pico 1) e 623,49066 em 40,1 min. (pico 2 – majoritário).

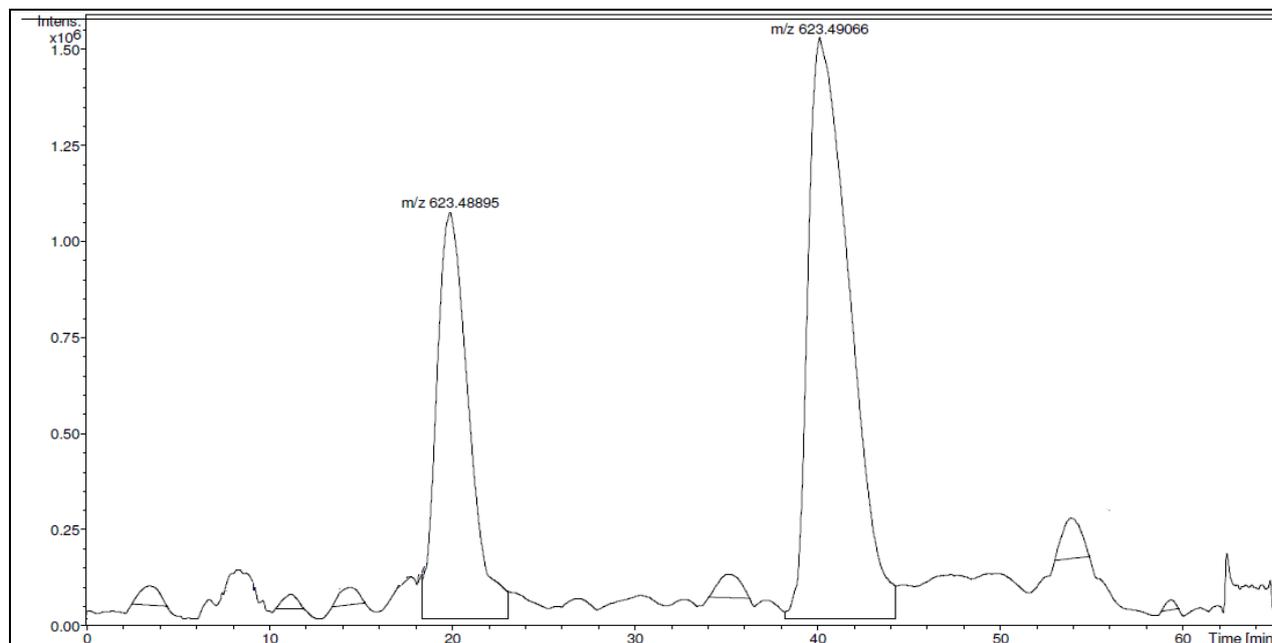


Figura 12 – Cromatograma de **M1-30A** obtido em CLAE-EM-ESI alta resolução com modo de ionização positivo.

Visto que essa amostra apresentou ótima atividade larvícida (**Tabela 2**) e mostrou possibilidade espectrométrica devido à relativa pureza verificada nos cromatogramas (**Figura 11 e 12**), esta foi estudada, sendo discutida no **Tópico 5.5**.

b) Grupo M-3: Nos cromatogramas das amostras M3-B a M3-E e M3-G6 à M3-G9 (**Anexo; Figuras 68-69**) foram detectados picos característicos de ACGs com razão m/z 622, 594, 612, 596, 638, 628, 656 e 640.

O cromatograma da amostra M3-22 obtido em CLAE-EM-ESI de baixa resolução (**Figura 13**) apresentou picos característicos de ACGs como mistura de isômeros de razão m/z 613,3 (pico 1 detectado em 22,84 min.) e 613,3 (pico 2 - majoritário em 26,94 min).

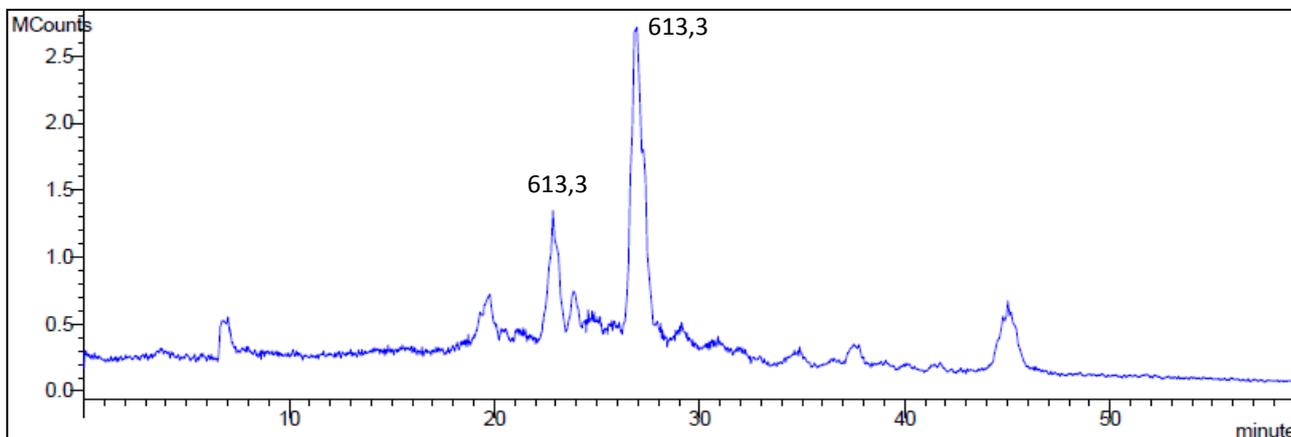


Figura 13 – Cromatograma de M3-22 obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução com modo de ionização positivo.

Esta amostra também foi analisada em CLAE-EM-ESI de alta resolução (**Figura 14**) obtendo perfil similar com os picos de razão m/z 613,46926 em 32,8 min (pico 1) e o m/z 613,46960 em 40,2 min. (pico 2 – majoritário).

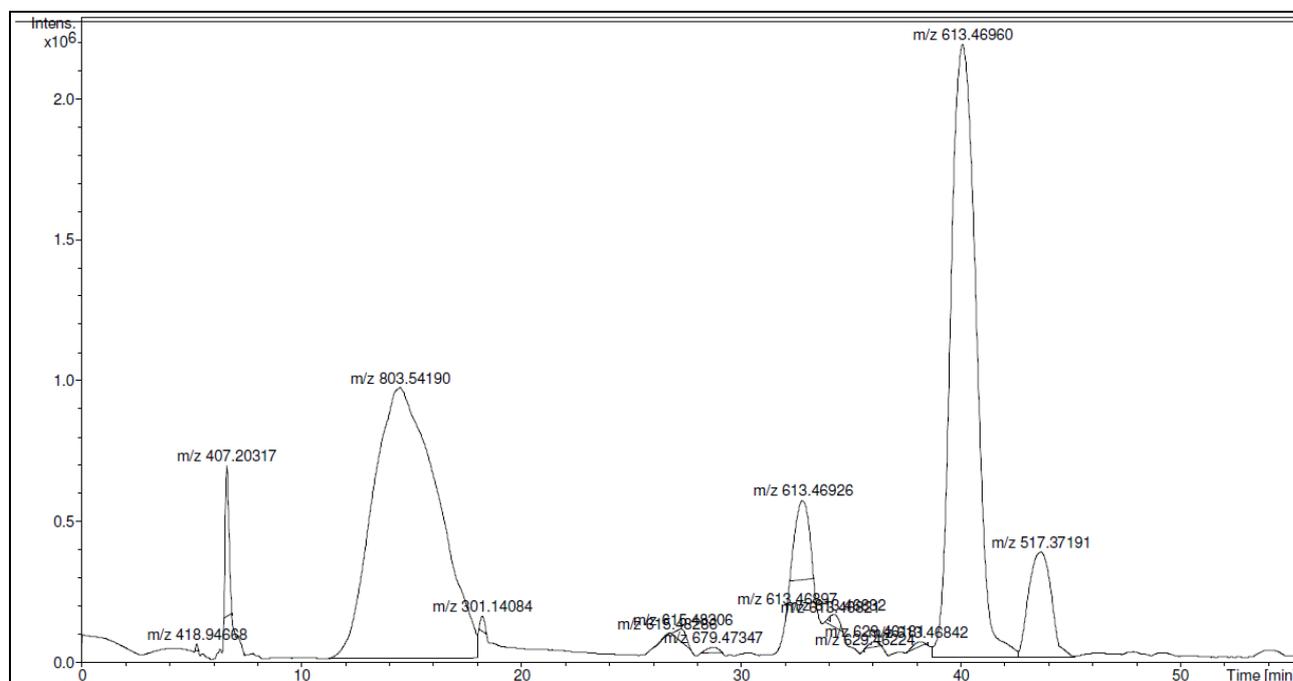


Figura 14 – Cromatograma de M3-22 obtido em CLAE-EM-ESI alta resolução

A amostra (**Figura 13 e 14**) mostrou possibilidade de estudo espectrométrica, sendo discutida no **Tópico 5.5**.

5.4.2. Extrato metanólico (EMet-c2) de *A. coriacea*

a) Grupo B: Nos cromatogramas das amostras B1-A, B1-B e B1-C foram detectados picos característicos de ACGs com razão m/z 638, 596, 622 e 606. Nos de B2-A e B2-B verificou-se os de m/z 606, 638, 604, 596, 638, 622 e 581. Os grupos B3-B, B3-C e B3-D com picos detectados de m/z 622, 650 e 596, nos grupos B3-C foram detectadas m/z 622

e 596. E para os grupos B4-E, B4-F e B4-G foram verificados picos com m/z 638, 596, 622. Apenas o cromatograma da amostra B3-f1 apresentou maior purificação e confirmou a presença de picos majoritários de ACGs como mistura de isômeros com razão m/z 622. Cromatogramas das amostras em **ANEXO; Figuras 71-75**.

b) Grupo C: No cromatograma da amostra C3 foram detectados picos característicos de ACG com razão m/z 612, 638, 596 e 622 e nas amostras C2-C e C2-D os com razão m/z 612, 638, 596, 622 e 640. Cromatogramas das amostras em **ANEXO; Figuras 76**.

c) Grupo D: No cromatograma da amostra D3-C foram detectados picos característicos de ACGs com razão m/z 638 e 620 e nas amostras D4-A, D4-B e D4-C foram detectados picos com razão m/z 640 (comum entre os três) e m/z 596, 612, 638. Cromatogramas das amostras em **ANEXO; Figuras 78-79**.

d) Grupo E: Nos cromatogramas de E2, E3-A, E3-B e E4 foram detectados picos característicos de ACGs com razão m/z 622, 620, 638, 596 e 640. Cromatogramas das amostras em **ANEXO; Figuras 80**.

e) Grupo F: O grupo F3-B apresentou picos característicos de ACGs com m/z 640, 628, 636, 596 e 638 (ANEXO; Figuras 81).

O cromatograma da amostra F2-C obtido em CLAE-EM-ESI de baixa resolução (**Figura 15**) apresentou picos majoritários de ACGs como mistura de isômeros de razão m/z 613, 3 (pico 1 detectado em 24,43 min.) e 613, 3 (pico 2 – majoritário detectado em 29,19 min).

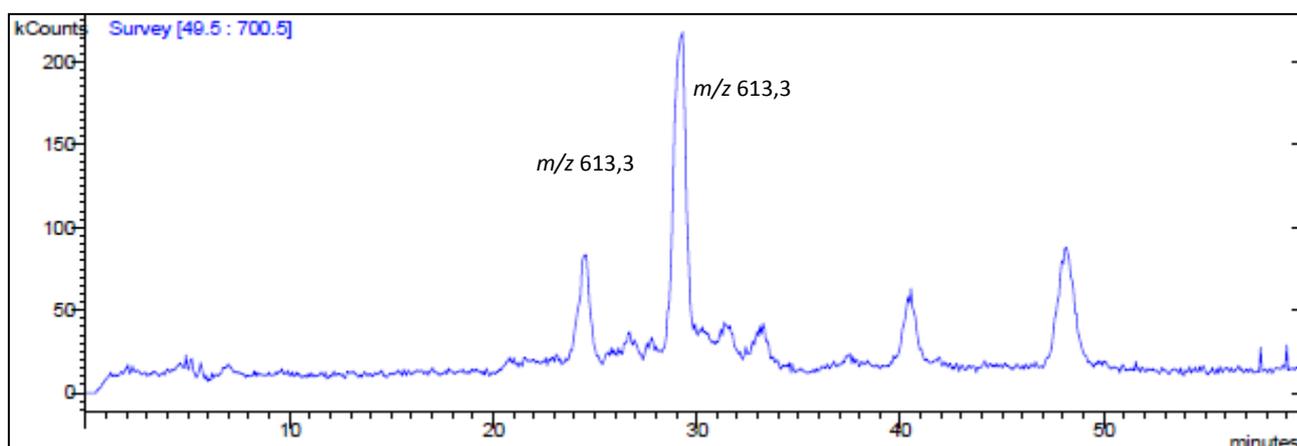


Figura 15 – Cromatograma de F2-C em CLAE-EM-ESI baixa resolução com modo de ionização positivo

Tendo em vista a relativa pureza desta amostra confirmada no cromatograma (**Figura 15**), esta foi estudada espectrometricamente, sendo discutida no **Tópico 5.5**.

f) Grupo H: No cromatograma da amostra ppt52-56C foram verificados picos de ACGs com m/z 558, 612 e 628 e para ppt52-56M foi verificado apenas um pico majoritário de ACG com m/z 558 (**ANEXO; Figura 82**). No entanto, mesmo com pureza considerada e a presença de ACGs, a amostra testada ppt52-56C não apresentou atividade biológica (**Tabela 2**).

Através dessas análises do perfil cromatográfico via CLAE-EM-ESI das amostras de *A. coriacea* verificaram-se diversos picos característicos de ACGs com mesma massa molecular, destas as potencialmente ativas frente à *Aedes aegypti* foram detectados picos com razão m/z 622, 604, 606, 612, 638 e 596 comuns entre os extratos trabalhados.

Uma correlação entre a atividade larvicida e as massas moleculares das ACGs foi verificadas nas frações ativas trabalhadas. No entanto, não é possível fazer uma correlação exata da atividade biológica com fórmula molecular/classe das ACGs, pois para uma determinada massa molecular podem ser encontrados diversos tipos de ACGs em forma isomérica, como para m/z 638 no qual são encontrados mais de 64 ACGs de diferentes classes (MCLAUGHLIN et al., 1996; BERMEJO et al., 2005).

5.5. Elucidação estrutural de acetogeninas de *A. coriacea*

5.5.1. Substância ACG1 (amostra M1-30A)

A amostra M1-30A, foi obtida como um sólido branco amorfo que reagiu positivamente quando revelada com o reagente Kedde em CCD. Essa amostra ao ser injetada em equipamento CLAE-EM-ESI baixa resolução, forneceu um cromatograma que apresentou dois picos, o primeiro em 6,27 minutos e o segundo em 57,62 minutos, sendo este último majoritário na fração (**Figura 11**). Na análise do espectro de massas de cada um desses picos notou-se que ambos apresentavam o mesmo íon molecular na razão m/z 622,3 (**Figuras 12**). Portanto, a partir dessa análise foi possível verificar que a amostra M1-30A, era composta por uma mistura de isômeros. Com o auxílio das diversas técnicas espectrométricas disponíveis, como as análises por RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D), IV e massas de alta e baixa resolução foi possível propor a estrutura que corresponde a substância majoritária, codificada como **ACG1**, dentro da amostra M1-30A.

Pelo espectro na região do infravermelho (IV) (**Figura 16**) foram observadas bandas de absorção em $\nu_{\text{máx}}$ 3.433 cm^{-1} estiramento O-H, 2.921 e 2.851 cm^{-1} (ν_{s} CH_3 e

CH₂ alquílicos), 1.748 cm⁻¹ estiramento da carbonila de éster (O-C=O), 1.655 cm⁻¹ estiramento de dupla ligação α,β-insaturada, 1.464, 1.371 cm⁻¹ de deformação angular (δ_sCH₂ e CH₃) e 1.052 cm⁻¹ de deformação axial C-O.

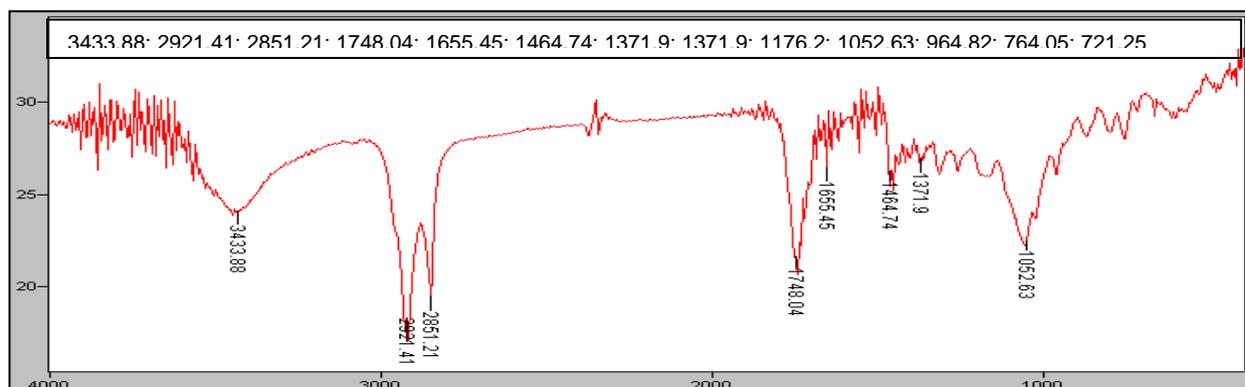


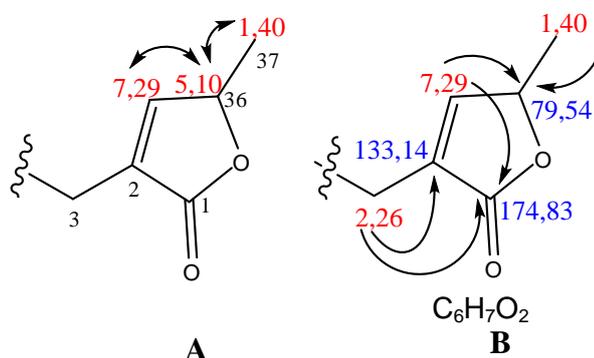
Figura 16 – Espectro na região do infravermelho (IV) de ACG1 em pastilha KBr.

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 20**) mostrou vários sinais na região entre δ_H 0,91-2,26 referentes aos hidrogênios metílicos e metilênicos, na região entre 3,42-3,95 ppm relativos hidrogênios carbinólicos, além de um multiplete em 5,10 ppm e um singlete em 7,29 ppm. Associando esses dados às informações obtidas pelo mapa de contornos HMQC (**Figura 23**), foram verificados os acoplamentos diretos deste singlete em δ_H 7,29 ao um carbono vinílico em δ_{CH} 150,89 e do multiplete em δ_H 5,10 ao um carbono carbinólico em δ_{CH} 79,54 correspondentes ao C-35 e C-36, respectivamente (**Tabela 3**).

Com o auxílio do espectro de ¹³C-DEPT-Q (**Figura 22**), identificou-se o sinal do outro carbono vinílico centrado em δ_C 133,14, o qual foi atribuído ao carbono C-2; outros sinais no DEPT-Q, evidenciaram a presença de outro carbono quaternário de carbonila em δ_C 174,83 (C-1) e outro em campo alto δ_{CH₃} 17,93 relativo a uma metila bastante desblindada.

O mapa de contornos gCOSY [¹Hx¹H] (**Figura 25**), confirmou a conexão da metila em δ_{CH₃} 17,93 (C-37) ao carbono carbinólico em δ_{CH} 79,54 (C-36), por isso seu maior deslocamento, pelo acoplamento vicinal entre δ_H 1,40 (*d*, 6,85 Hz, H-37) e 5,10 (H-36); assim como, a proximidade dos núcleos dos hidrogênios em δ_H 5,10 e 7,29, pelo acoplamento vicinal entre H-36 e H-35 (**Tabela 4**). Esses dados corroboram com as informações registradas no mapa de contornos HMBC (**Figura 24**). Neste são observados acoplamentos ²*J* entre o carbono C-36 (79,54) e os hidrogênios em H-37 (1,40) e H-35 (7,29), ³*J* entre C-1 (174,83) e H-35 (7,29) que confirmam a uma porção γ-lactônica α,β-insaturada. Os dados relativos aos acoplamentos ²*J* entre o carbono vinílico quaternário

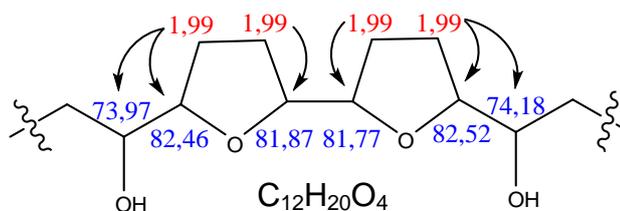
C-2 (133,14) e H-3 (2,26) e um 3J entre a carbonila em C-1 (174,83) e H-3 (2,26), determinaram o posicionamento de uma cadeia lateral alquílica conectada ao C-2 (**Esquema 12**). Todos esses dados podem ser verificados na **Tabela 4**.



Esquema 12 – Correlações verificadas no mapa de contornos COSY (A) e HMBC (B) para substância **ACG1**.

A atribuição do valor dos deslocamentos químicos de todos os carbonos metínicos oxigenados foi possível pela análise dos acoplamentos diretos observados no mapa de contornos HMQC (**Figura 23**). Os carbonos carbinólicos de álcool absorveram em regiões características do espectro, com deslocamentos em δ_C 74,18 (C-15), 73,97 (C-24), 73,81 (C-6), estando acoplados aos hidrogênios do multipletto em δ_H 3,42 ppm; de forma semelhante, os sinais dos carbonos em δ_C 82,52 (C-16) e 82,46 (C-23), 81,87 (C-19) e 81,77 (C-20), relacionados a carbonos ligados a grupamentos de éter, devido ao sua maior desblindagem, foram correlacionados com os sinais dos multipletos em δ_H 3,95 e 3,82, respectivamente, e os sinais dos carbonos C-15 (δ 74,18) e C-24 (δ 73,97) ligados aos hidrogênios de grupo hidroxí com multipletos em δ 3,42 (**Tabela 4**). Estes dados estão de acordo com valores descritos na literatura para sistema bis-THF (LI et al., 2011).

Para verificar o posicionamento desses carbonos oxigenados na estrutura proposta para **ACG1**, foi feita uma análise de todos os acoplamentos $^2J, ^3J$ destes registrados no mapa de contorno HMBC (**Tabela 4**) que permitiu inclusive confirmar a vizinhança dos hidrogênios dos carbonos metilênicos. A análise dos dados confirmaram os acoplamentos entre os hidrogênios metilênicos H-17 (1,99) e os carbonos C-15 (74,18) 3J e C-16 (82,52) 2J , 2J entre H-18 (1,99) e C-19 (81,77), 2J H-21 (1,99) e C-20 (81,87) e por fim os acoplamentos entre H-22 (1,99) com os carbonos C-24 (73,97) 3J e C-23 (82,46) 2J (**Esquema 13**), que permitiram definir dois anéis THF na molécula de **ACG1** (**Figura 24**, **Tabela 4**).



Esquema 13 - Correlações $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ verificados no HMBC de ACG1.

A presença desse sistema foi confirmada nos fragmentos propostos m/z 357 ($C_{20}H_{37}O_7$, 0,8%), 497 ($C_{28}H_{49}O_7$, 0,1%), 281 ($C_{17}H_{29}O_2$, 1,2%) , 215 ($C_{11}H_{19}O_4$, 1,1%) e m/z 141 ($C_8H_{13}O_2$, 0,9%) (**Esquema 19**).

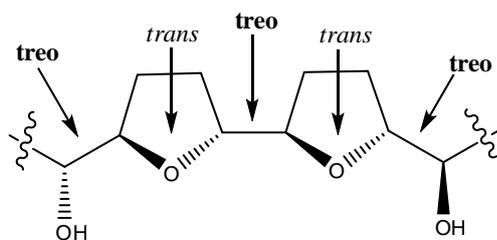
Verificou-se ainda pelo mapa de contorno HMBC, a conexão do anel *bis*-THF as unidades de cadeias alifáticas laterais pode ser justificadas pelos acoplamentos 3J entre C-23 (82,46) e H-25 (1,76 m) e 3J entre C-16 (82,52) e H-14 (1,76). A cadeia alquílica lateral, conectada ao C-23 teve seu tamanho confirmado pela espectrometria de massas de baixa resolução com os fragmentos m/z 451 ($C_{26}H_{43}O_6$, 1,2%), 497 ($C_{28}H_{49}O_7$, 0,1%), 481 ($C_{27}H_{45}O_7$, 0,1%), 371 ($C_{25}H_{39}O_2$, 1,2%), 523 ($C_{35}H_{54}O_3$, 0,1%) e 493 ($C_{33}H_{49}O_3$, 0,1%) que confirmam a existência de nove unidades CH_2 a metila terminal (**Esquemas 17-19**). A ausência de acoplamentos a longa distância do HO-CH com o C-2 justifica descartar a localização deste terceiro grupo hidroxí ao C-3.

A análise comparativa dos dados de RMN 1H e ^{13}C encontrados para a substância **ACG1** com modelos naturais relatados na literatura, permitiu propor a configuração relativa para o anel *bis*-THF como sendo *treo/trans/treo/trans/treo* (**Tabela 3, Esquema 14**).

Tabela 3 – Dados de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) e ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de modelos usados para comparação na determinação estrutural e configuração relativa das unidades tetraidrofurânicas.

Posição		1	2	3	4	5	6
A	δ_H	3,40(m)	3,83(m)	3,83(m)	3,83(m)	3,83(m)	3,83(m)
	δ_C	74,11	83,30	82,48	82,14	82,78	71,35
B	δ_H	3,39(m)	3,84(m)	3,84(m)	3,84(m)	3,84(m)	3,39(m)
	δ_C	74,04	83,17	81,74	81,85	82,84	74,15
C	δ_H	3,38(m)	3,85(m)	3,94(m)	3,94(m)	3,85(m)	3,88(m)
	δ_C	74,06	83,21	82,44	82,69	82,10	71,27
ACG1	δ_H	3,42(m)	3,95(m)	3,82(m)	3,82(m)	3,95(m)	3,42(m)
	δ_C	74,18	82,52	81,77	81,87	82,46	73,97

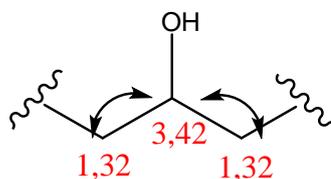
A= PIMENTA et al., 2006; B= SANTOS et al., 1996b; C= MATA et al., 1998.



Esquema 14 – Proposta de configuração relativa do sistema bis-THF de **ACG1** com base em dados experimentais.

Além das unidades representadas nos **Esquemas 13** e **14**, pode-se propor a presença de outro grupo hidroxil representado pelo sinal no $^{13}\text{C-DEPT-Q}$ em δ_{CH} 73,81 ligado ao hidrogênio com δ_{H} 3,42. A presença três grupos hidroxil na estrutura foi confirmada pela preparação do derivado acetilado codificado como **ACG1a**, no qual os dados confirmaram a formação de três grupos acetoxílicos com sinais no RMN de ^1H (**Figura 20**) em δ_{H} 2,10, 2,09, 2,08 e no espectro de $^{13}\text{C-DEPT-Q}$ (**Figura 21**) em δ_{C} 171,02, 170,99 e 170,90 (sinais pouco intensos) correspondentes aos carbonos carboxílicos da acetoxila (**Tabela 4**).

Com esta informação e tendo todas as análises espectrométricas discutidas anteriormente, verificou-se que o terceiro grupamento hidroxil, se posicionava na cadeia alquílica lateral entre a unidade *bis*-tetraidrofurânica α,α -diidroxilada e a porção γ -lactônica α,β -insaturada. No mapa de contornos gCOSY [$^1\text{H}\times^1\text{H}$] (**Figura 25**), pode ser observado o acoplamento vicinal entre o hidrogênio carbinólico em δ_{H} 3,42 (6-OH) e os hidrogênios metilênicos centrados no multipeto em 1,32 ppm (H-5 e H-7) da cadeia lateral (**Esquema 15**), porém o posicionamento inequívoco do grupamento (6-OH) foi confirmado pelos fragmentos nas razões m/z 169 ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_3$, 1,0%) e 171 ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3$, 1,2%) observados nos espectros de massas de baixa resolução (**Esquema 18-19**).



Esquema 15 - Correlações verificadas no mapa de contornos COSY de **ACG1**

Considerando o valor do íon quase molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 645,3 relativo ao íon aduto sódico e $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 623, pode-se definir o valor do M^+ com m/z 622. Pode-se propor a fórmula molecular expandida conforme a equação: $[111 (\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2) + 228 (\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4) + 30 (\text{CHOH}) + 14n (\text{CH}_2)_n + 1 (\text{H})]$, temos: 370, fazendo a diferença $622 - 370 = 14n$, sendo $n = 18$. Desta forma pode-se propor a estrutura parcial de **ACG1** (**Figura 17**), sendo $n_1 + n_2 + n_3 = n = 18$.

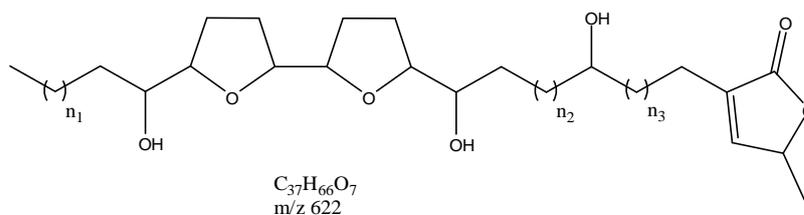


Figura 17 – Proposta estrutura parcial para **ACG1**

As análises dos espectros de massas de baixa resolução (**Figuras 26-27**) permitiram localizar as hidroxilas em 6, 15 e 24 (**Figura 18**), com base nos valores de m/z detectados no espectro que podem ser justificados pelos íons originados pelas fragmentações representadas abaixo entre outros representados nos **Esquemas 16-20**.

O tamanho da cadeia lateral alifática conectada ao C-24, composta por nove unidades CH_2 e a metila terminal foi confirmado pela espectrometria de massas com os fragmentos m/z 451 ($C_{26}H_{43}O_6$, 0,3%) e m/z 497 ($C_{28}H_{49}O_7$, 0,5%) (**Esquema 19**). Da mesma forma, analisando os fragmentos m/z 357 ($C_{20}H_{37}O_7$, 0,6%) e 281 ($C_{17}H_{29}O_3$, 1,4%), confirmou-se que a cadeia lateral conectada ao C-16 era composta por oito unidades CH_2 , além das fragmentações descritas como a confirmação do posicionamento 6-OH, m/z 169,3 ($C_9H_{13}O_3$) e 171,0 ($C_9H_{15}O_3$) e os fragmentos m/z 199 ($C_{11}H_{19}O_3$, 0,8%), 149 ($C_9H_9O_2$, 31,9%) da unidade lactônica (**Esquema 20**).

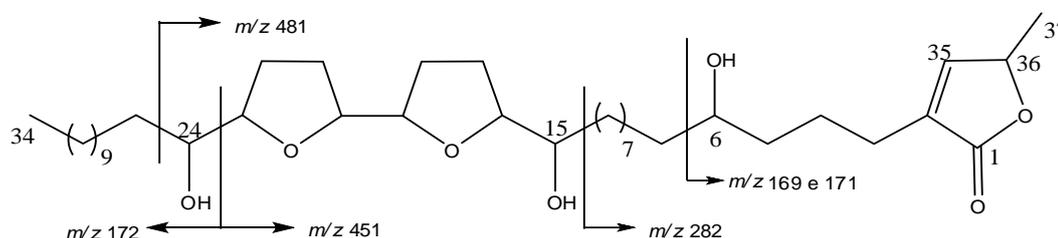


Figura 18 – Proposta estrutural para **ACG1** com fragmentações verificadas no espectro de massas (ESI-MS)

Outras análises dos espectros de massas de baixa resolução (**Figura 26-27**) confirmaram fragmentos relativos à perda de água como m/z 605,2 [$C_{37}H_{67}O_7-1H_2O$], m/z 587,2 [$C_{37}H_{65}O_6-1H_2O$], m/z 569,2 [$C_{37}H_{63}O_5-1H_2O$], m/z 551,1 [$C_{37}H_{61}O_4-1H_2O$] e m/z 533 [$C_{37}H_{59}O_3-1H_2O$] e m/z 457 ($C_{31}H_{53}O_2$, 0,9%) relativo à perda da unidade lactônica (**Esquema 16-17**).

Com a análise de todos os dados espectrométricos, fundamentais para a elucidação estrutural da substância **ACG1**, conclui-se que sua estrutura é compatível a uma acetogenina bis-THF conhecida bullacina (**Figura 19**), cuja fórmula molecular

$C_{37}H_{66}O_7$ (calculado 623,9321) é compatível com o fragmento m/z 623,48935 $[M+H]^+$ obtido em massas de alta resolução (**Figura 28-29**).

Esta acetogenina foi anteriormente isolada da casca do caule de *Annona bullata* (McLAUGHLIN et al., 1993) e *A. squamosa* (McLAUGHLIN et al., 1998) sendo relatada pela primeira vez em sementes do gênero *Annona*, assim como na espécie *Annona coriacea*.

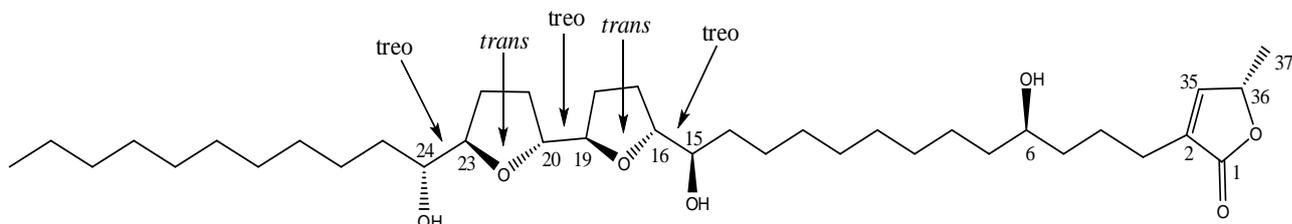


Figura 19 – Estrutura de **ACG1** - Bullacina

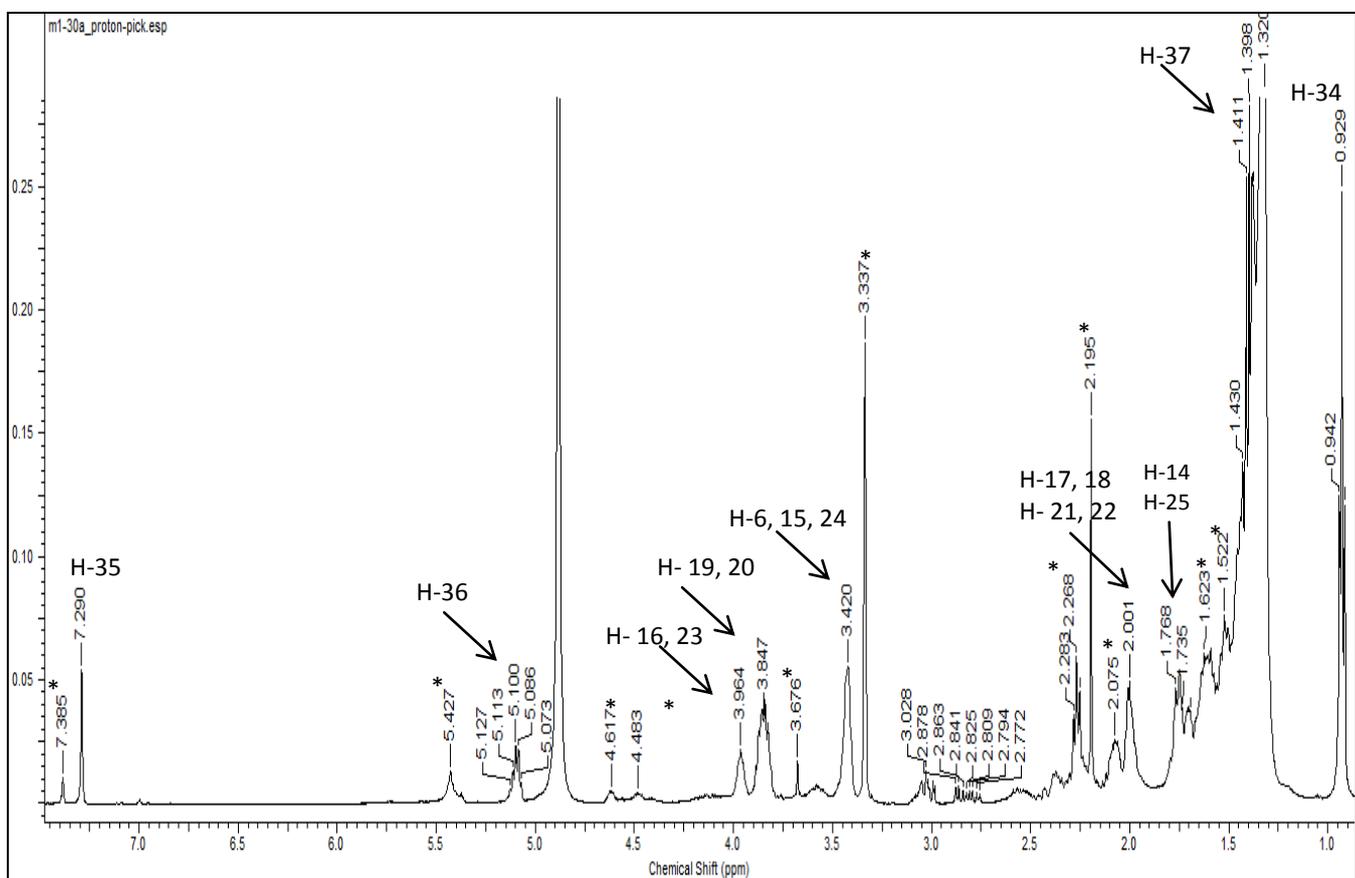
Tabela 4 - Dados de RMN ^1H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) da fração M1-30A contendo **ACG1**, incluindo-se resultados obtidos através de espectros 2D HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos em δ (ppm) e valores de constantes de acoplamentos (J) em Hz*.

C	ACG1			ACG1a		
	HMQC		HMBC	HMQC		HMBC
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}
1	174,83	-	H-3; H-35	173,07	-	H-3
2	133,14	-	H-36; H-35; H-3	126,90	-	H-3
OAc	-	-	-	171,02	-	2,10 (s)
OAc	-	-	-	170,99	-	2,09 (s)
OAc	-	-	-	170,90	-	2,08 (s)
CH						
6	73,81	3,42 (m) [#]	-	74,37	3,86 (m)	-
15	74,18	3,42 (m)	H-17	74,82	4,84 (m)	-
16	82,52	3,95 (m) [#]	H-17; H-14	79,64	3,97 (m)	-
19	81,77	3,82-3,88 (m) [#]	H-18; H-17	78,91	3,97 (m)	-
20	81,87	3,82-3,88 (m)	H-21; H-22	79,22	3,97 (m)	-
23	82,46	3,95 (m)	H-22; H-25	79,41	3,97 (m)	-
24	73,97	3,42 (m)	H-22	75,19	4,84 (m)	-
35	150,89	7,29 (s, 5H)	H-36; 2H-3; 3H-37	148,97	7,01 (s)	H-36; H-3
36	79,54	5,10 (m)	H-35; H-37	77,49	5,01 (m)	-
CH₂						
3	25,83	2,26 (m)	H-35	25,39	2,27 (m)	-
4	24,63	1,32 (m) [#]	H-3	25,16	1,30 (m)	-
5	35,49	1,32 (m)	-	32,08	1,31 (m)	-
7	35,09	1,32 (m)	-	31,92	1,31 (m)	-
8-13	29,01-29,52	1,32 (m)	H-15	29,71-29,12	1,31 (m)	-
14	32,91	1,75-1,77 (m) [#]	H-16	35,44	1,60 (m)	-
17-18	27,20-28,29	1,99 (m) [#]	H-16	28,11-28,21	1,95 (m)	-
21-22	27,20-28,29	1,99 (m)	H-23	25,16-28,21	1,95 (m)	-
25	32,58	1,75-1,77 (m)	-	30,8	1,60 (m)	-
26-31	28,81-29,52	1,32 (m)	-	29,71-29,12	1,31 (m)	-
32	31,72	1,32 (m)	H-34; H-31	31,92	1,26 (m)	H-34
33	22,38	1,32 (m)	H-34; H-31	25,16	1,26 (m)	H-34
CH₃						
37	17,93	1,40 (d, 6,85)	H-36	19,22	1,42 (d, 7,0)	H-36; H-35
34	13,16	0,93 (t, 7,0)	H-33	14,14	0,89 (t, 6,75)	H-33
OAc	-	-	-	21,21	2,10 (s)	-
OAc	-	-	-	21,16	2,09 (s)	-
OAc	-	-	-	21,13	2,08 (s)	-

*O espectro 2D ^1H - ^1H -COSY também foi usado nesta interpretação de resultados experimentais.

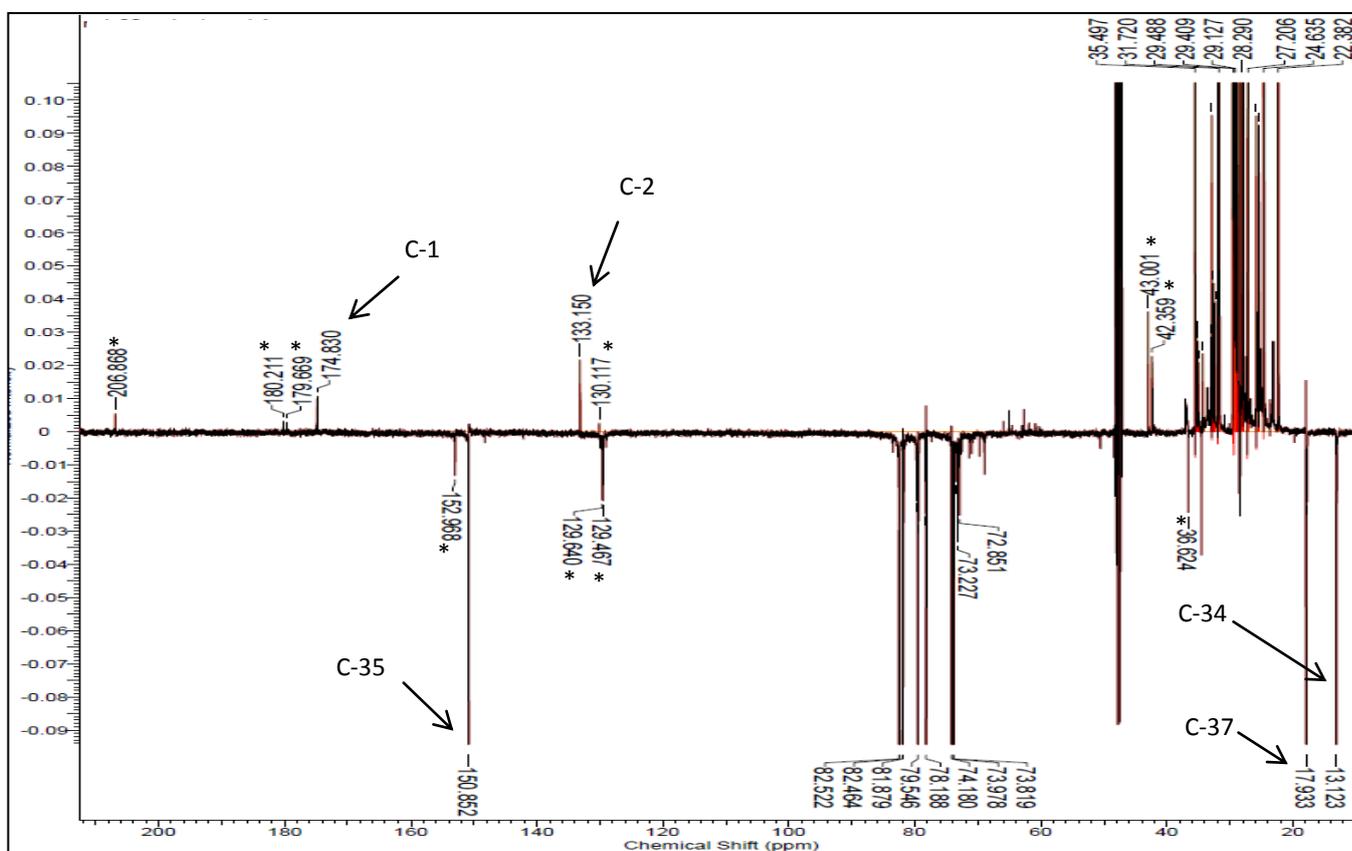
**Outros valores em menor intensidade justificam a presença de outro componente na fração.

Os sinais estão sobrepostos.



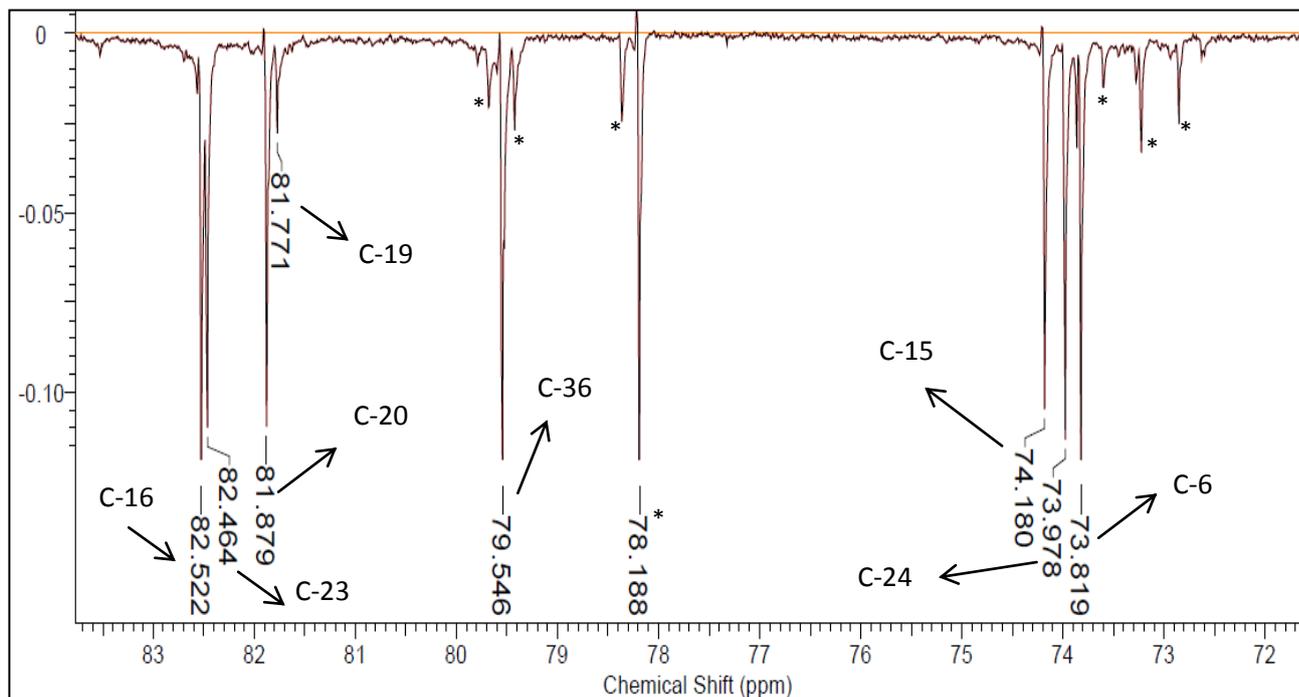
*sinais não definidos (impurezas)

Figura 20 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de **ACG1**, obtido em CD_3OD . *impurezas



*sinais não definidos (impurezas)

Figura 21 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de **ACG1** em CD_3OD .



*sinais não definidos (impurezas)

Figura 22 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de **ACG1** em CD_3OD

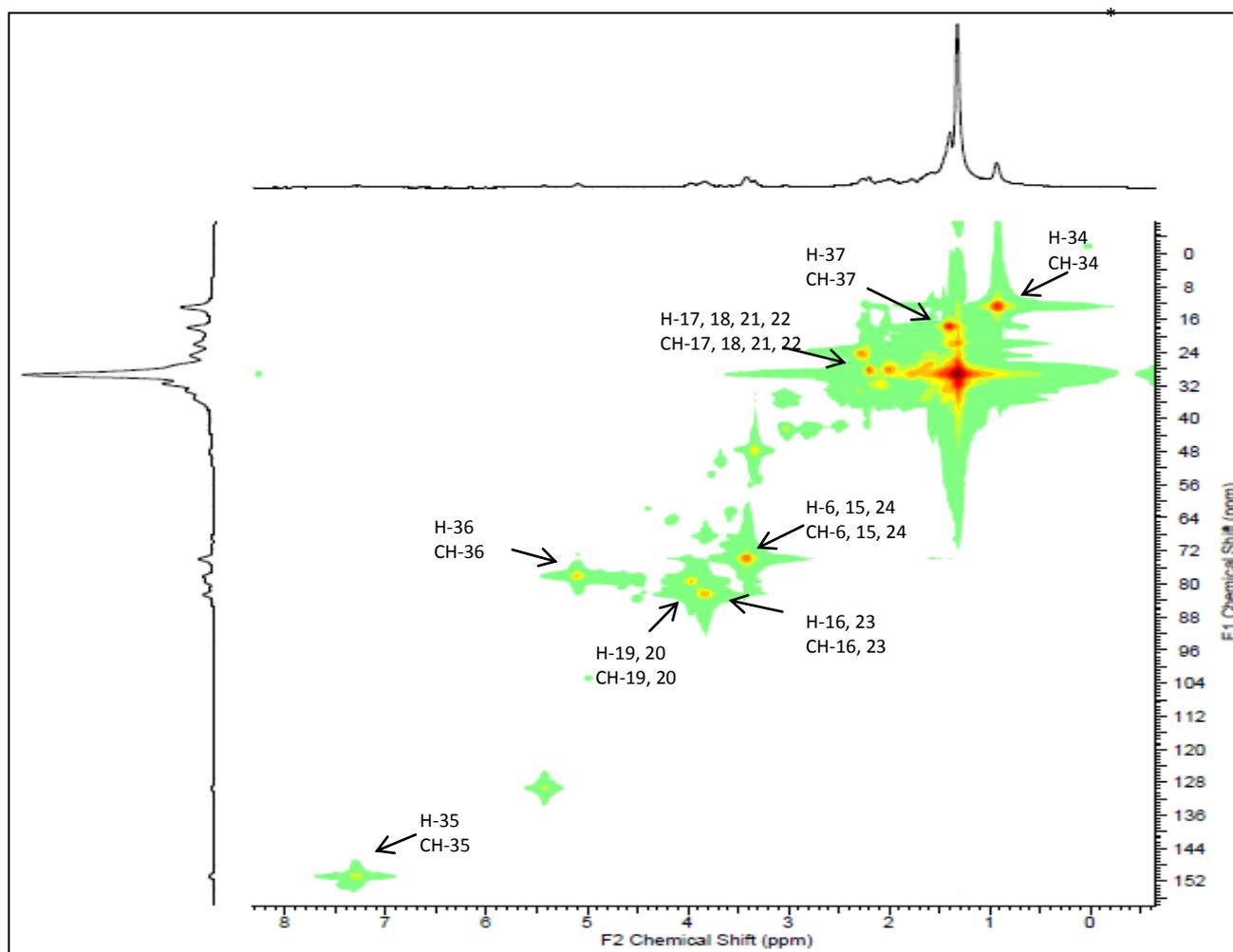


Figura 23 - Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMQC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de **ACG1** em CD_3OD

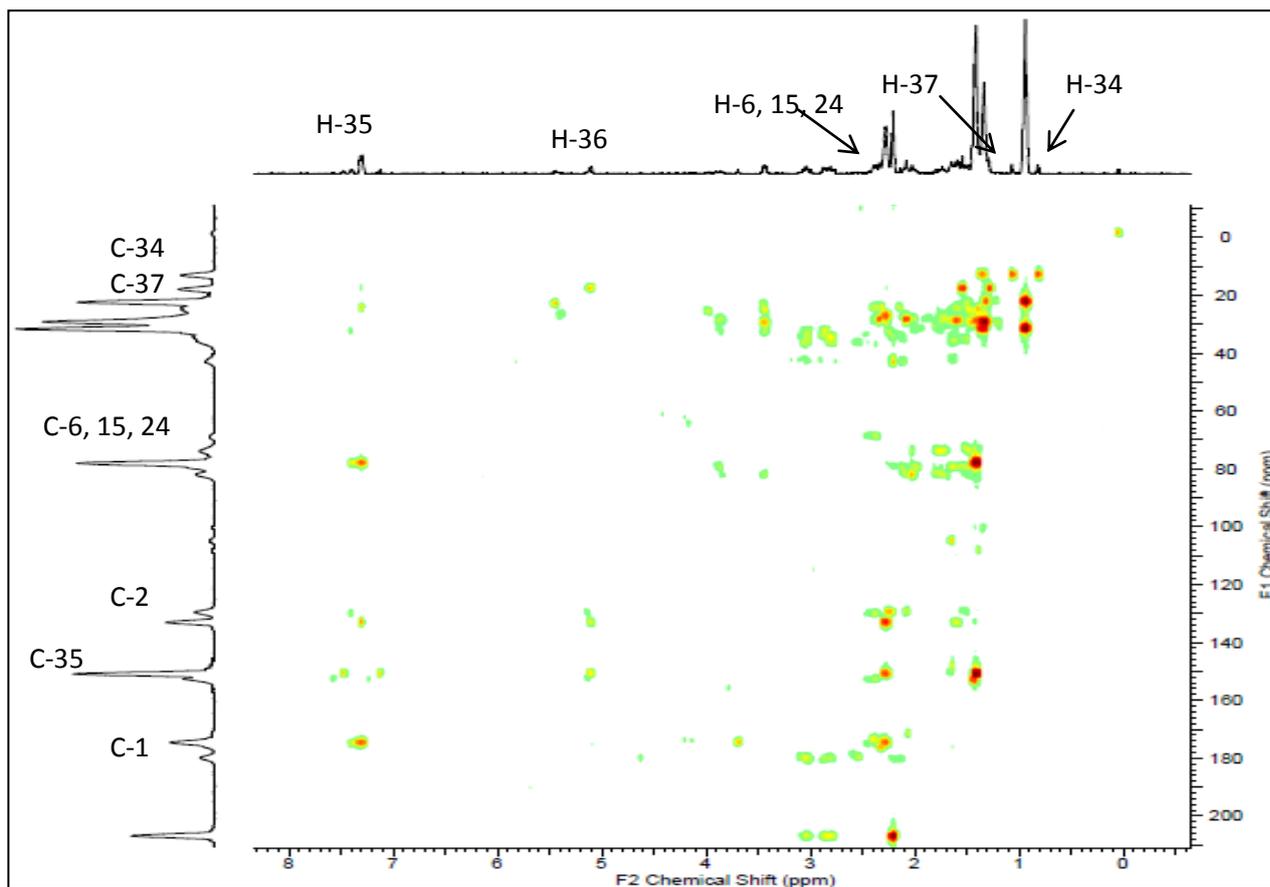


Figura 24 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMBC (¹H:500 e ¹³C:125 MHz) de **ACG1** em CD₃OD

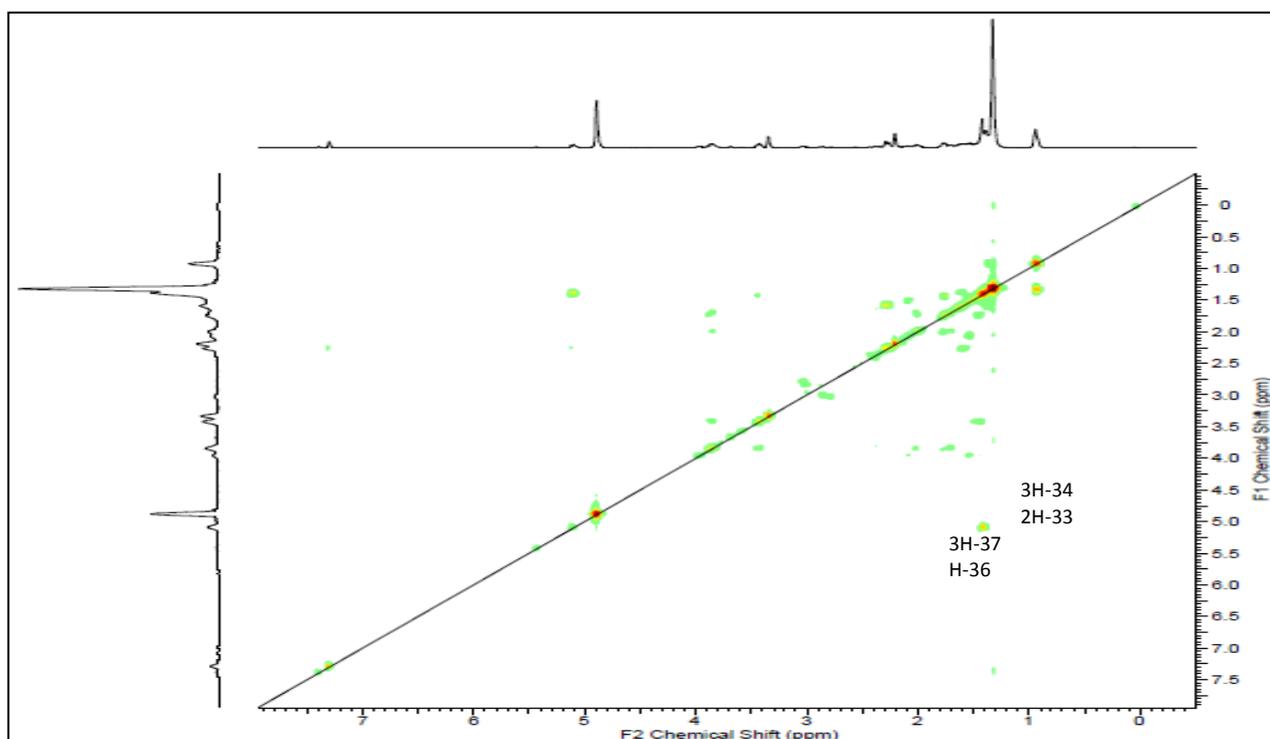


Figura 25 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) ^1H - ^1H -COSY (500MHz) de **ACG1** em CD_3OD

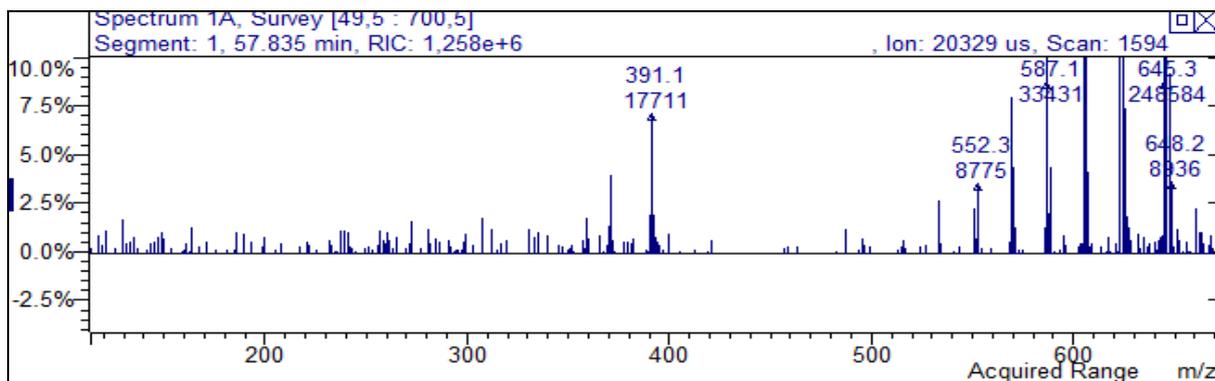
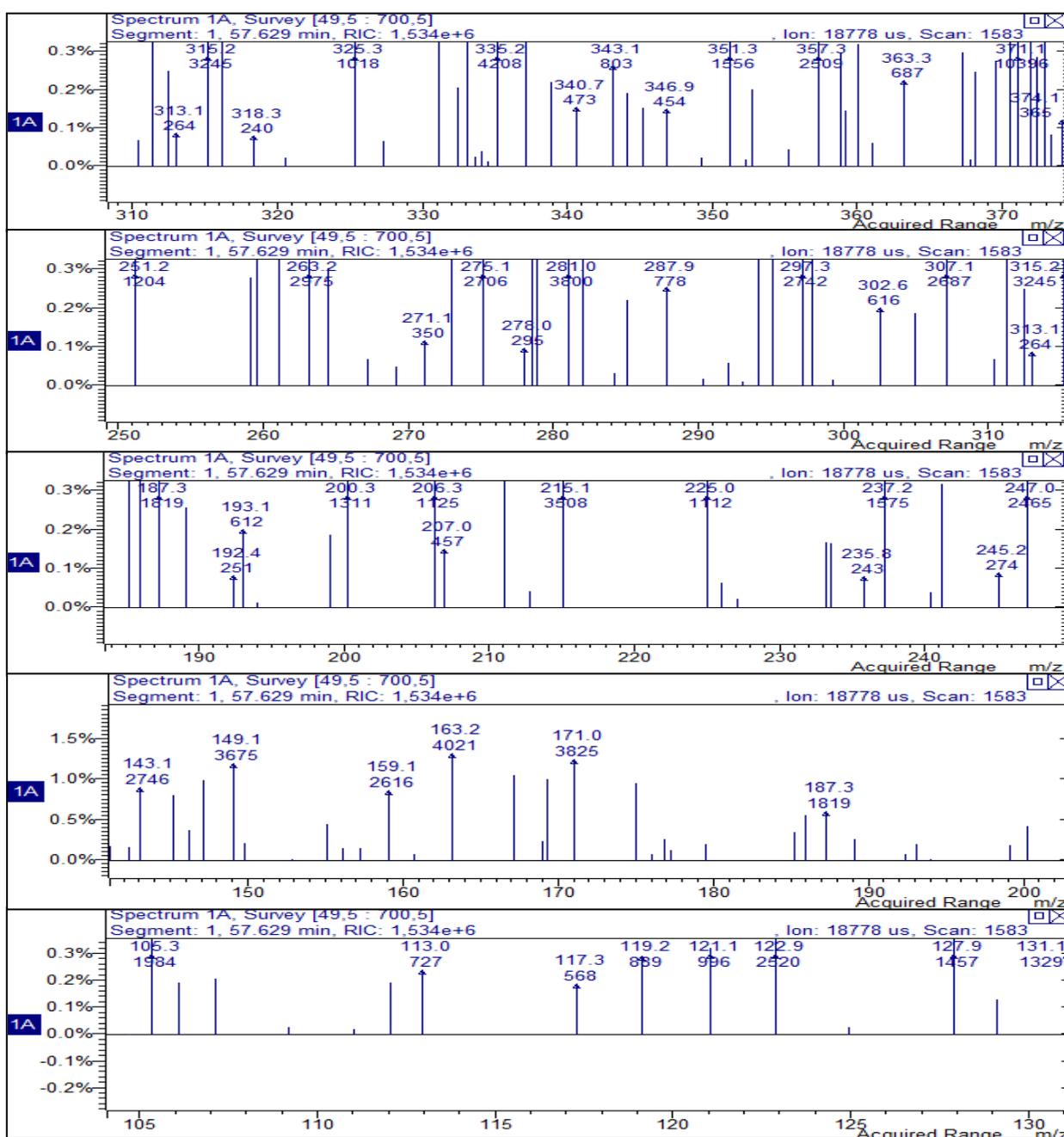


Figura 26 – Espectro de massas de baixa resolução da **ACG1** obtido através de ionização por eletrospray (EM-ESI)



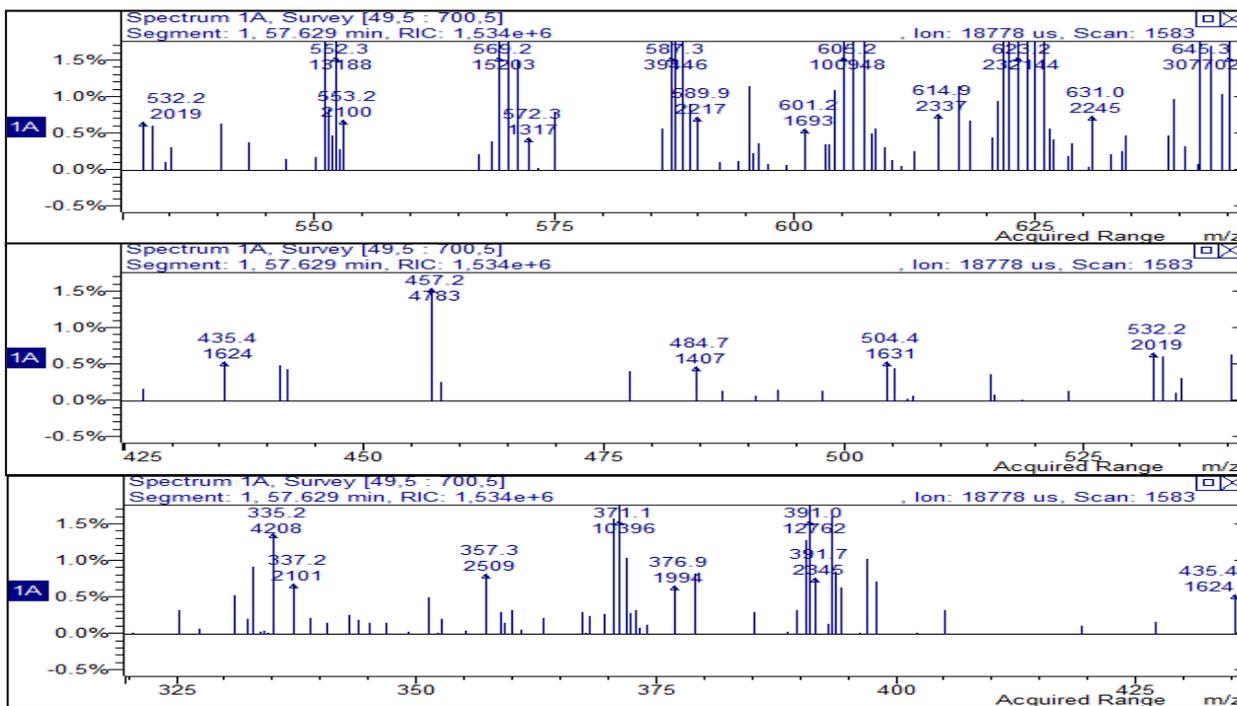


Figura 27 – Espectros/ampliação de massas de **ACG1** obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução em modo positivo.

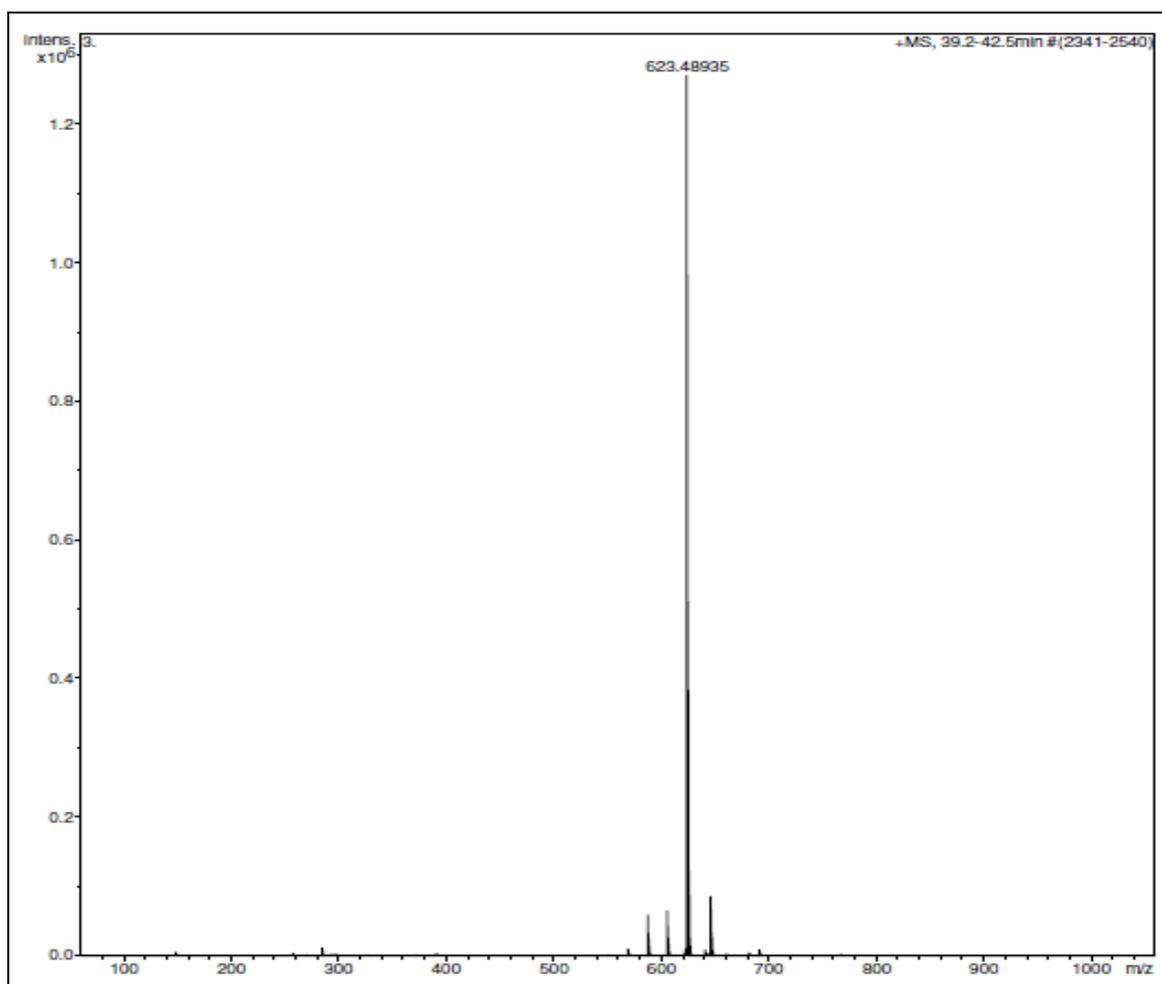


Figura 28 – Espectro de massas alta resolução de **ACG1** obtido através de ionização por eletrospray (EM-ESI) em modo positivo

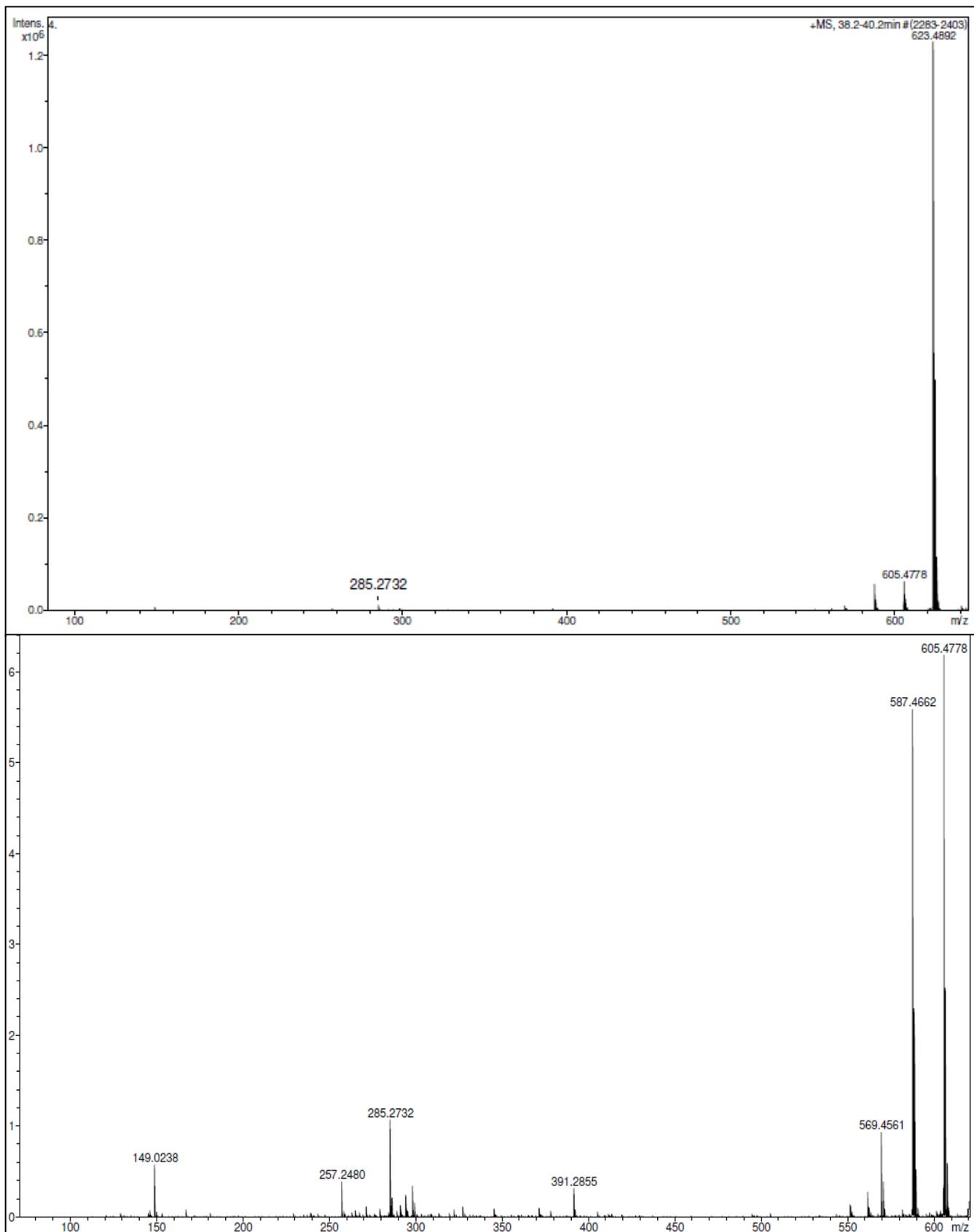


Figura 29 – Espectros/ampliação de massas de **ACG1** obtido em CLAE-EM-ESI alta resolução em modo positivo

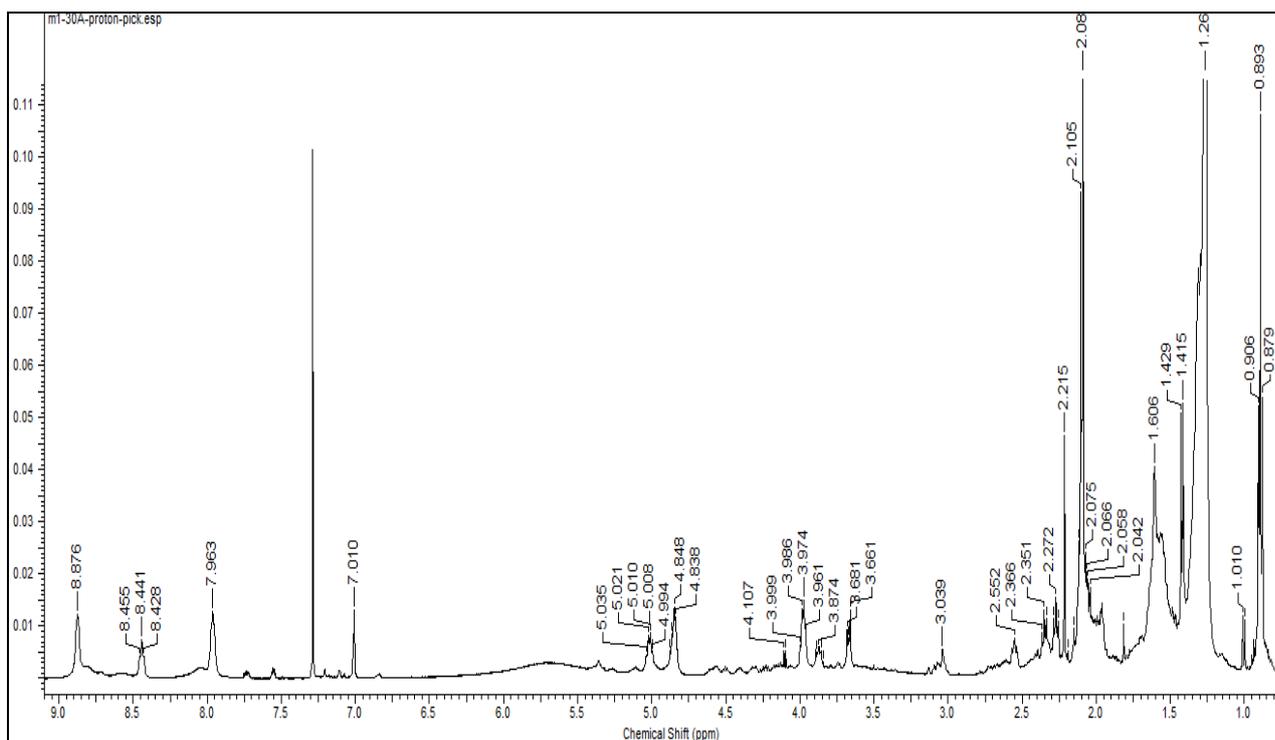


Figura 30 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de **ACG1a** obtido em CDCl_3

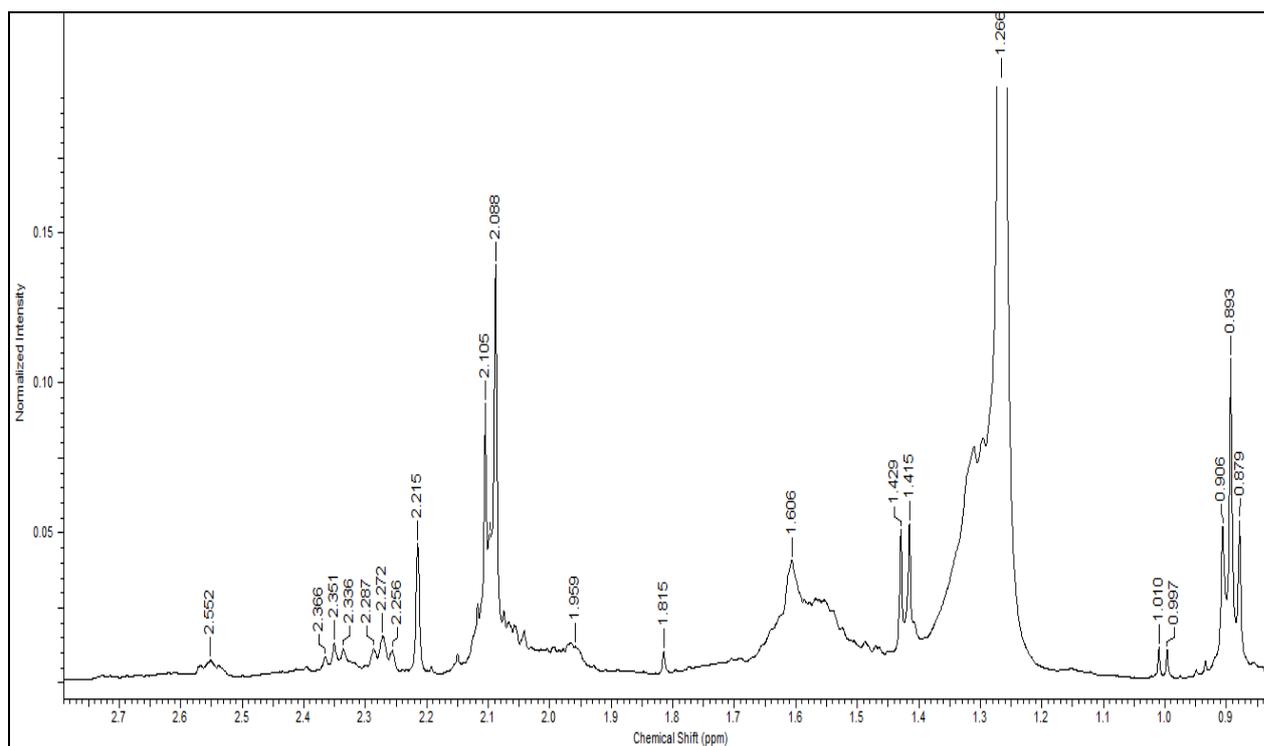


Figura 31 – Ampliação do espectro de RMN ^1H de **ACG1a** obtido em CDCl_3

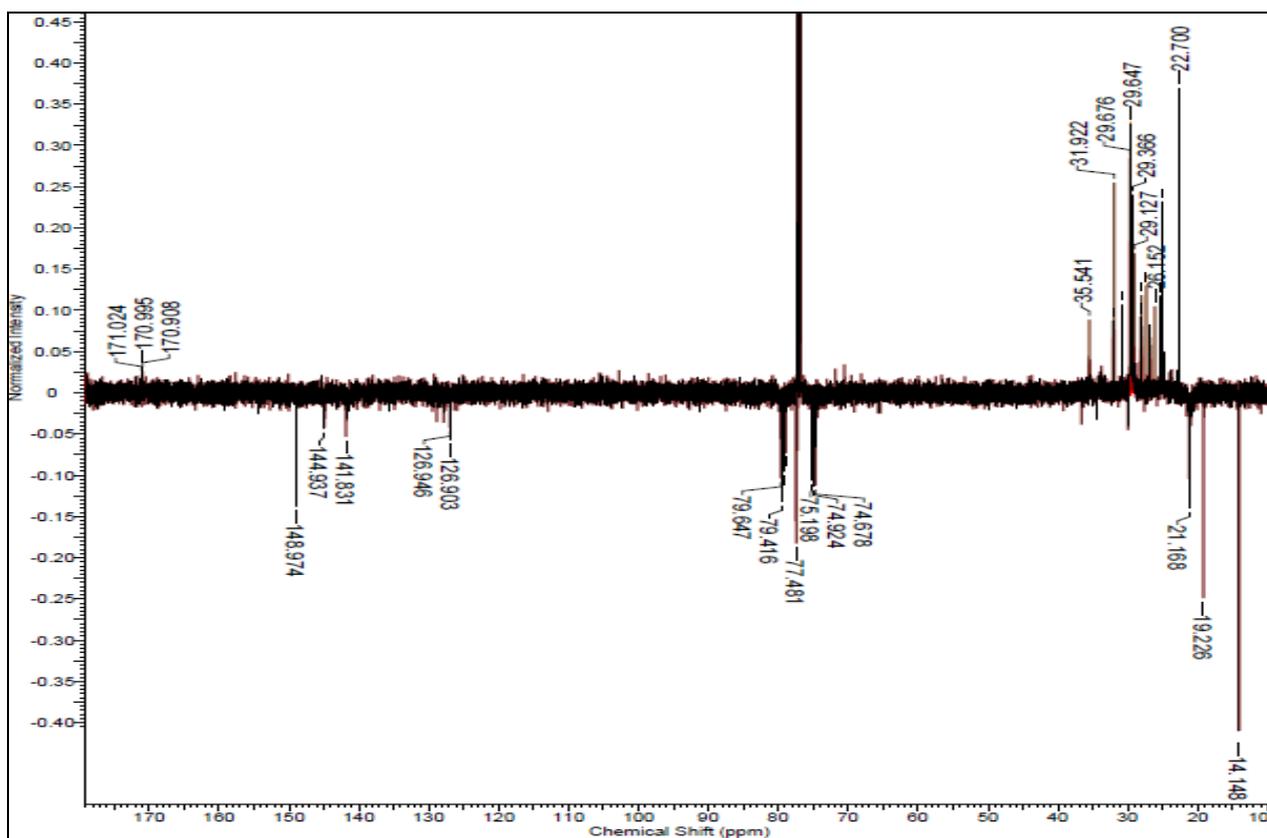


Figura 32 – Espectro DEPT-Q- ^{13}C (125 MHz) de **ACG1a** obtido em CDCl_3

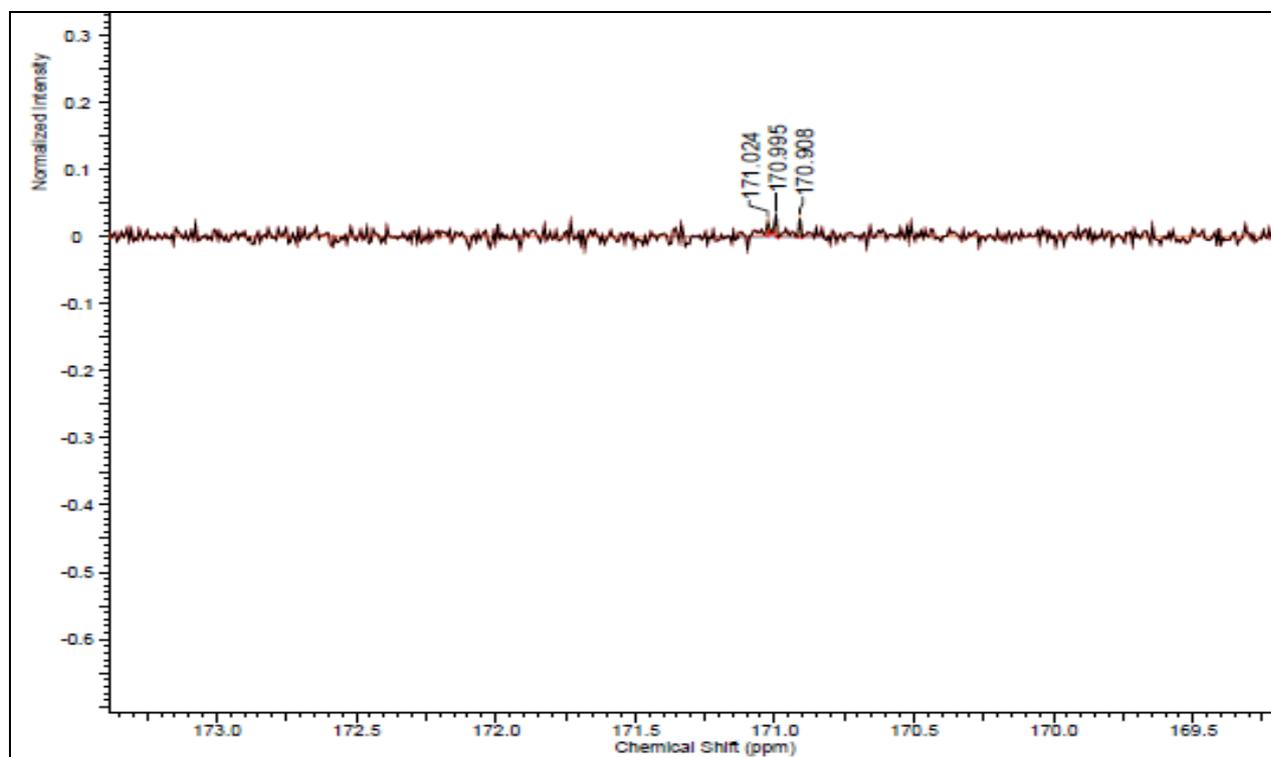


Figura 33 – Ampliação do espectro DEPT-Q- ^{13}C de **ACG1a** obtido em CDCl_3

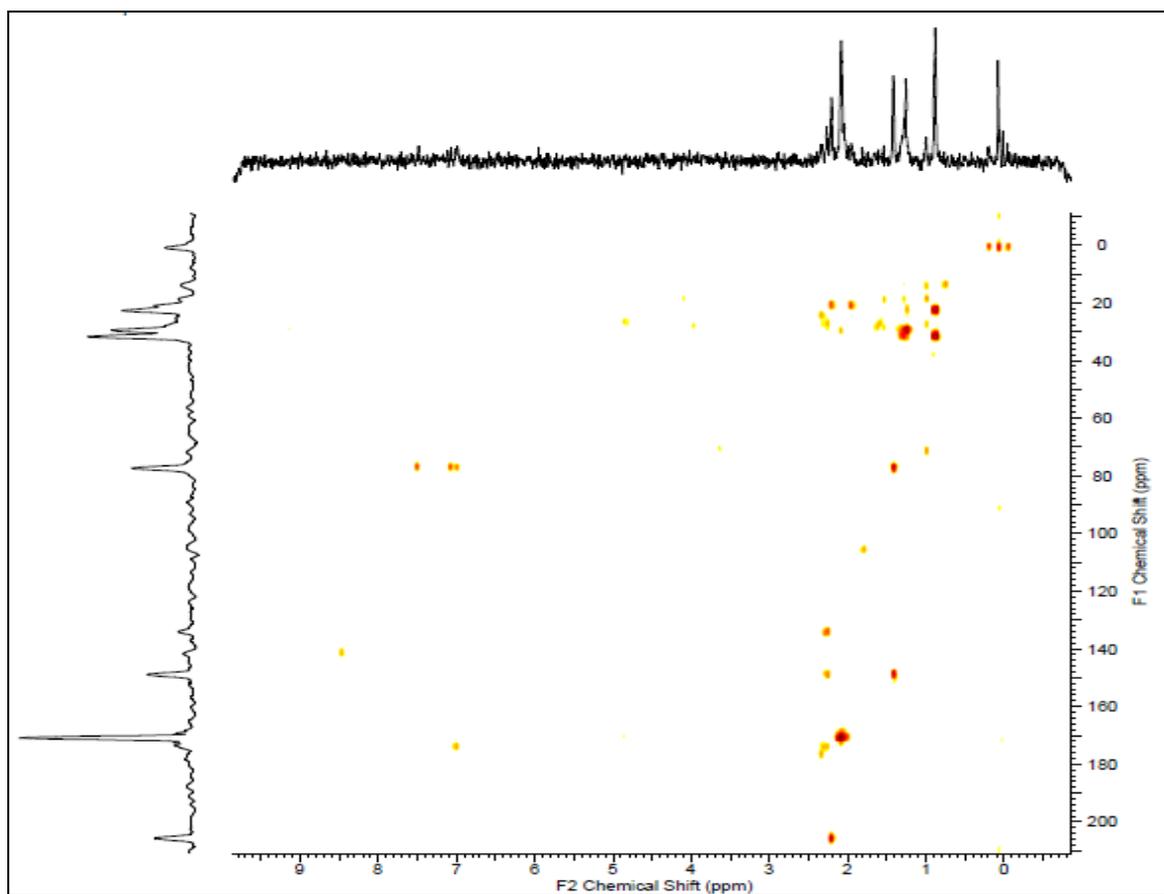
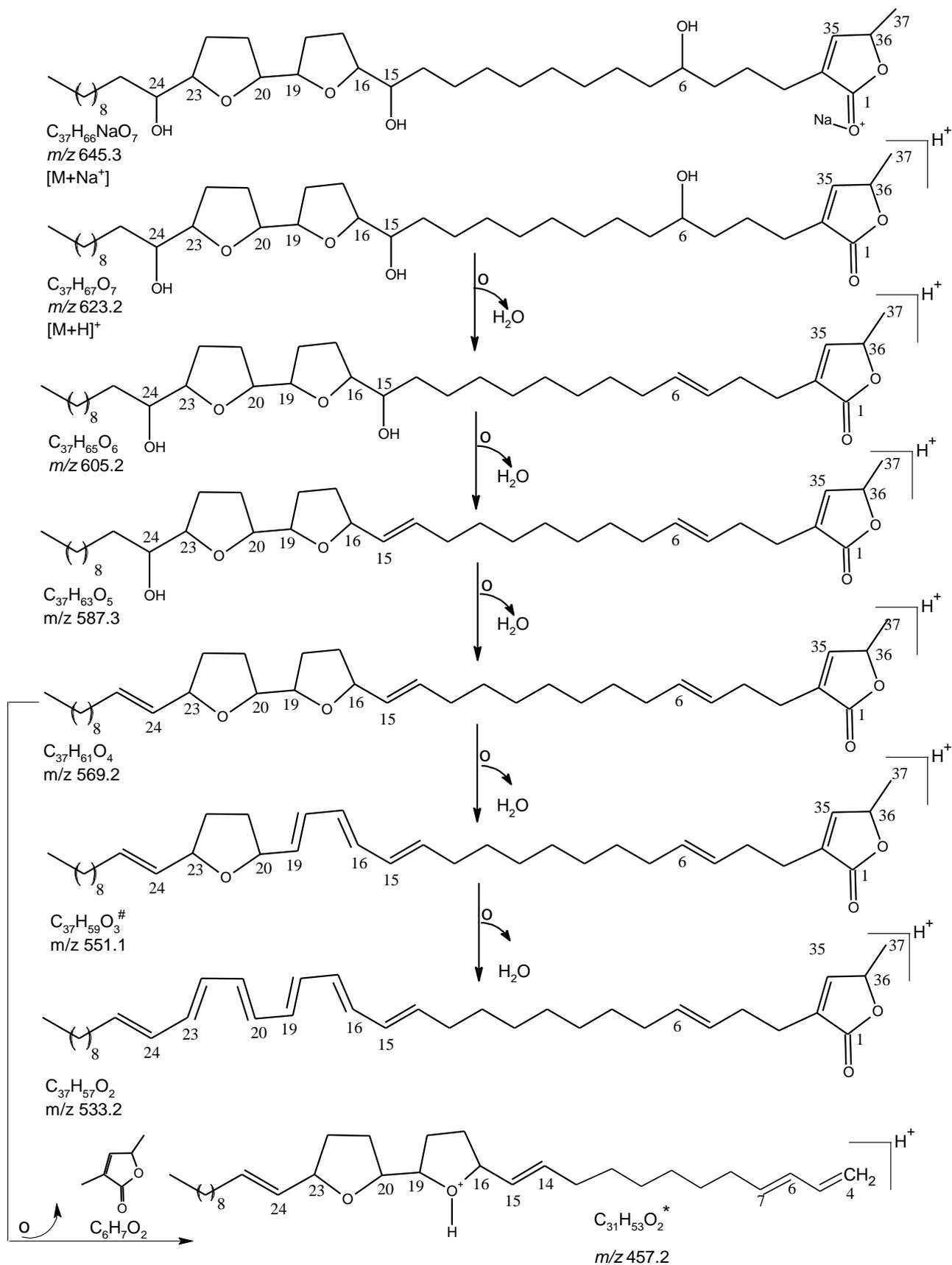
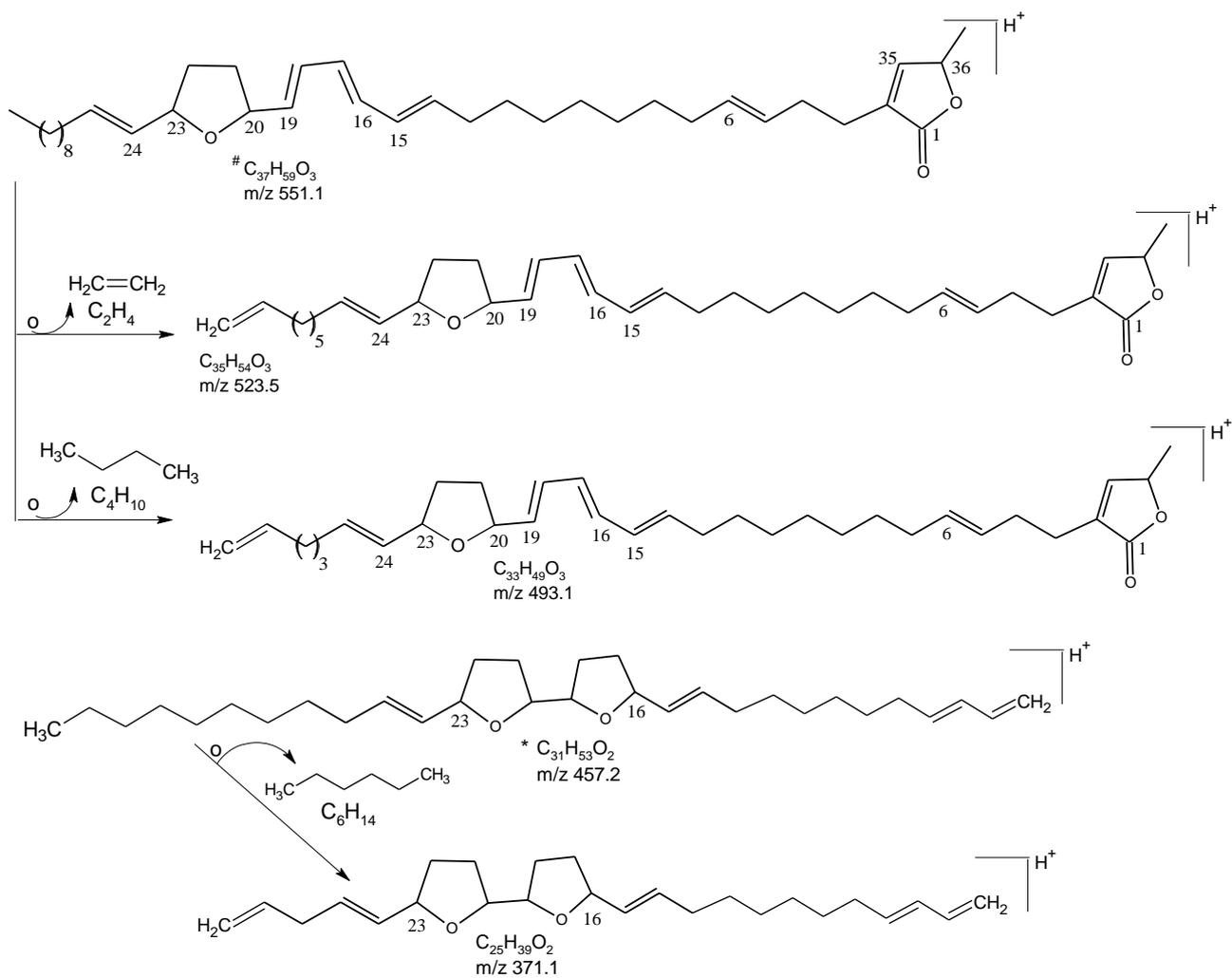


Figura 34 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMBC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de **ACG1a** em CDCl_3

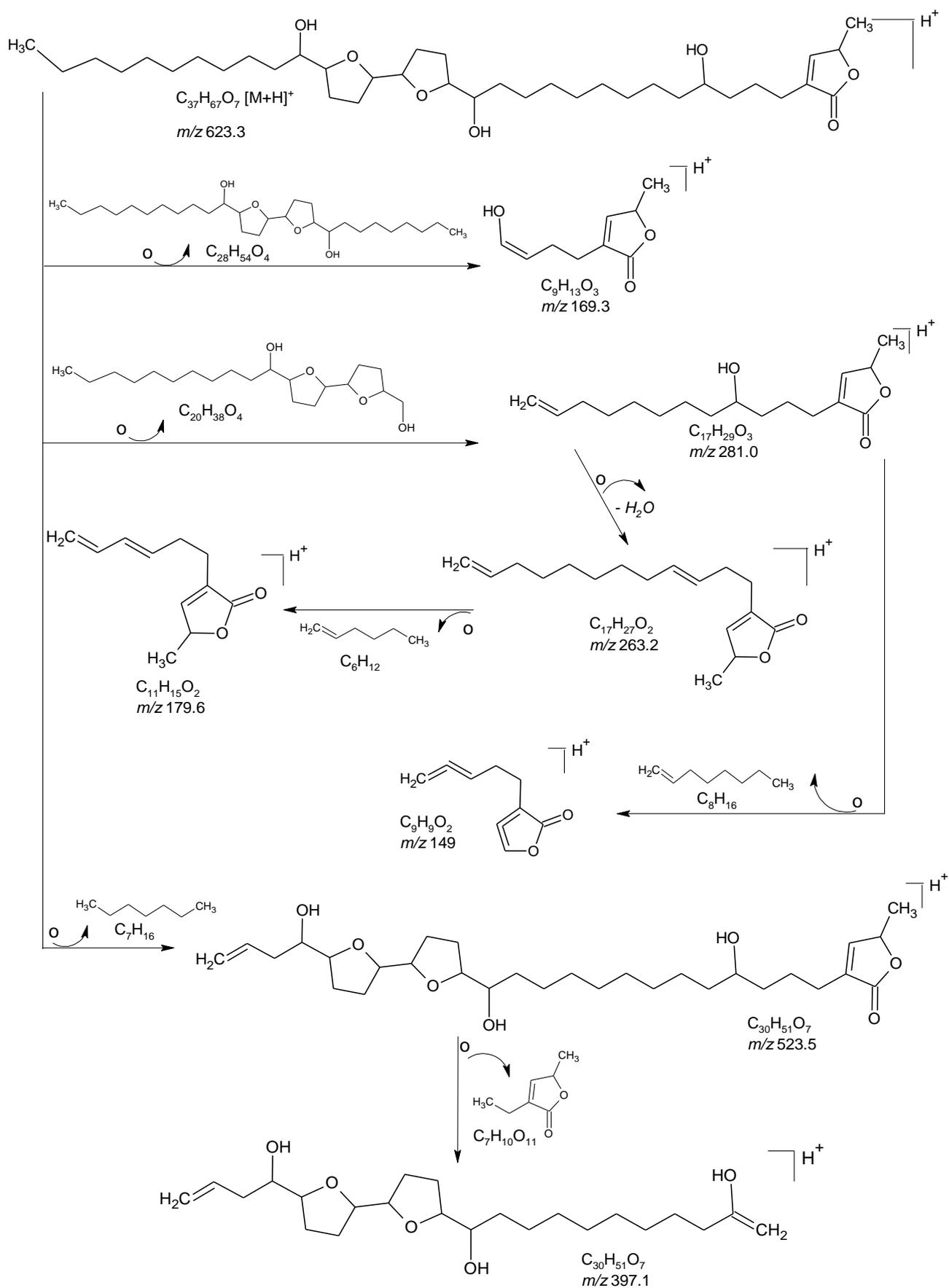


* continua

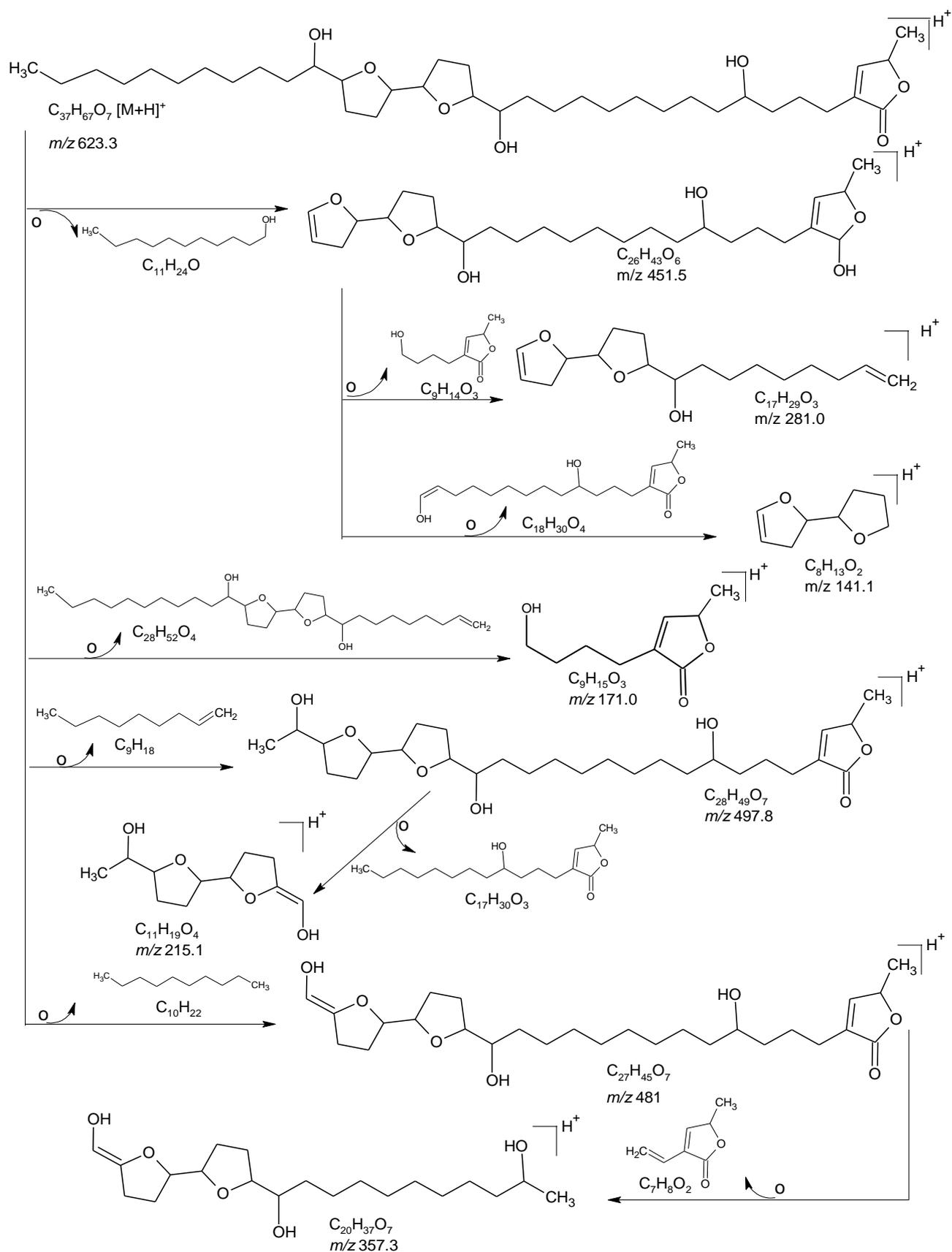
Esquema 16 – Propostas de fragmentações de perdas de H_2O para justificar alguns picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de **ACG1**. Espectros em **Figuras 26-29**.



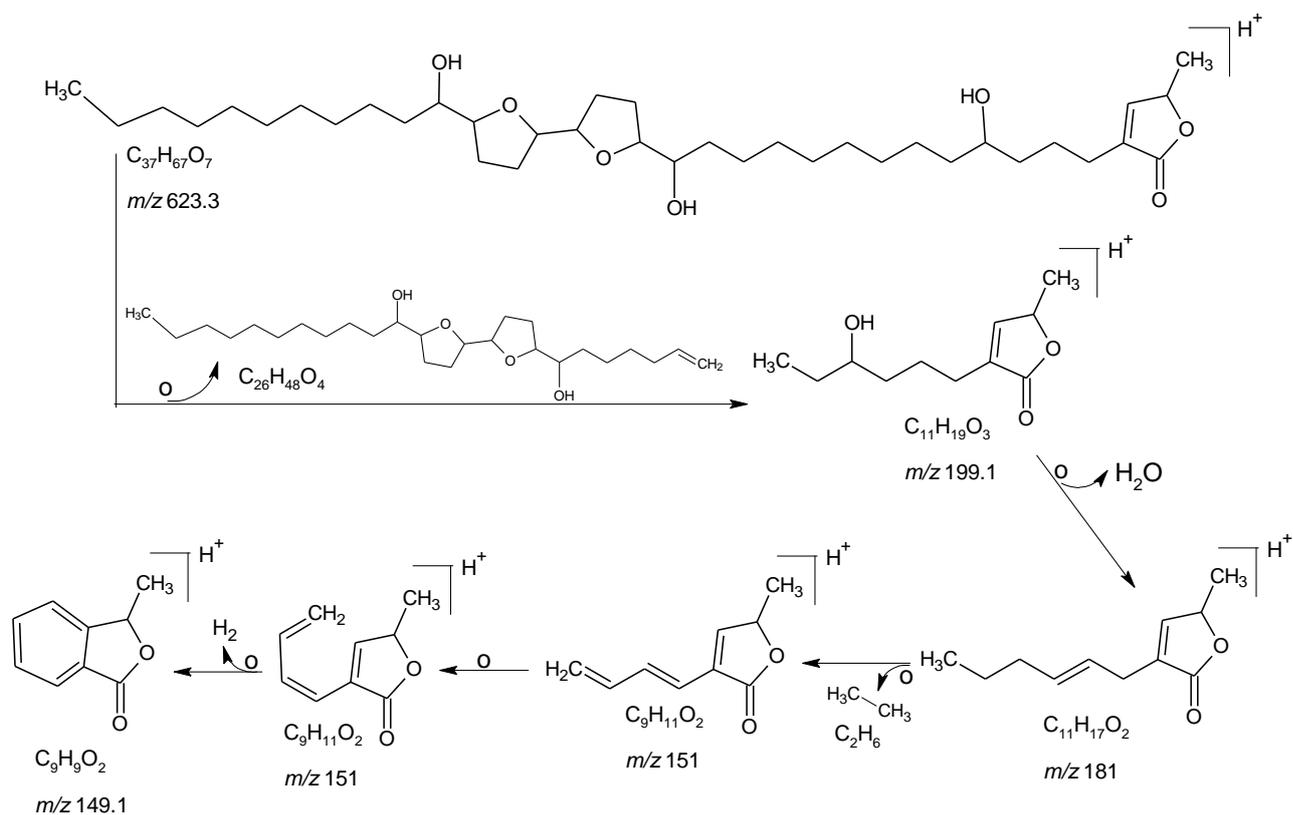
Esquema 17 – Propostas de fragmentações para justificar os valores de picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de **ACG1**. Espectros em **Figura 26-27**.



Esquema 18 - Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de **ACG1**. Espectros em **Figura 26-29**.



Esquema 19 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de **ACG1**. Espectros em **Figura 26-27**.



Esquema 20 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de **ACG1**. Espectros em **Figura 26-29**.

5.5.2. Substâncias **ACG2** e **ACG3** (amostras **M3-22** e **F2-C**)

No cromatograma da amostra **M3-22** (**Figura 13-14**) obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução foram detectados dois componentes com razão m/z 613,3 (**Figura 46**); utilizando a mesma técnica cromatográfica para a amostra **F2-C**, cujo cromatograma apresentou dois picos com a mesma razão m/z 613,3 (**Figura 60**). Com o emprego dessa técnica-hifenada, foi possível verificar que essas amostras eram compostas por uma mistura de isômeros constitucionais.

Na amostra **M3-22** foram detectados, um pico majoritário no tempo de retenção 26,94 min. (pico 2) e um minoritário em 22,84 min. (pico 1) (**Figura 13**), e no cromatograma da amostra **F2-C**, foram detectados também dois picos, nos tempos de retenção 24,50 min. (pico 1) e 29,19 min. (pico 2) (**Figura 15**) sendo este último majoritário na amostra. Mesmo em mistura, os componentes majoritários dessas amostras, denominados **ACG2** em **M3-22** e **ACG3** em **F2-C**, tiveram sua estrutura determinada pelas mesmas técnicas espectrométricas utilizadas sendo RMN 1H e ^{13}C (1D e 2D), IV, EM-ESI de baixa e alta resolução. A presença de substância minoritária nas

amostras foi identificada nesses diversos experimentos, porém não teve sua estrutura determinada.

As amostras foram obtidas como um sólido branco, que reagiu positivamente com o reagente Kedde quando reveladas em CCD. Os espectros na região do infravermelho das amostras M3-22 e F2-C (**Figura 35**) mostraram-se semelhantes, revelando a presença de bandas de absorção em $\nu_{\text{máx}}$ 3.420 cm^{-1} estiramento O-H, 2.920 e 2.850 cm^{-1} (ν_s CH_3 e CH_2 alifáticos), 1.727 cm^{-1} de estiramento da carbonila lactônica (C=O), 1.649 cm^{-1} de estiramento da dupla ligação α,β -insaturada, 1.460 e 1.377 cm^{-1} de deformação angular (δ_s CH_2 e CH_3) e 1.071 cm^{-1} de deformação axial C-O de álcool secundário.

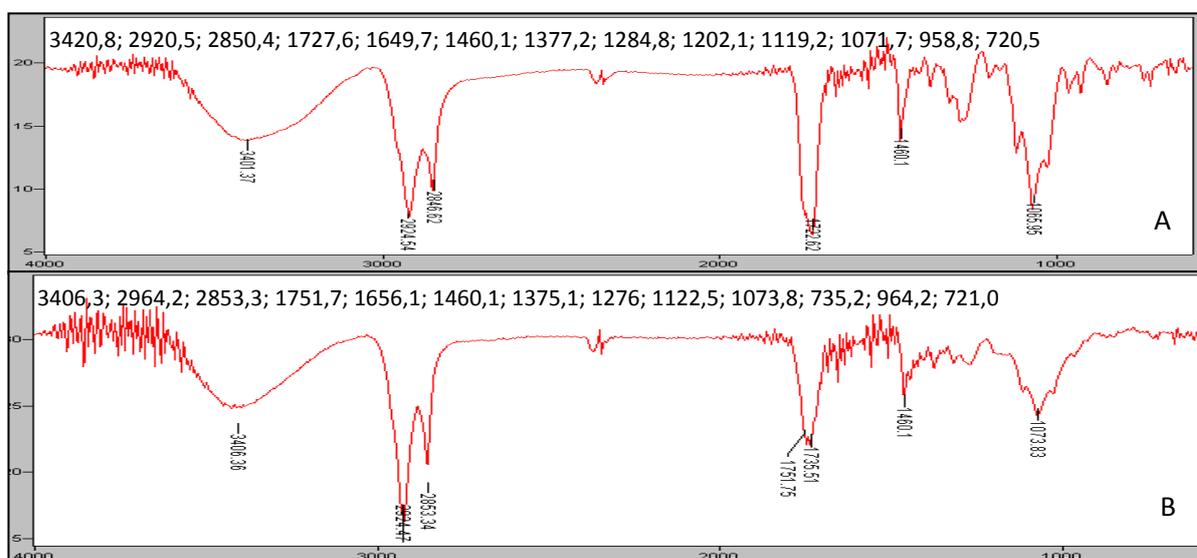


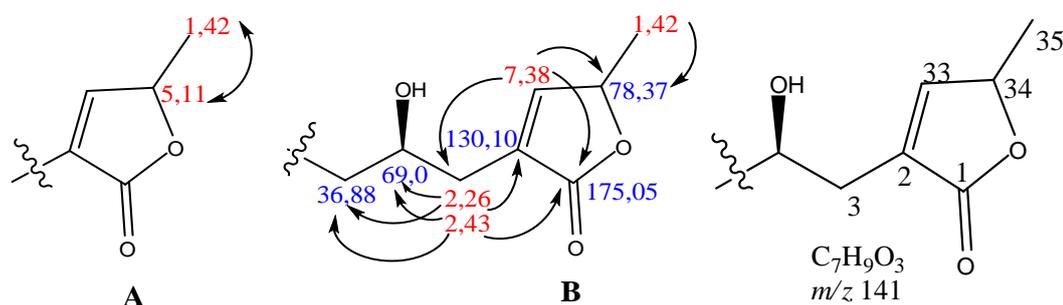
Figura 35 – Espectro na região do infravermelho (IV) de M3-22 (A) e F2-C (B) em pastilha de KBr.

Os espectros de RMN de ^1H das amostras M3-22 (**Tabela 7, Figura 40**) e F2-C (**Tabela 8, Figura 54**) também mostraram semelhança no padrão do deslocamento químico dos sinais dos hidrogênios. Na amostra M3-22 observaram-se sinais na região de δ_{H} 0,91-2,47 referentes a hidrogênios metílicos e metilênicos, na região de δ_{H} 3,42-3,96 de hidrogênios carbinólicos, além de um multiplete em δ_{H} 5,11 e um sinal de singlete em δ_{H} 7,38. Esses dados foram analisados em conjunto com as informações do mapa de contornos HMQC (**Figura 43**) e permitiram verificar os acoplamentos diretos do singlete em δ_{H} 7,38 ao carbono vinílico em δ_{CH} 152,98 e do multiplete em δ_{H} 5,11 ao carbono carbinólico em δ_{CH} 78,37, atribuídos aos carbonos C-33 e C-34, respectivamente.

Com o auxílio do espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (**Figura 41-42**) foi possível identificar a dupla vinílica entre os carbonos C-2/33, atribuídos aos carbonos δ_{C} 130,10 e δ_{CH} 152,98 respectivamente; outro sinal evidenciou a presença de um carbono atribuído a

uma carbonila em δ_C 175,05 (C-1), um sinal em δ_{CH_3} 17,78 atribuído a metila C-35 ligado a carbono oxigenado (**Tabela 7**).

Com as informações de deslocamento químico dos sinais de carbonos e hidrogênios discutidos acima, a análise do mapa de contornos g COSY [$^1H \times ^1H$] (**Figura 45**), evidenciaram a conexão da metila desblindada pelo acoplamento vicinal entre 1,42 (*d*, 6,85 Hz, H-35) e 5,11 ppm (*m*, H-34). Os dados encontrados no mapa de contornos de HMBC permitiu verificar os acoplamentos a longa distância 2J entre o carbono C-34 (δ 78,37) e os hidrogênios em δ_H 1,42 (H-35) e δ_H 7,38 (H-33), 3J entre o carbono carbonílico C-1 (δ 175,05) e o sinal do vinílico em δ 7,38 (H-33). Isto confirmou a presença de uma unidade γ -lactona α,β -insaturada. Os acoplamentos 3J entre C-1 (δ 175,05) da carbonila e os hidrogênios metilênicos em δ_H 2,36 (Ha-3) e δ_H 2,47 (Hb-3) confirmou-se a vizinhança alquímica e a conexão ao carbono em δ_C 130,10 (C-2). Vale ressaltar que nesta análise do HMBC, obteram-se os sinais de um carbono carbinólico δ_C 69,0 acoplado com os hidrogênios metilênicos Ha-3 (2,36) e Hb-3 (2,47) (2J) e ainda um acoplamento 3J entre C-5 (36,88) e Ha-3 (2,36) e Hb-3 (2,47), que definiram o posicionamento do grupamento hidroxil em C-4 (**Esquema 21**).

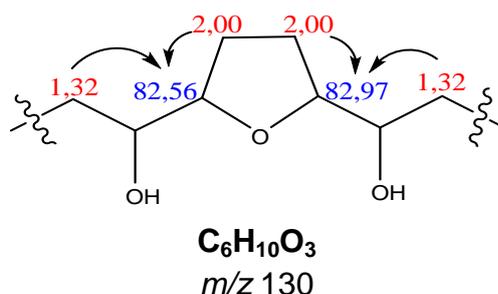


Esquema 21 – Correlações verificadas no mapa de contornos g COSY (A) e HMBC (B) de **M3-22**.

No mapa de contornos HMQC (**Figura 43**), foi possível atribuir o valor dos deslocamentos químicos de todos os carbonos metínicos oxigenados com sinais localizados em δ_C 73,82 (C-22) e 72,59 (C-17), 70,56 (C-10) e 70,97 (C-12) que foram correlacionados por acoplamento direto aos hidrogênios do multipletto em δ_H 3,43 e 3,52-3,63. De forma semelhante, os sinais dos carbonos em δ_C 82,97 (C-18) e 82,56 (C-21) que foram correlacionados com os sinais dos multipletos em δ_H 3,83 ppm.

O mapa de contorno HMBC (**Figura 44**) auxiliou no posicionamento de carbonos metínicos oxigenados, inclusive permitiu atribuir o valor de deslocamento químico dos carbonos metilênicos sobrepostos em δ_{CH_2} 28,20-28,30 (C-19 e C-20) correlacionados aos hidrogênios do multipletto em δ_H 2,0 acoplados a estes.

A análise desses dados confirmaram os acoplamentos 3J entre C-21 (82,56) e H-23 (1,32), 2J entre C-21 (82,56) e H-20 (2,00), 3J entre C-18 (82,97) e H-16 (1,32) e 2J entre C-18 (82,97) e H-19 (2,00) que indicaram um sistema *mono*-THF α , α' -diidroxilado conectado entre duas cadeias alifática laterais (**Esquema 22**). A presença desse sistema foi confirmada pelos fragmentos *m/z* 487 (C₂₆H₄₇O₈, 0,6%), 371 (C₂₀H₃₅O₆, 0,4%), 299 (C₂₂H₄₃O₄, 0,3%), 271,1 (C₁₆H₃₁O₃, 1,0%) e 245 (C₁₃H₂₅O₄, 2,2%) observados nos espectros de massas baixa resolução (**Esquema 28-29**).

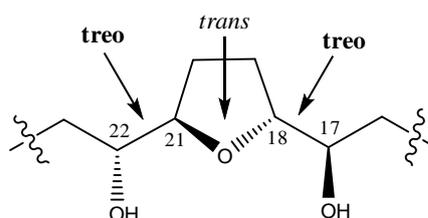


Esquema 22 – Correlações $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ verificadas no HMBC da amostra **M3-22**.

A análise comparativa dos dados de RMN 1H e ^{13}C das amostras M3-22 e F2-C com os modelos de acetogeninas naturais registradas na literatura (**Tabela 5**) permitiu propor uma configuração relativa para o anel mono-tetraidrofurânico como sendo *treo/trans/treo* (**Esquema 23**).

Tabela 5 – Dados de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl₃) de modelos usados para comparação na determinação estrutural e configuração relativa (MCLAUGHLIN et al., 1999; BERMEJO et al., 2005). Deslocamentos químicos em δ (ppm).

Posição			squamoxinona		mosina C		squamoxina		sootepensina-A	
	M3-22	F2-C	A	B	C	D				
1'	72,47	72,59	73,97	74,38	71,52	72,1				
2	82,50	82,55	85,58	82,66	83,18	82,8				
5	82,87	82,86	82,63	82,66	82,14	82,3				
1''	73,74	73,81	74,02	74,28	74,28	74,2				



Esquema 23 – Proposta de configuração relativa do sistema mono-THF para as amostras **M3-22** e **F2-C** com base em dados experimentais.

Além das hidroxilas pertencentes ao sistema do anel *mono*-THF α,α' -diidroxilado (Esquema 22) e da em C-4, foram observados sinais nos espectros de RMN ^1H (**Figura 40**) e ^{13}C -DEPT-Q (**Figura 41**), incluindo HMQC (**Figura 43**) compatíveis para duas hidroxilas adicionais (2xCHOH). Proposição que foi confirmada pelas análises dos espectros dos produtos de acetilação de parte de M3-22 (**Figuras 50-53**) e F2-C (**Figuras 62-65**). Os grupamentos acetoxilas foram detectados no espectro de RMN ^1H com sinais em δ_{H} 2,10, 2,09, 2,07, 2,05 e 2,04, também confirmados pelos sinais no espectro de ^{13}C -DEPT-Q em δ_{C} 170,96, 170,90, 170,75, 170,69 e 170,64 (**Tabela 7**) relativos à carbonila do éster. Observados nos espectros de M3-22 e que foram semelhantes aos encontrados em F2-C (**Tabela 8**).

Estes dados permitem fazer os cálculos abaixo para definir a FM de ambas ACGs. Considerando os valores de m/z detectados no espectro de massas, do íon quase molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 635 do em relativo ao íon aduto sódico, m/z 613,3 relativo ao $[\text{M}+\text{H}]^+$, definindo o fragmento $[\text{M}^+]$ como m/z 612,3. Pôde-se propor a fórmula molecular expandida conforme a equação: $[141 (\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_3) + 130 (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3) + 60 (2\text{xCHOH}) + 14n (\text{CH}_2)_n + 1 (\text{H})]$, obtendo: 362, fazendo a diferença $612 - 362 = 14n$, sendo $n = 20$. Esta análise permitiu propor a estrutura parcial de **ACG2** e **ACG3** (**Figura 36**), sendo $n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = n = 20$.

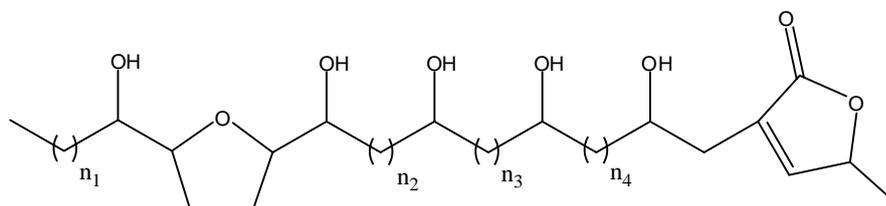
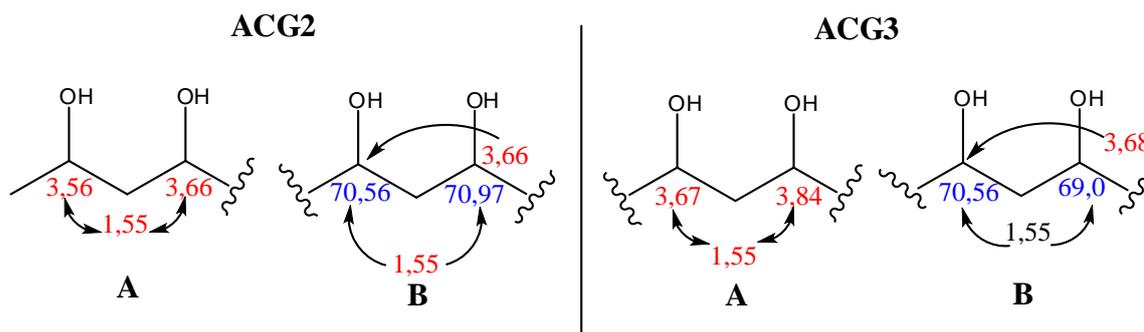


Figura 36 – Proposta estrutura parcial para **ACG2** e **ACG3**

Os grupamentos 1,3 diol nas estruturas **ACG2** e **ACG3** foram identificados pelos sinais observados no mapa de contornos HMQC (**Figura 43**), no qual verificou-se sinais compatíveis para dois carbonos carbinólicos em δ_{C} 70,56 e 70,97 estão ligados aos hidrogênio dos multipletos em δ_{H} 3,66 e 3,56, respectivamente. Pelo mapa de contornos gCOSY [$^1\text{Hx}^1\text{H}$] (**Figura 45**), observou-se que os sinais destes multipletos em δ_{H} 3,66 e 3,56, referentes aos hidrogênios carbinólicos, acoplavam com os hidrogênios metilênicos do multipletos em δ_{H} 1,55 ppm ligados ao δ 40,45 (**Esquema 24**). A confirmação do grupamento 1,3- diol também foi observada no mapa de contornos HMBC, com o acoplamento 2J entre os hidrogênios metilênicos do multipletos em δ_{H} 1,55 com os

carbonos em δ_C 70,56 e 70,97 ppm para **ACG2** e os hidrogênios metilênicos do multipletto em δ_H 1,55 com os carbonos em δ_C 70,56 e 69,0 ppm em **ACG3**.



Esquema 24 – Correlações verificadas para as posições 1,3-diol no mapa de contornos COSY (A) e HMBC (B) para as substâncias **ACG2** e **ACG3**.

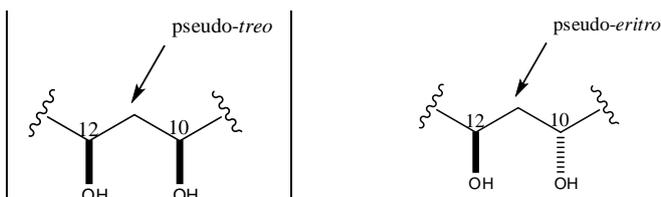
Com as evidências mostradas nos experimentos de RMN 2D e através das fragmentações obtidas nos experimentos de espectrometria de massas de baixa resolução por *eletrospray*, conclui-se que o posicionamento do grupamento 1,3-diol na cadeia lateral hidroxilada, estão localizados nos carbonos C-10 e C-12 para a estrutura **ACG2** e nos carbonos C-4 e C-6 para a estrutura **ACG3**.

As acetogeninas muricatocin A, B e C, isoladas de folhas de *Annona muricata* (McLAUGHLIN et al., 1995b;c) apresentam sistema 1,3-dihidroxi na cadeia alifática e são também descritos na literatura padrões de oxidação na cadeia alifática lateral ao anel lactônico nas posições C-5 à C-12 das acetogeninas (BERMEJO et al., 2006; MCLAUGHLIN et al., 1999).

A análise comparativa dos dados de RMN 1H e ^{13}C encontrados para as substâncias propostas **ACG2** e **ACG3** com modelos naturais relatados na literatura confirmaram a configuração *pseudo-treo*, do grupamento 1,3-diol em ambas propostas estruturais (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Dados de RMN 1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) das substituições hidroxiladas na cadeia alifática (McLAUGHLIN et al., 1995b;c) em comparação com as substância **ACG2** e **ACG3**.

C	ACG2		ACG3		Muricatocin C		Muricatocin A		Muricatocin B	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
10/4	70,56	3,59 (m)	69,0	3,84 (m)	69,62	3,94 (m)	72,88	3,94(m)	72,87	3,94 (m)
11/5	40,45	1,55 (m)	40,44	1,56 (m)	42,67	2,01 (m)	42,94	2,00(m)	42,95	2,01 (m)
12/6	70,97	3,80 (m)	70,36	3,67 (m)	69,23	3,86 (m)	72,60	3,86(m)	72,63	3,86 (m)



A análise de espectrometria de massas permitiu confirmar a proposta do grupamento 1,3-diol nos carbonos C-10 e C-12 na estrutura de **ACG2 (Figura 46-47)**, pelos fragmentos observados nos espectros de baixa resolução m/z 255 ($C_{14}H_{23}O_4$, 0,2%), seu respectivo fragmento m/z 237 ($C_{14}H_{21}O_3$, 0,2%) de perda de H_2O , 243 ($C_{13}H_{23}O_4$, 0,2%) referente à quebra da ligação C-10 e C-11 e m/z 199 ($C_{11}H_{19}O_3$, 2,4%) referente à ligação C-8 e C-9, que comprova a presença de apenas uma hidroxila em C-4 (**Esquema 25**). Os sinais de interação dos hidrogênios H-3a e H-36 com o carbono C-4 justificam a posição do HO-4, apesar da ausência do fragmento m/z 141 correspondente a quebra α C-7 em C-4/C-5.

Para a definição do posicionamento das três hidroxilas remanescentes, os experimentos dos espectrometros de massas de baixa resolução da amostra original (**Figura 46-47**), foram analisados para propor dois modelos estruturais para as substâncias isoméricas em M3-22 e F2-C, pelo posicionamento dos grupamentos hidroxil (1,3-diol) na cadeia lateral tetraidroxilada (**Figura 37**).

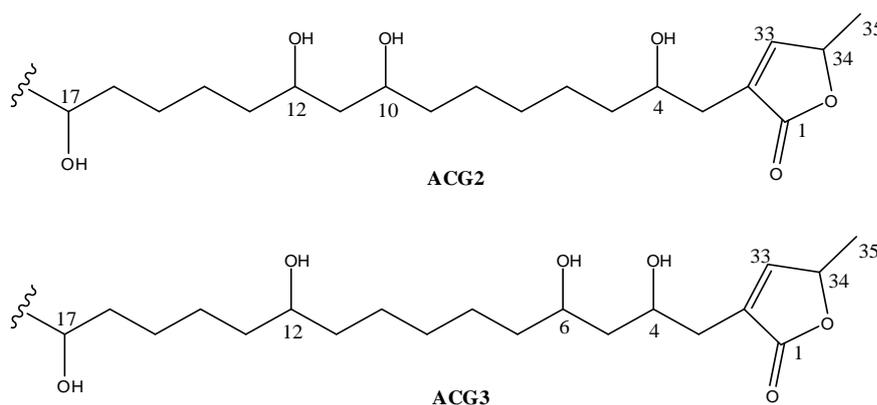
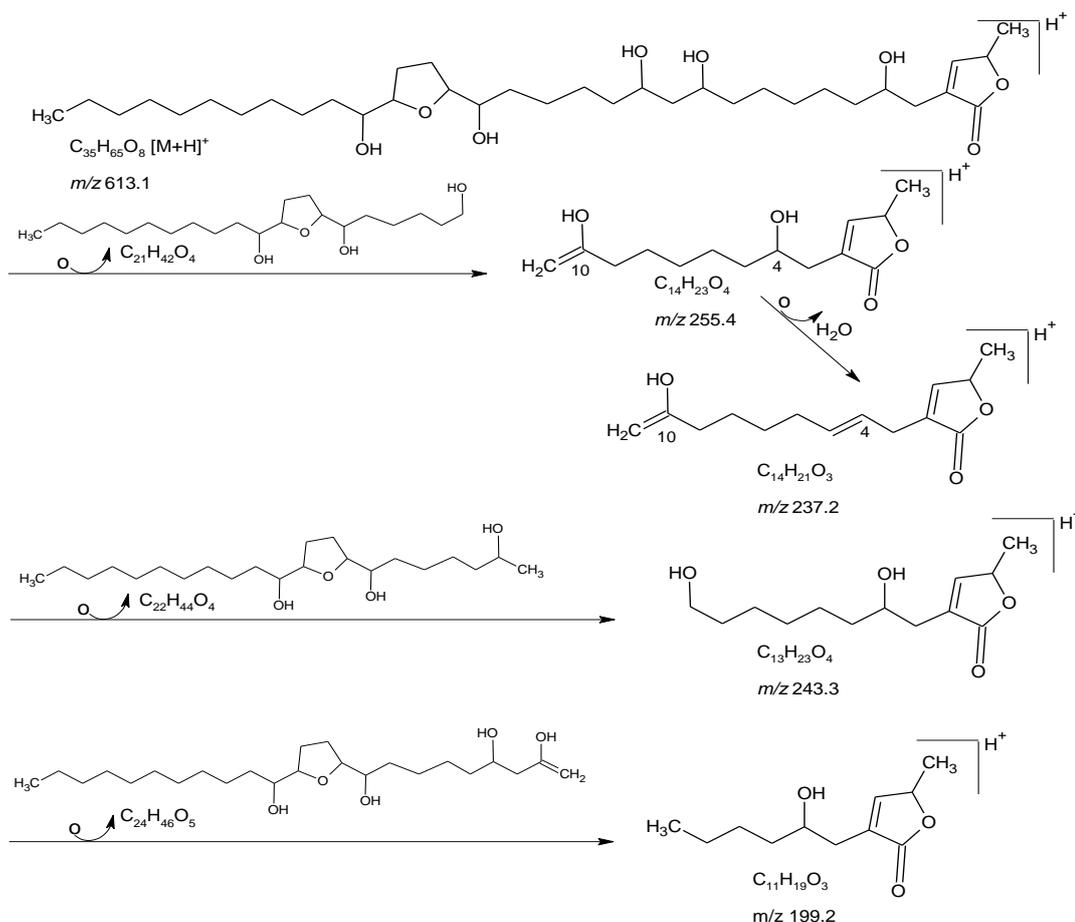


Figura 37 – Propostas estruturais da porção alifática α -lactona das posições dos grupamento hidroxil para as **ACG2** e **ACG3**

Os espectros de massas também apresentaram fragmentos relativos à perda de água como m/z 595 [$C_{35}H_{65}O_8-1H_2O$], m/z 577 [$C_{35}H_{63}O_7-1H_2O$], m/z 559 [$C_{35}H_{61}O_6-$

1H₂O], *m/z* 541 [C₃₅H₅₉O₅-1H₂O] e *m/z* 523 [C₃₅H₅₇O₄-1H₂O] (**Esquema 27**) e contração do anel devido à perda íon acílio de razão *m/z* 477 (C₃₄H₅₃O, 0,1%) (**Esquema 29**).



Esquema 25 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de **ACG2**. Espectros **Figura 46-47**.

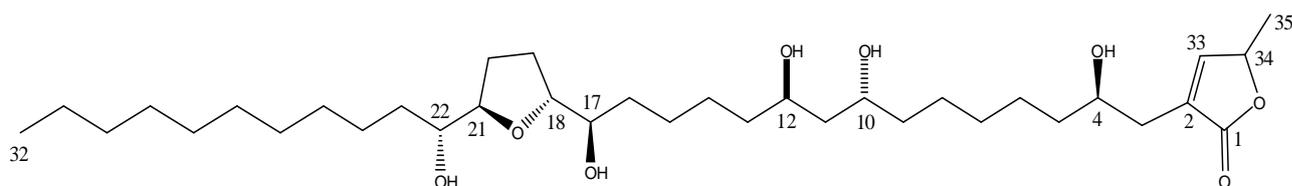
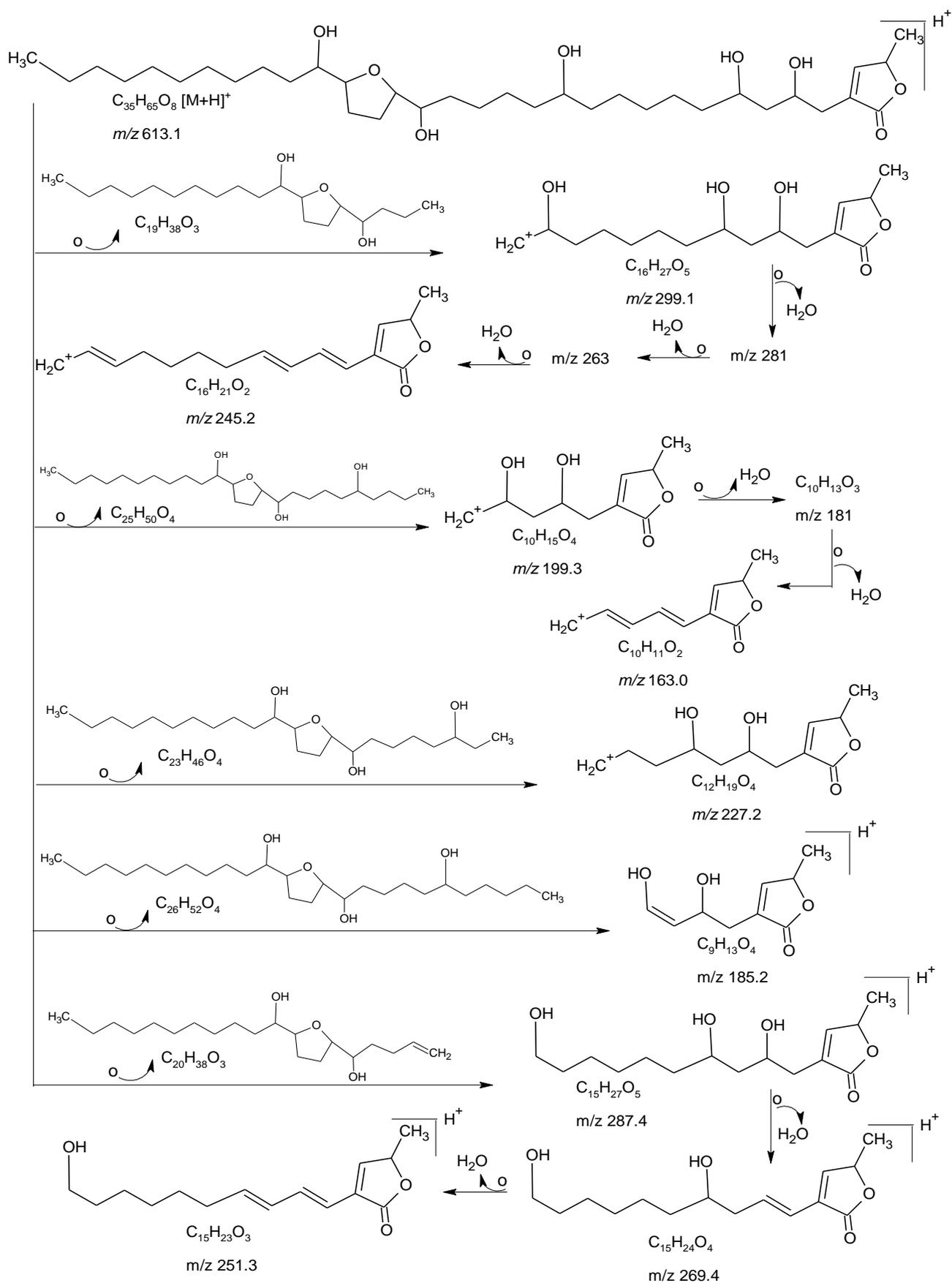


Figura 38 – Estrutura de **ACG2**

A análise de espectrometria de massas também permitiu posicionar o grupamento 1,3-diol nos carbonos C-4 e C-6 na estrutura de **ACG3** (**Figura 35**). Os possíveis fragmentos para os picos, com razão *m/z* 199 (C₁₀H₁₅O₄, 1,8%) referente à quebra da ligação C-7 e C-8 e os respectivos fragmentos de perda de H₂O, 181 [C₁₀H₁₅O₄-1H₂O] e 163 [C₁₀H₁₅O₄-2H₂O], o *m/z* 227 (C₁₂H₁₉O₄, 0,5%), relativo ao rompimento da ligação C-9 e C-10, em *m/z* 185 (C₉H₁₃O₄, 1,0%) referente à quebra da ligação C-6 e C-7 pode comprovar a presença de duas hidroxilas sendo uma em C-4 (**Esquema 30**).



Esquema 26 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de **ACG3**. Espectros **Figura 46-49**.

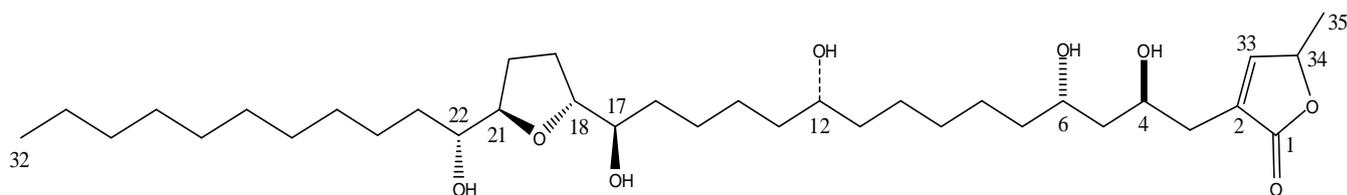
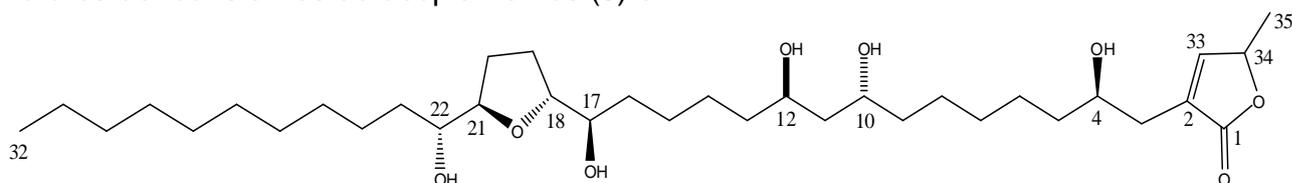


Figura 39 – Estrutura de ACG3

Com a análise de todos os dados espectrométricos, fundamentados pelas fragmentações propostas para justificar os picos observados nos espectros de massas de baixa resolução, conclui-se que as substâncias **ACG2** e **ACG3** são duas acetogeninas do tipo mono-THF, que até o momento são inéditas na família Annonaceae, com fórmula molecular $C_{35}H_{65}O_8$ (calculado 613,8635) compatível com o fragmento m/z 613,46960 correspondendo ao $[M+H]^+$ obtido no espectrômetro de massas de alta resolução (**Figura 48-49**).

Estas foram nomeadas com base em relatos na literatura para substâncias pertencentes à mesma classe de metabólitos secundários (BERMEJO et al., 2006; McLAUGHLIN et al., 1996) como **coriapentocina A** e **coriapentocina B**, respectivamente.

Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da amostra M3-22 (**ACG2**), incluindo-se resultados obtidos através de espectros 2D HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos em δ (ppm) e valores de constantes de acoplamentos (J) em Hz*.



M3-22 (ACG2)				M3-22 acetilado (ACG2a)		
	HMQC		HMBC	HMQC		HMBC
C	δ_{C}^{**}	δ_{H}^{**}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	
1	175,05	-	H-33; Ha-3; Hb-3	173,53	-	-
2	130,10	-	H-34; Ha-3; Hb-3; H-5	130,14	-	-
OAc	-	-	-	170,96	-	2,10 (s)
OAc	-	-	-	170,90	-	2,09 (s)
OAc	-	-	-	170,75	-	2,07 (s)
OAc	-	-	-	170,69	-	2,05 (s)
OAc	-	-	-	170,64	-	2,04 (s)
CH						
4	69,00	3,83 (<i>m</i>) [#]	Ha-3; Hb-3	69,34	4,84 (<i>m</i>);	-
10	70,97	3,52-3,63 (<i>m</i>) [#]	H-11	71,84	4,84 (<i>m</i>);	-
12	70,56	3,67-3,71 (<i>m</i>) [#]	H-10; H-11	70,36	4,97 (<i>m</i>);	-
17	73,82	3,43 (<i>m</i>) [#]	-	74,95	4,84 (<i>m</i>)	-
18	82,97	3,83 (<i>m</i>)	H-19/20; H-16	79,69	3,97 (<i>m</i>);	-
21	82,56	3,83 (<i>m</i>)	H-19/20; H-23	79,94	3,97 (<i>m</i>)	-
22	72,59	3,43(<i>m</i>) [#]	-	73,62	4,84(<i>m</i>)	-
33	152,98	7,38 (s)	H-33; H-34 Hb-3; Ha-3	151,01	7,10 (s)	H-34
34	78,37	5,11 (<i>m</i>)	H-33	77,59	5,03 (<i>q</i> , 7,0)	-
CH₂						
3	32,57	2,36 (<i>dd</i> , Ha-3) 2,45 (<i>m</i> , Hb-3)	H-33; H-5	34,06	1,26 (<i>m</i>)	-
5	36,88	1,32 (<i>m</i>) [#]	Ha-3; Hb-3	35,36	1,26 (<i>m</i>)	-
6-9	22,38-37,03	1,32 (<i>m</i>)	-	35,36- 25,40	1,26 (<i>m</i>)	-
11	40,45	1,55 (<i>m</i>) [#]	-			
13-16	22,38-37,03	1,32 (<i>m</i>)	-	35,36- 25,40	1,26 (<i>m</i>)	-
19/20	28,30-28,20	2,00 (<i>m</i>) [#]	-	35,36- 25,40	1,26 (<i>m</i>)	-
23-31	22,38-37,03	1,32 (<i>m</i>)	-	25,17- 31,92-	1,26 (<i>m</i>)	-
CH₃						
32	13,10	0,93 (<i>t</i> , 6,5)	H-31	14,14	0,89 (<i>d</i> , 6,5)	22,70; 31,92
35	17,78	1,42 (<i>d</i> , 6,8)	H-34	18,94	1,41 (<i>d</i> , 6,5)	H-33; H-34
OAc	-	-	-	21,24	2,09 (s)	-
OAc	-	-	-	21,18	2,07 (s)	-
OAc	-	-	-	21,16	2,05 (s)	-
OAc	-	-	-	21,13	2,04 (s)	-
OAc	-	-	-	21,00	2,10 (s)	-

* O espectro 2D ^1H - ^1H -COSY também foi usado nesta interpretação de resultados experimentais.

** Outros valores em menor intensidade justificam a presença de outro componente na fração.

Os sinais estão sobrepostos

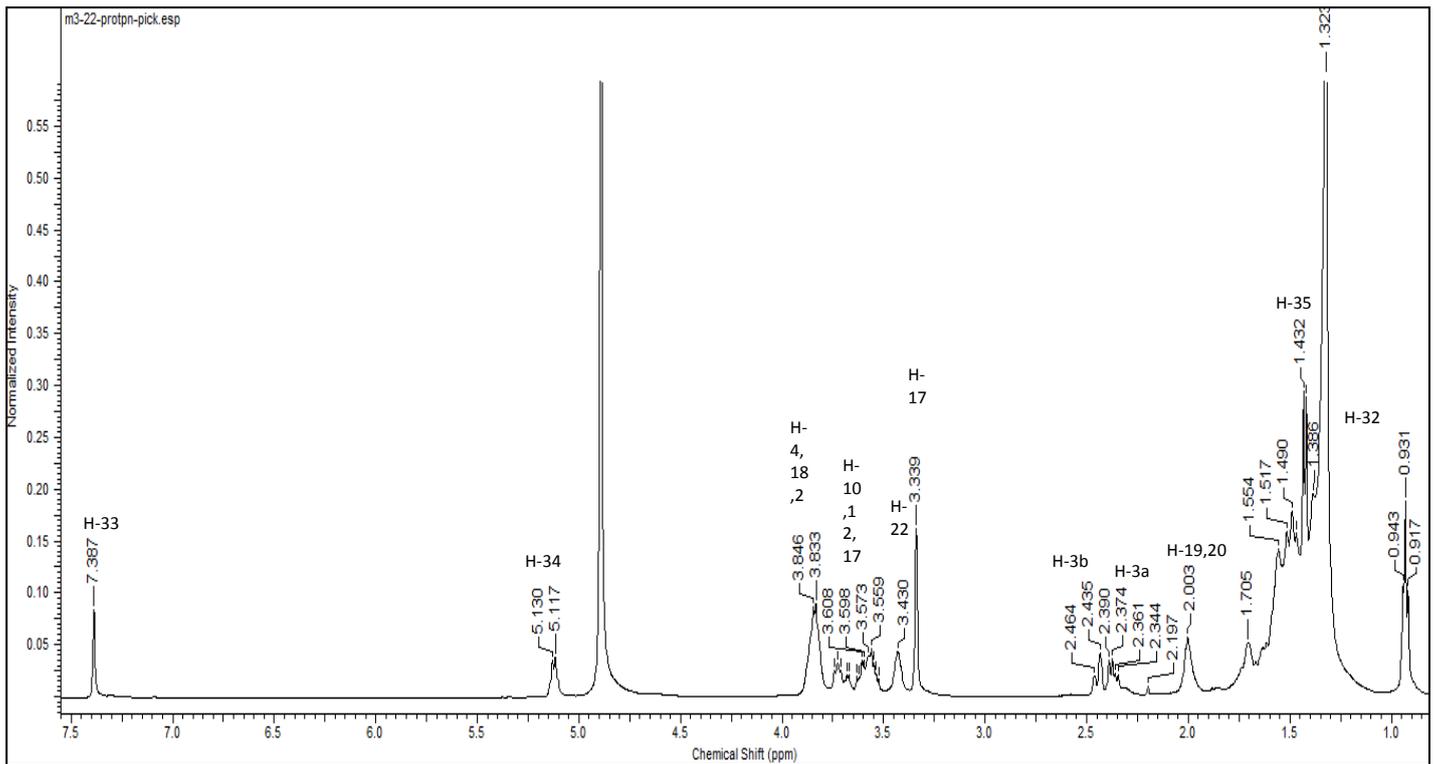


Figura 40 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de **ACG2** obtido em CD_3OD

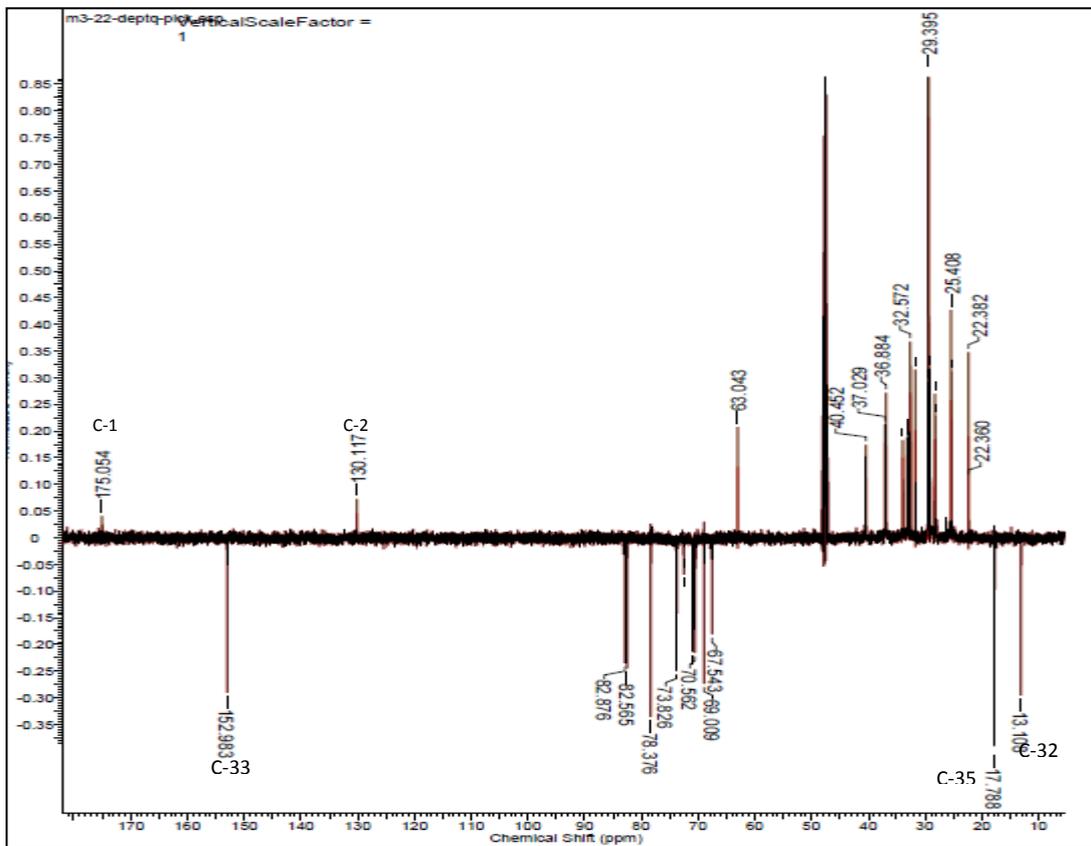


Figura 41 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de **ACG2** em CD_3OD .

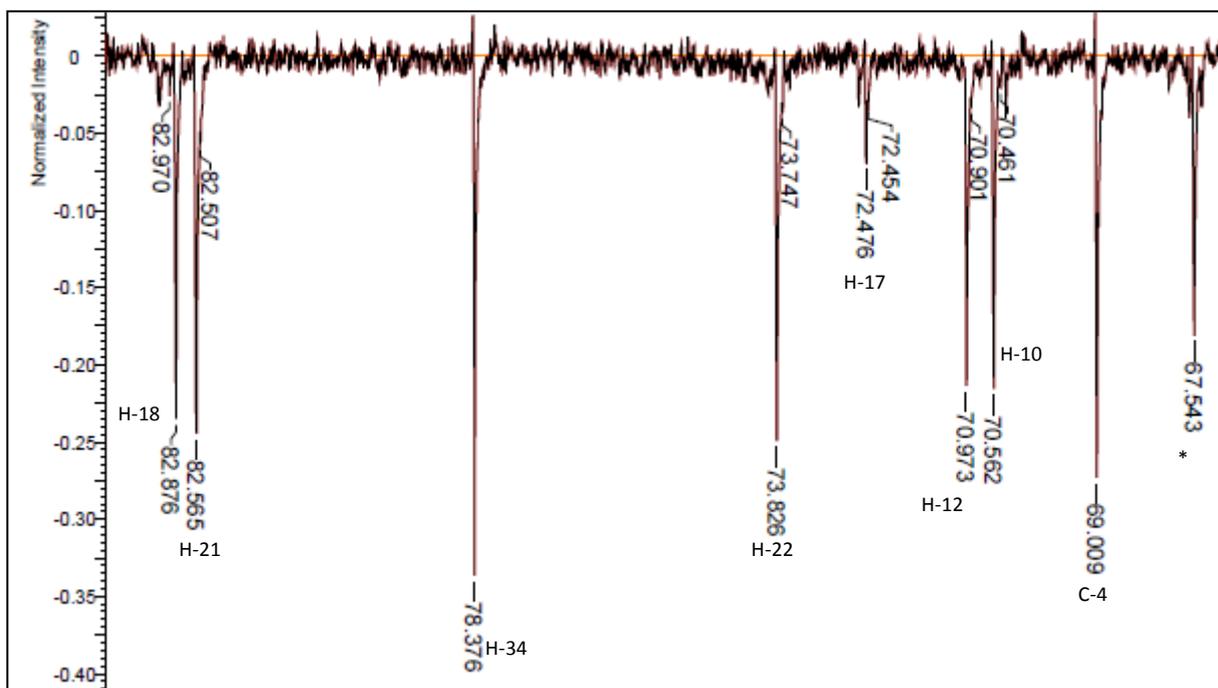


Figura 42 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de **ACG2** em CD_3OD .

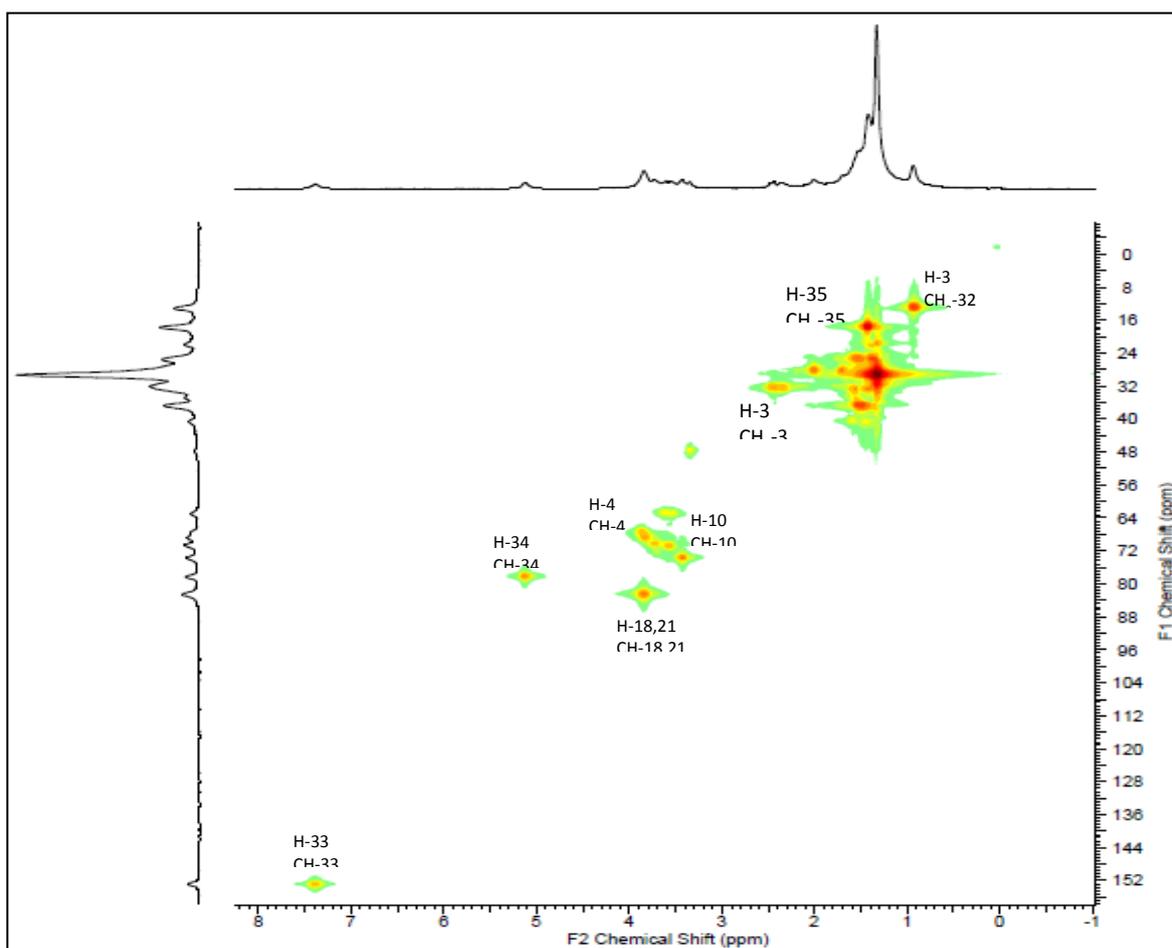


Figura 43 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMQC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de **ACG2** em CD_3OD

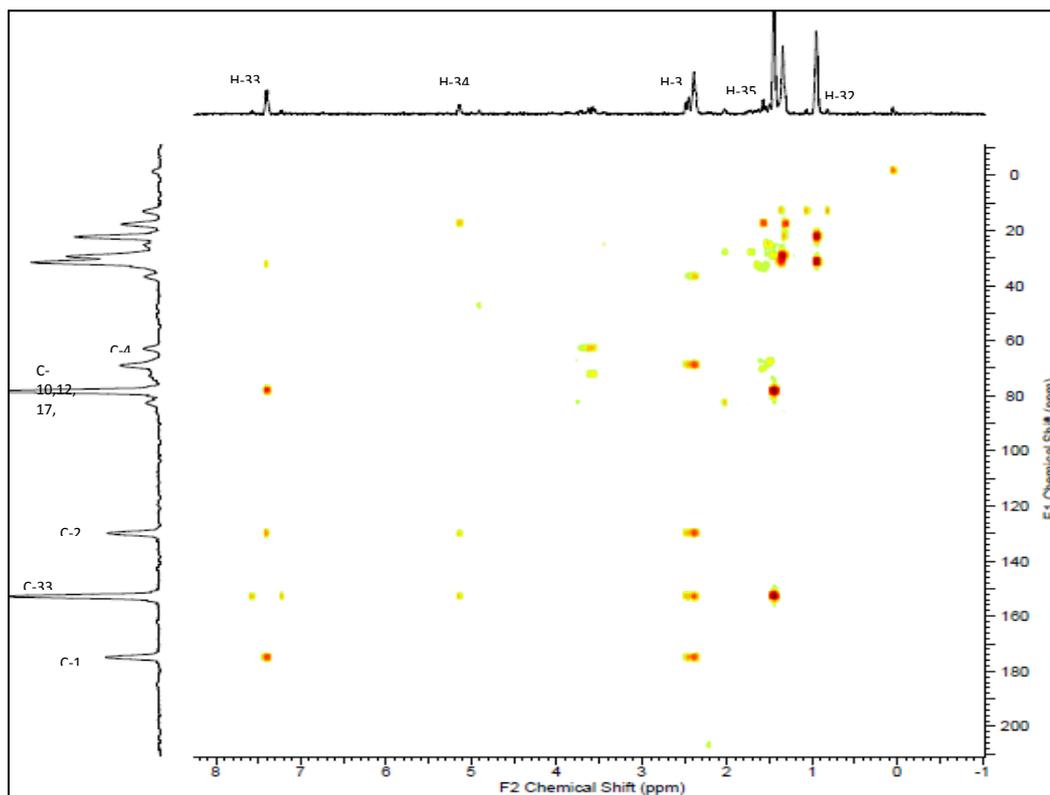


Figura 44 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMBC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de **ACG2** em CD_3OD

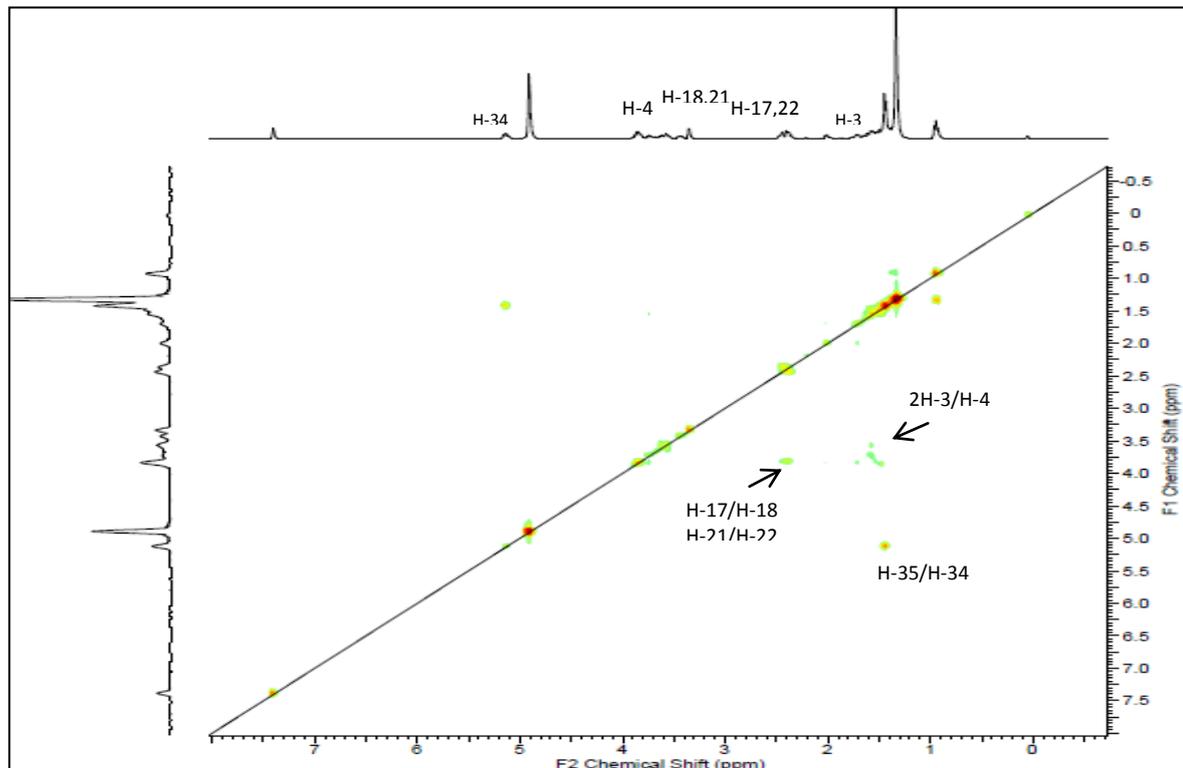


Figura 45 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) COSY (^1H :500 MHz) de **ACG2** em CD_3OD

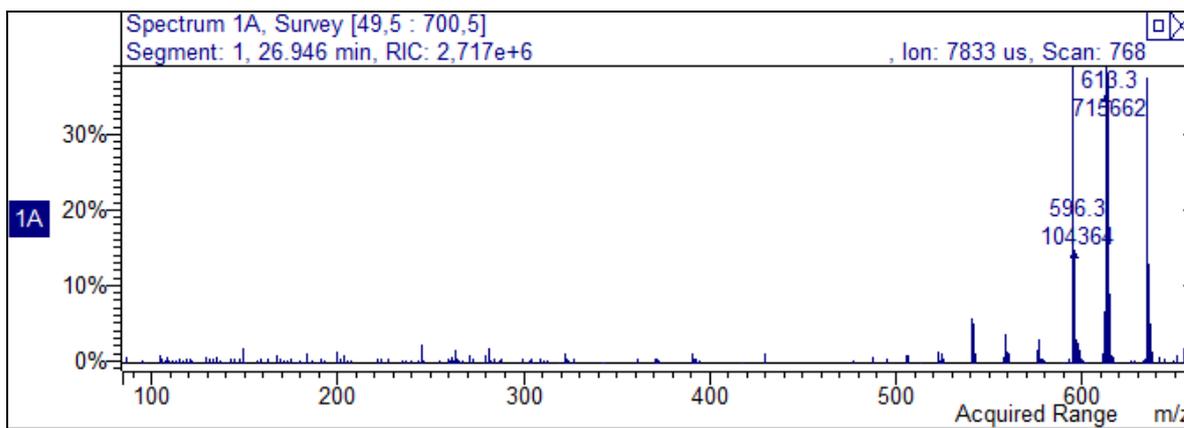


Figura 46 – Espectro de massas de baixa resolução de **ACG2** obtido através de ionização por eletrospray (EM-ESI).

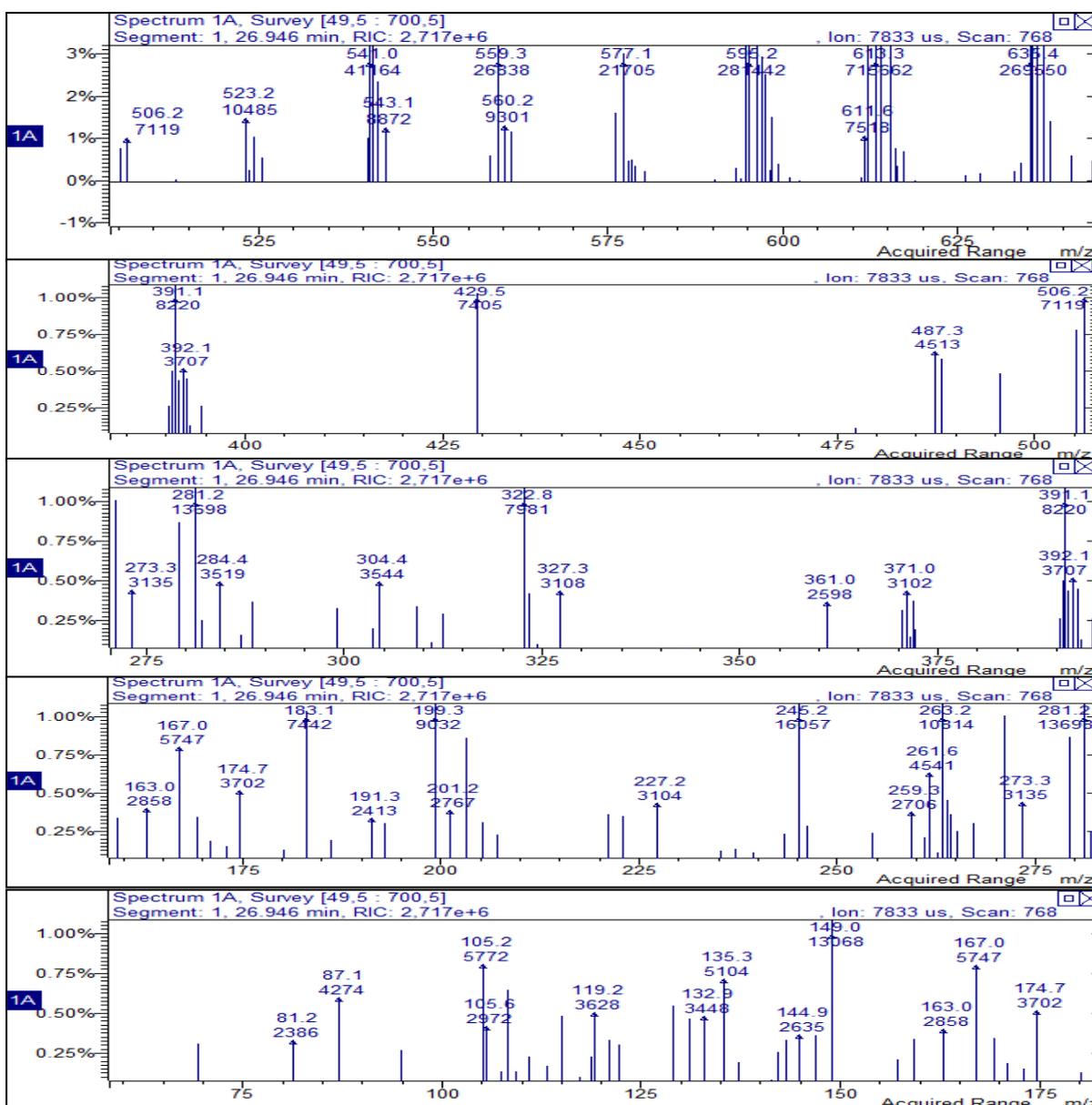


Figura 47 – Espectros/ampliação de massas de **ACG2** obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução em modo positivo.

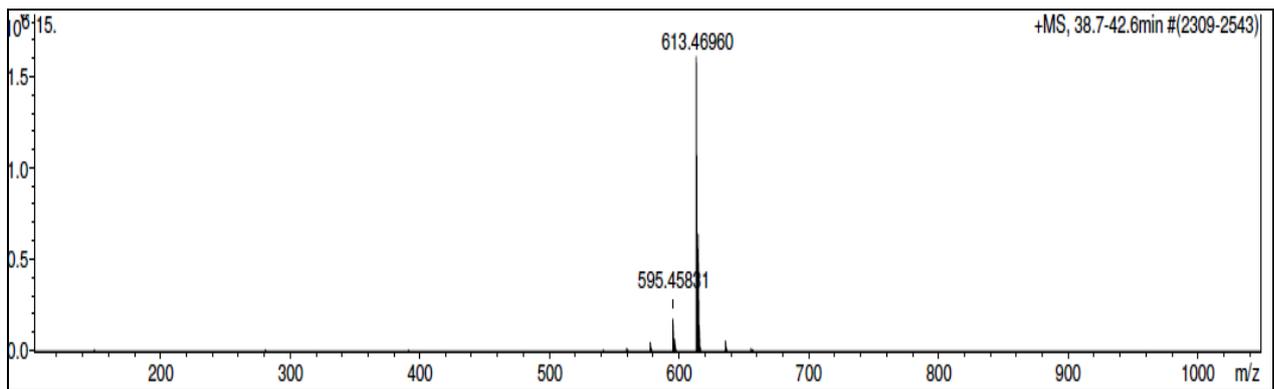


Figura 48 – Espectro de massas de alta resolução de **ACG2** obtido através de ionização por eletrospray (**EM-ESI**).

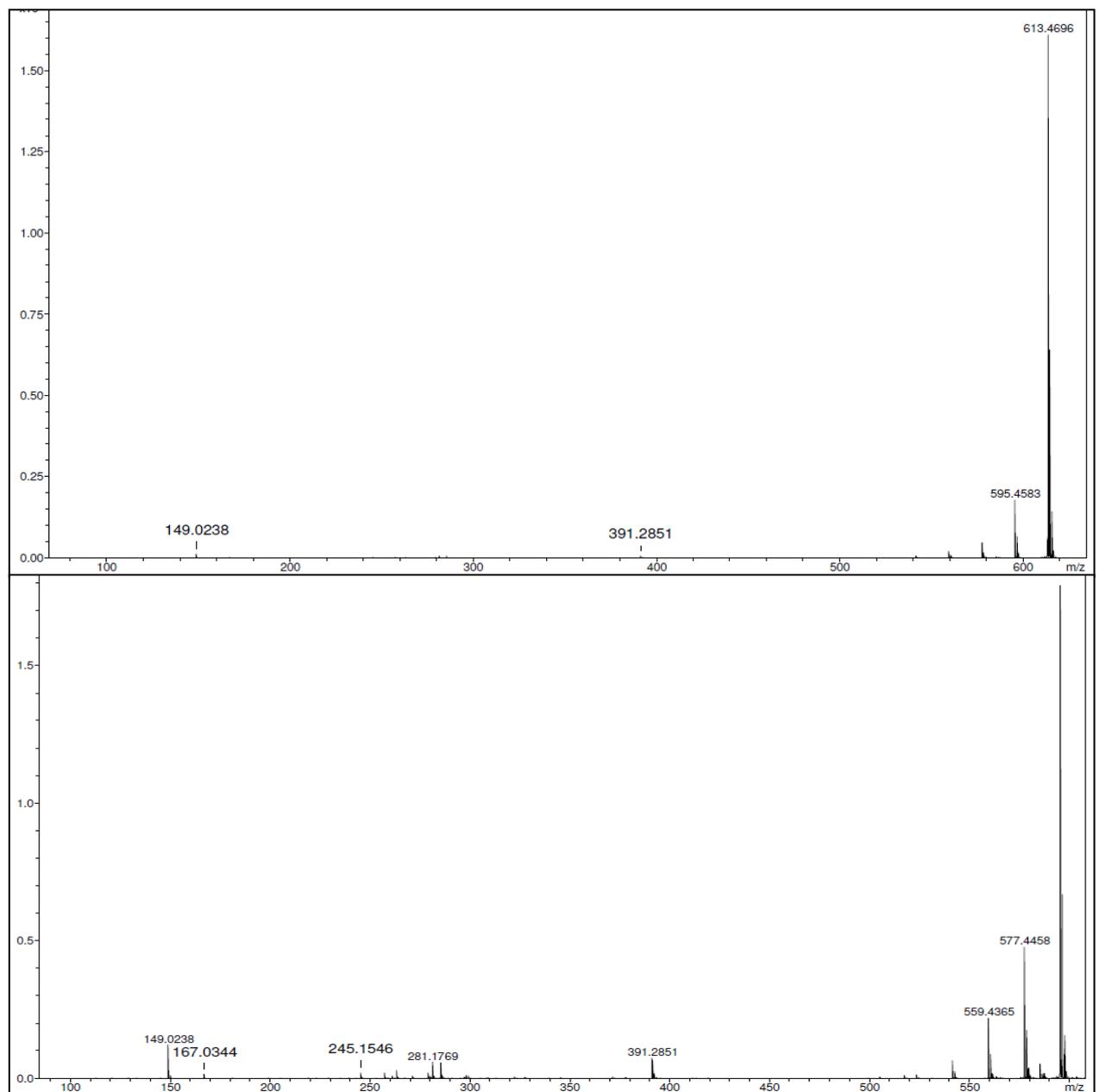


Figura 49 – Espectros/ampliação de massas de **ACG2** obtido em CLAE-EM-ESI alta resolução em modo positivo

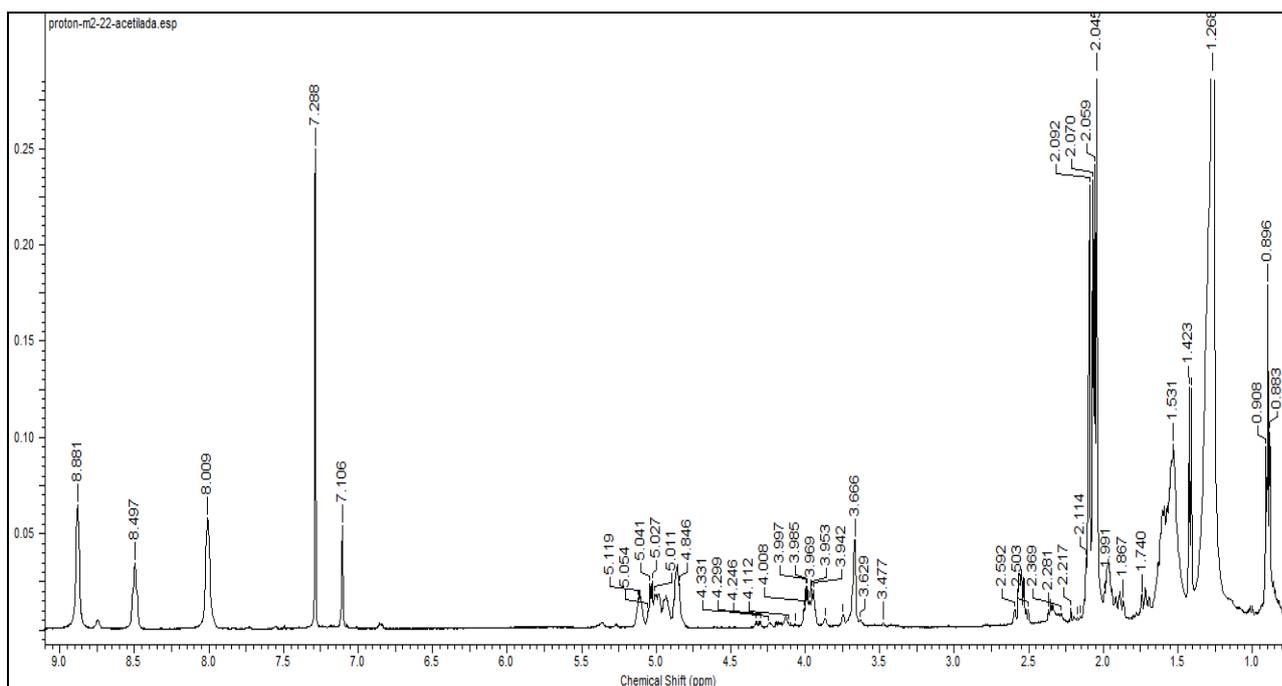


Figura 50– Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de **ACG2a** obtido em CDCl_3

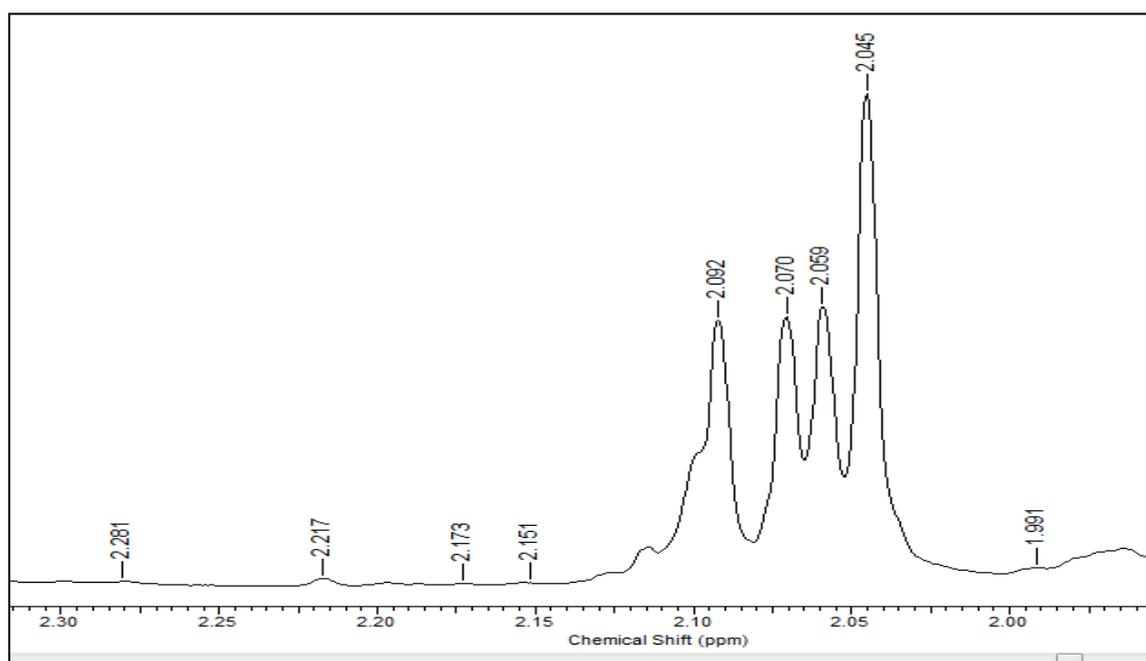


Figura 51 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de **ACG2a** obtido em CDCl_3

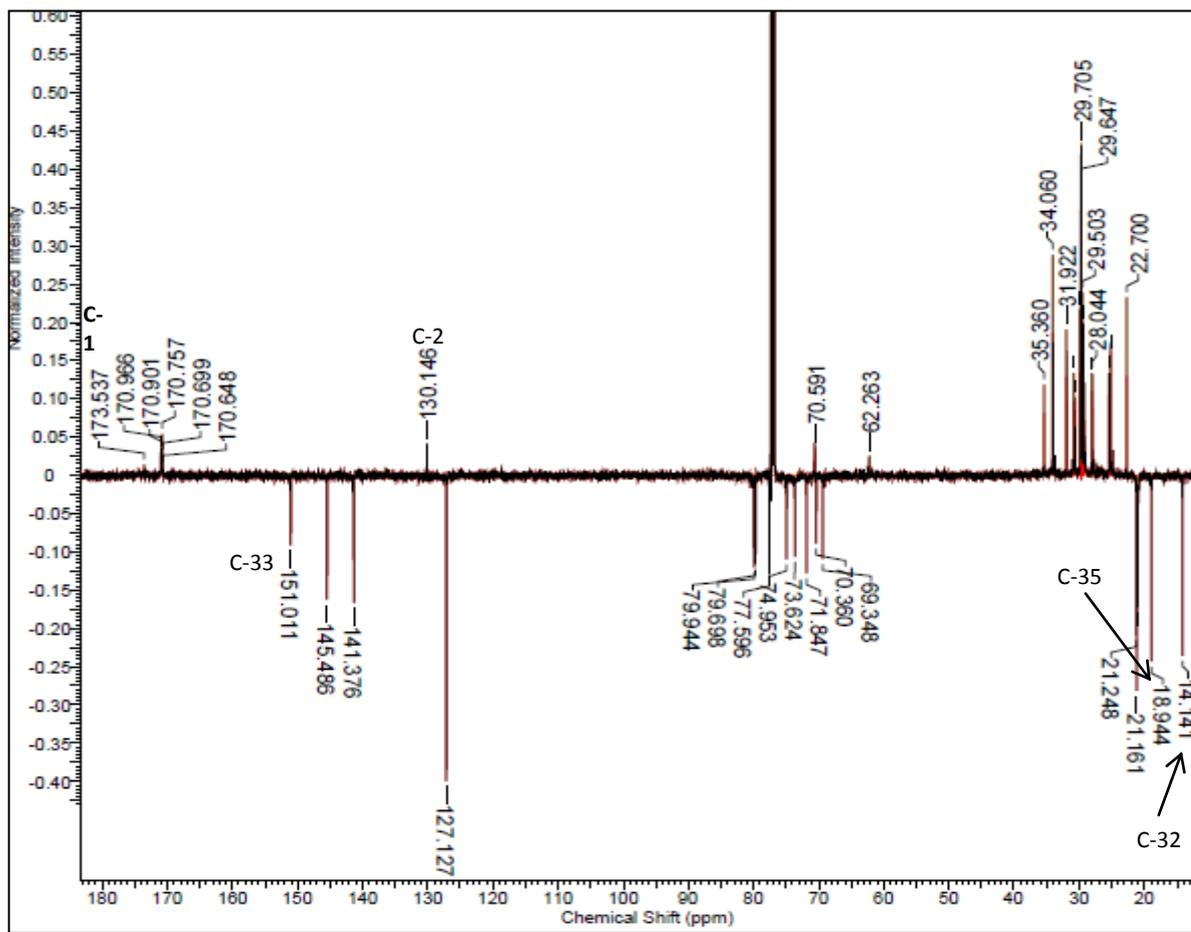


Figura 52 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de **ACG2a** em CDCl_3

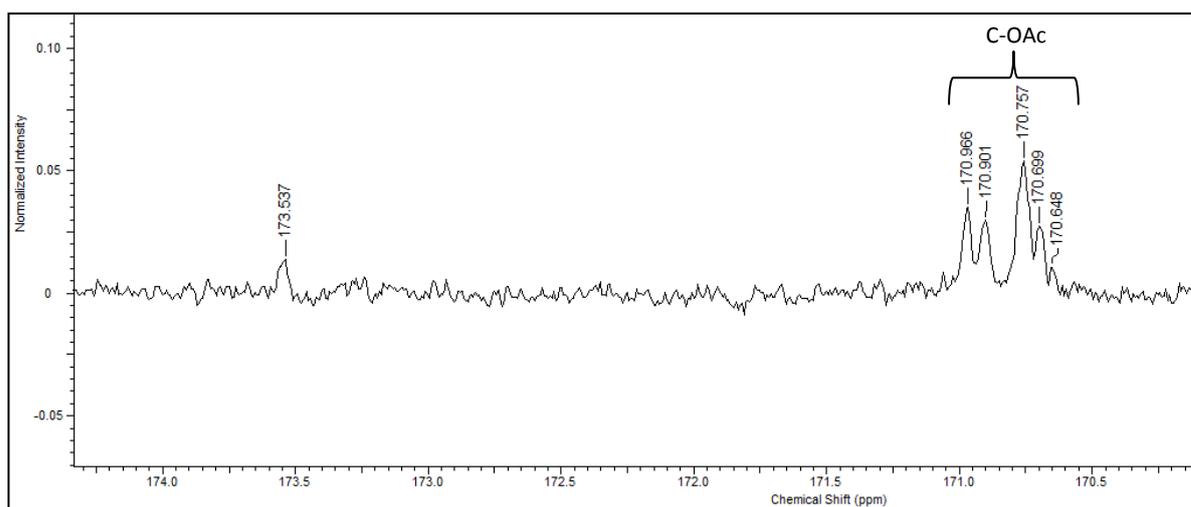
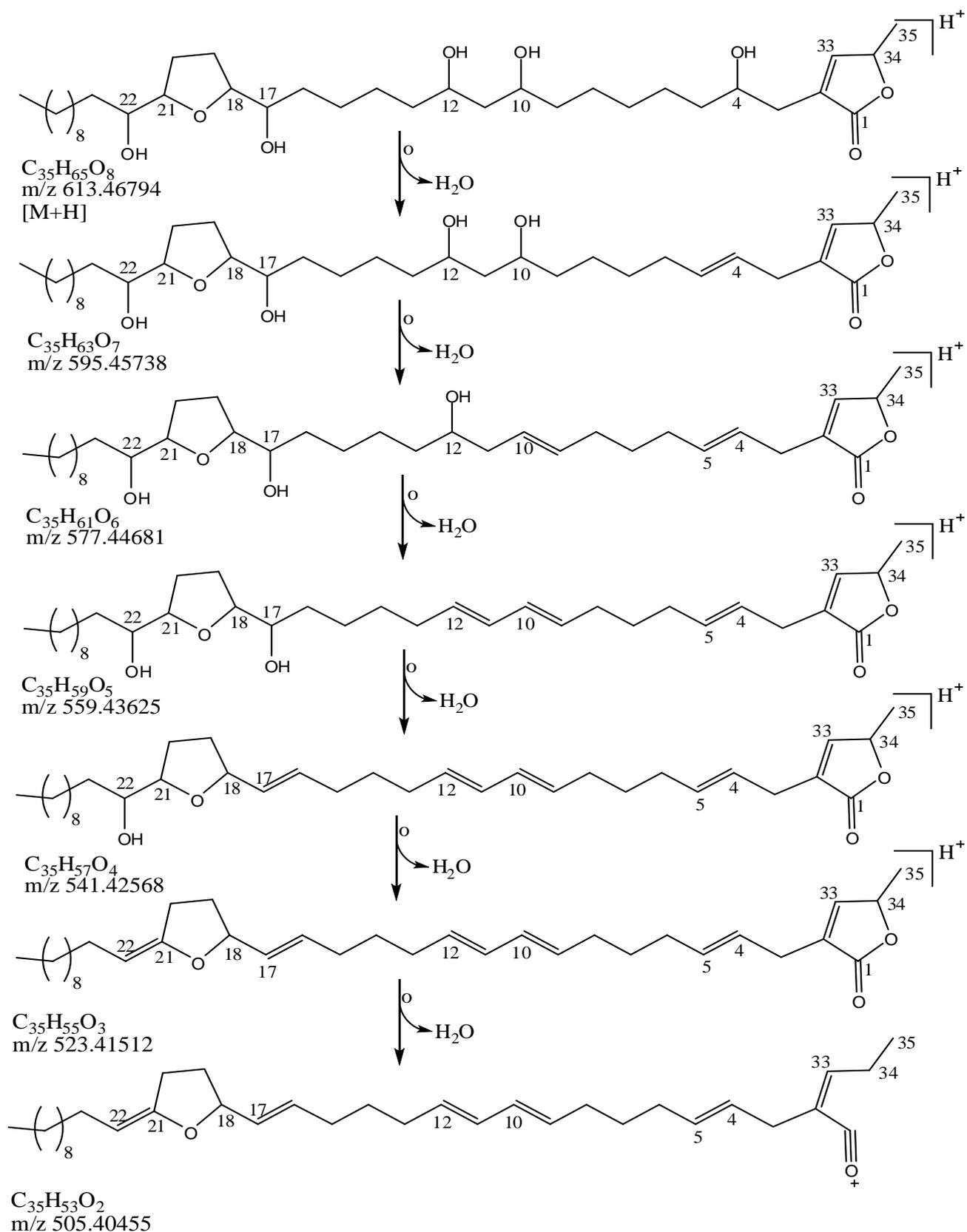
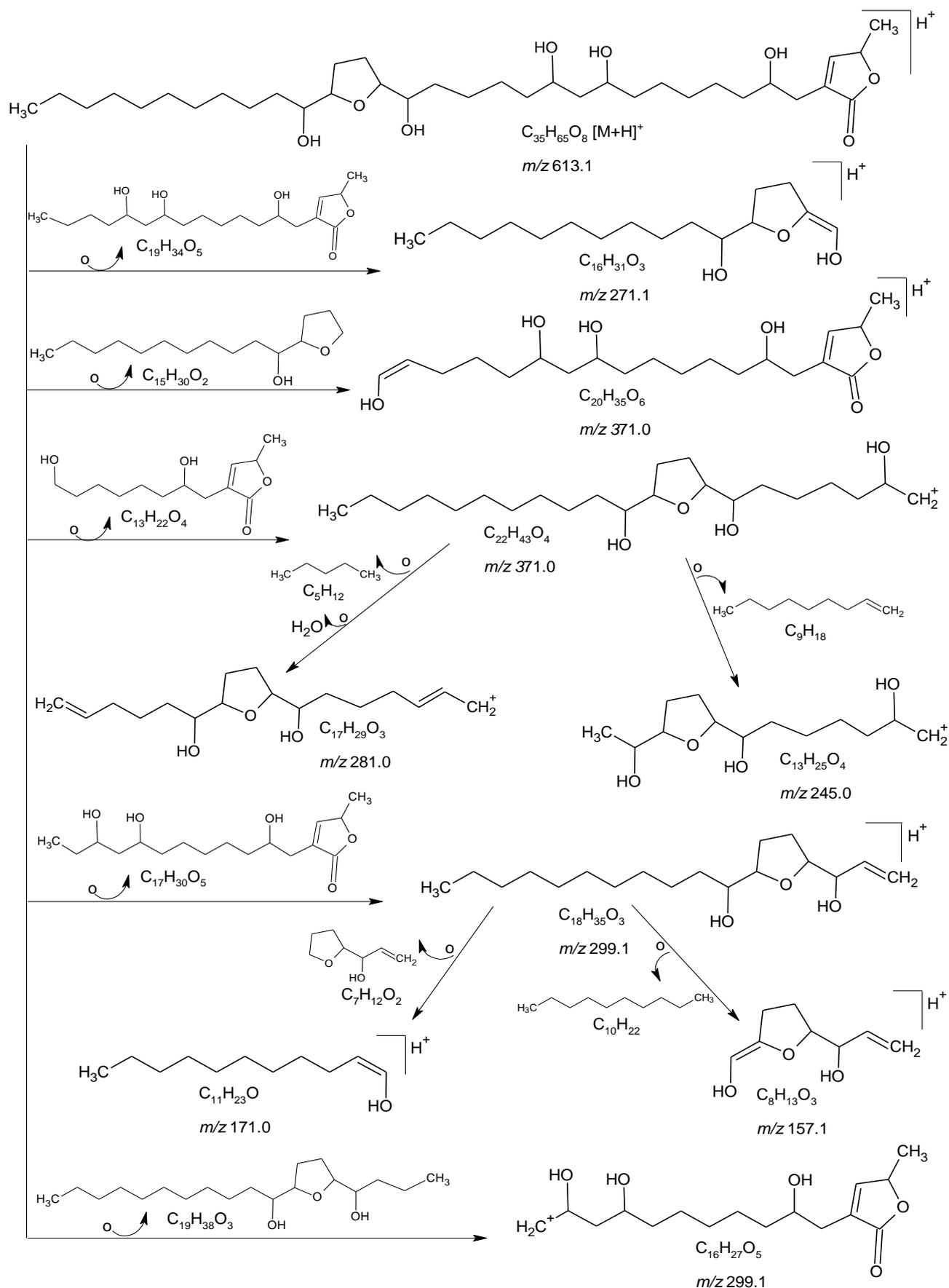


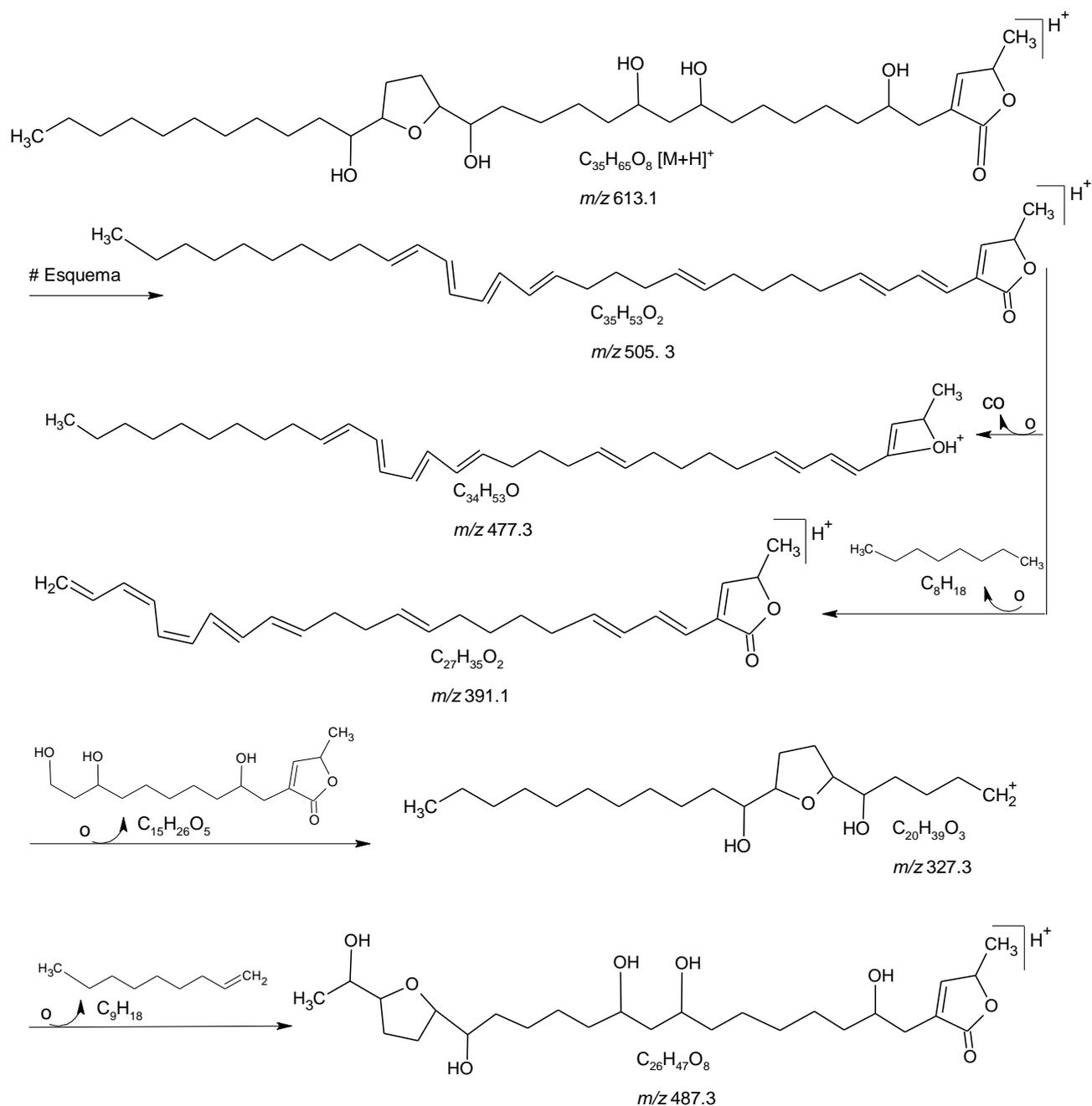
Figura 53 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de **ACG2a** em CDCl_3



Esquema 27 – Propostas de fragmentações de perdas de H_2O para justificar alguns picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de **ACG2**. Espectros em **Figuras 46-49**.

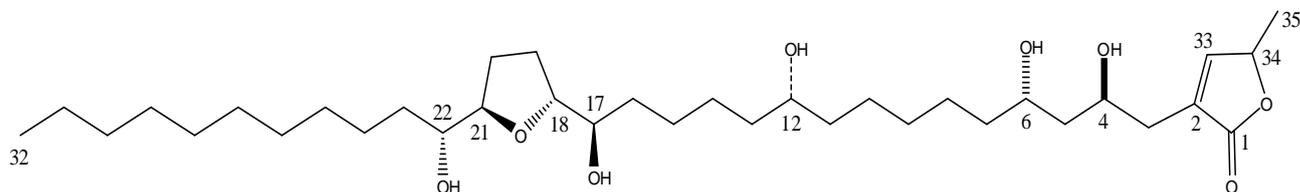


Esquema 28 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de **ACG2**. Espectros em **Figuras 46-49**.



Esquema 29 – Proposta de fragmentação para justificar os picos detectados no espectro de massas (EM-ESI) de **ACG2**. Espectros em **Figura 46-47**.

Tabela 8 – Dados de RMN ^1H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) da amostra F2-C contendo **ACG3**, incluindo-se resultados obtidos através de espectros 2D HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos em δ (ppm) e valores de constantes de acoplamentos (J) em Hz*.



	F2-C (ACG3)			F2-C acetilado (ACG3a)	
	HMQC		HMBC	δ_{C}	δ_{C}
C	** δ_{C}	** δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1	175,06	-	H-34; Ha-3	175,37	-
2	130,11	-	H-34; H-35; Ha-3; Hb-3	133,14	-
OAc	-	-	-	175,34	-
OAc	-	-	-	175,32	-
OAc	-	-	-	175,22	-
OAc	-	-	-	175,10	-
OAc	-	-	-	175,06	-
CH					
4	69,00	3,84 (<i>m</i>) [#]	Ha-3; Hb-3; H-5	73,28	5,11 (<i>m</i>)
6	70,36	3,67 (<i>m</i>) [#]	H-5; H-4	75,63	5,04 (<i>m</i>)
12	70,54	3,57 (<i>m</i>) [#]	H-10	74,82	5,03 (<i>m</i>)
17	73,81	3,42 (<i>m</i>) [#]	-	79,07	4,84-4,88 (<i>m</i>)
18	82,86	3,81-3,87 (<i>m</i>) [#]	H-19; H-16	83,93	4,93 (<i>m</i>)
21	82,55	3,81-3,87 (<i>m</i>)	H-20; H-23	83,71	4,93 (<i>m</i>)
22	73,81	3,42 (<i>m</i>)	-	82,18	4,84-4,88 (<i>m</i>)
33	152,97	7,38 (<i>s</i>)	Ha-3; Hb-3; H-35; H-34	157,02	7,28 (<i>s</i>)
34	78,37	5,12 (<i>q</i> , 13)	H-33; H-35	77,36	5,01 (<i>m</i>)
CH₂					
3	32,93	2,36(<i>m</i>); 2,46(<i>m</i>)		31,62	2,38 (<i>m</i>)
5	40,44	1,55 (<i>m</i>) [#]	-	38,75	1,27 (<i>m</i>)
7-11	22,36-37,07	1,36 (<i>m</i>) [#]	-	26,29-37,59	1,27 (<i>m</i>)
13-16	22,36-33,07	1,36 (<i>m</i>)	-	26,29-37,59	1,87 (<i>m</i>)
19/20	28,27-28,17	2,00 (<i>m</i>) [#]	H-18;H-21	28,63-28,93	1,87 (<i>m</i>)
23-31	22,36-33,07	1,36 (<i>m</i>)	-	26,29-37,59	1,27 (<i>m</i>)
CH₃					
32	13,05	0,92 (<i>t</i> , 6,5)	-	17,01b	0,90 (<i>t</i> , 6,5)
35	17,74	1,42 (<i>d</i> , 6,5)	-	21,47b	1,41 (<i>d</i> , 6,5)
AcO	-	-	-	23,40	2,105
AcO	-	-	-	23,61	2,097
AcO	-	-	-	23,65	2,076
AcO	-	-	-	23,69	2,064
AcO	-	-	-	23,73	2,050

*O espectro 2D ^1H - ^1H -COSY também foi usado nesta interpretação de resultados experimentais.

**Outros valores em menor intensidade justificam a presença de outro componente na fração.

Os sinais estão sobrepostos

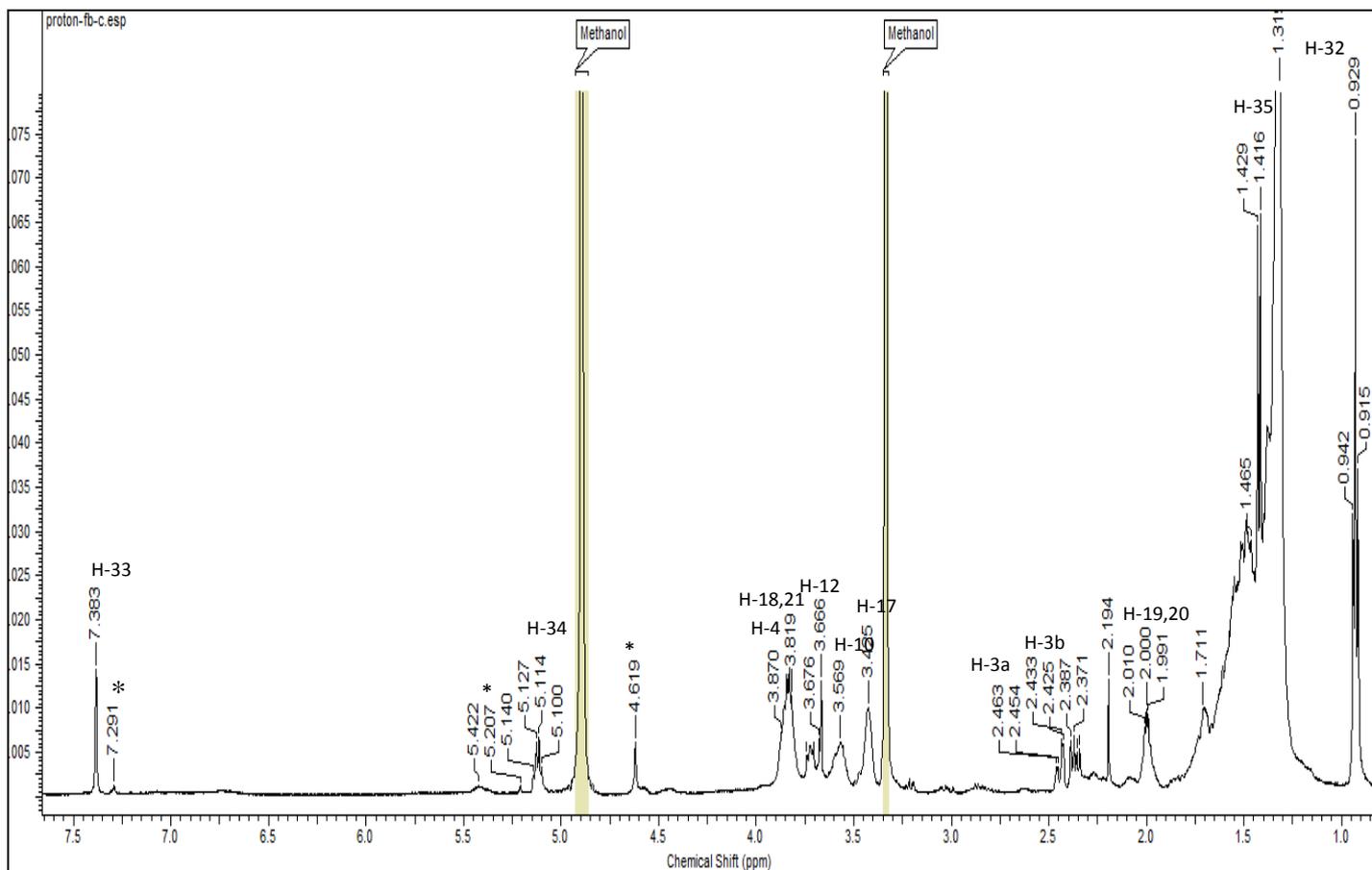


Figura 54 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de **ACG3** obtido em CD_3OD .

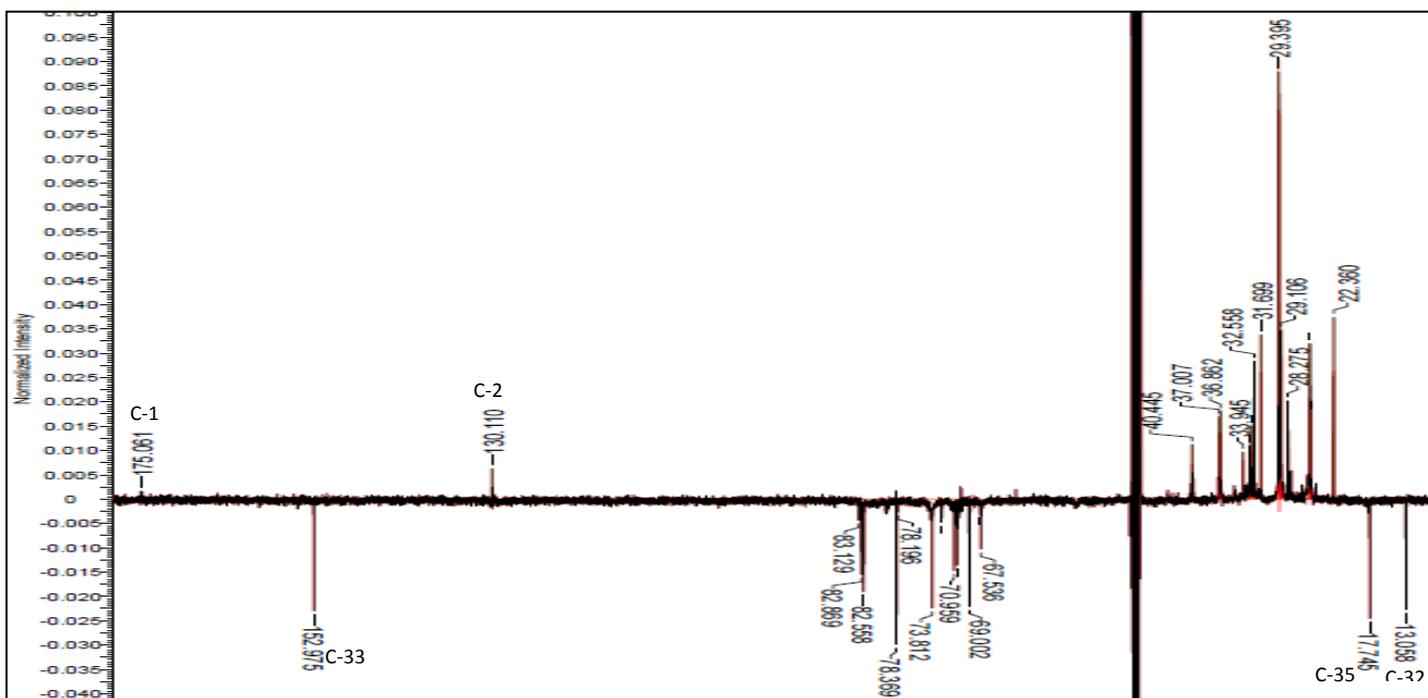


Figura 55 – Espectro de RMN ^{13}C DEPT-Q (125MHz) de **ACG3** em CD_3OD .

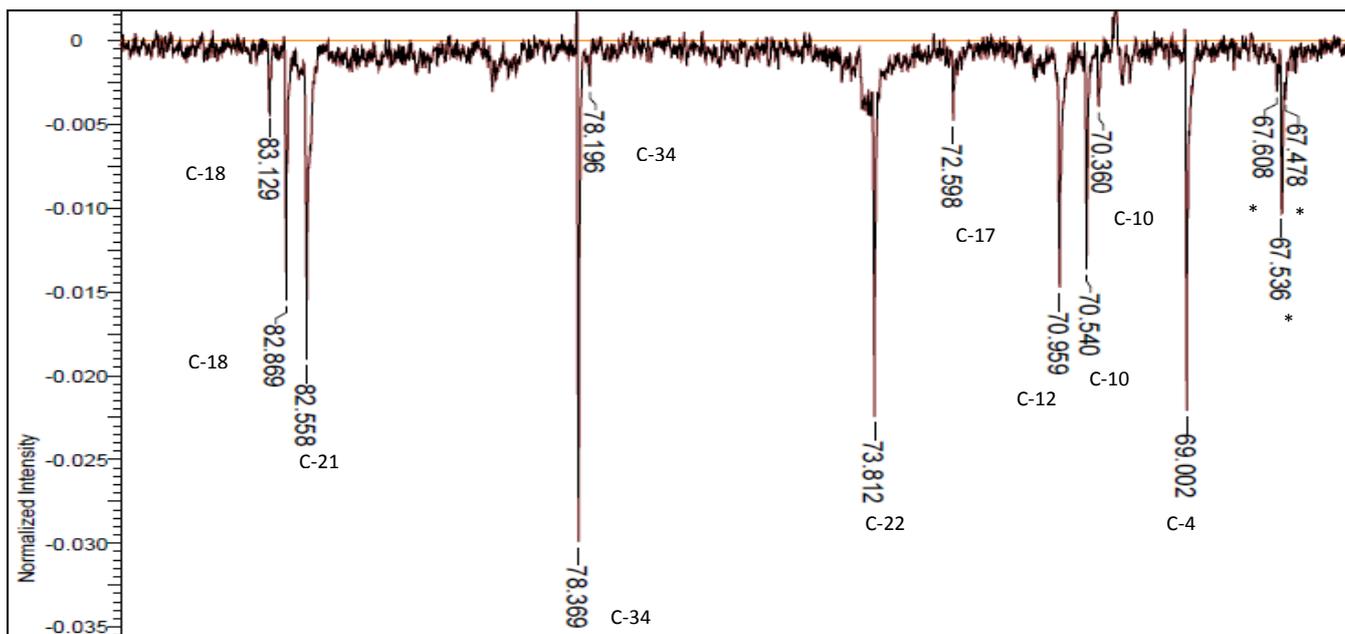


Figura 56 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C DEPT-Q (125MHz) de **ACG3** em CD_3OD .

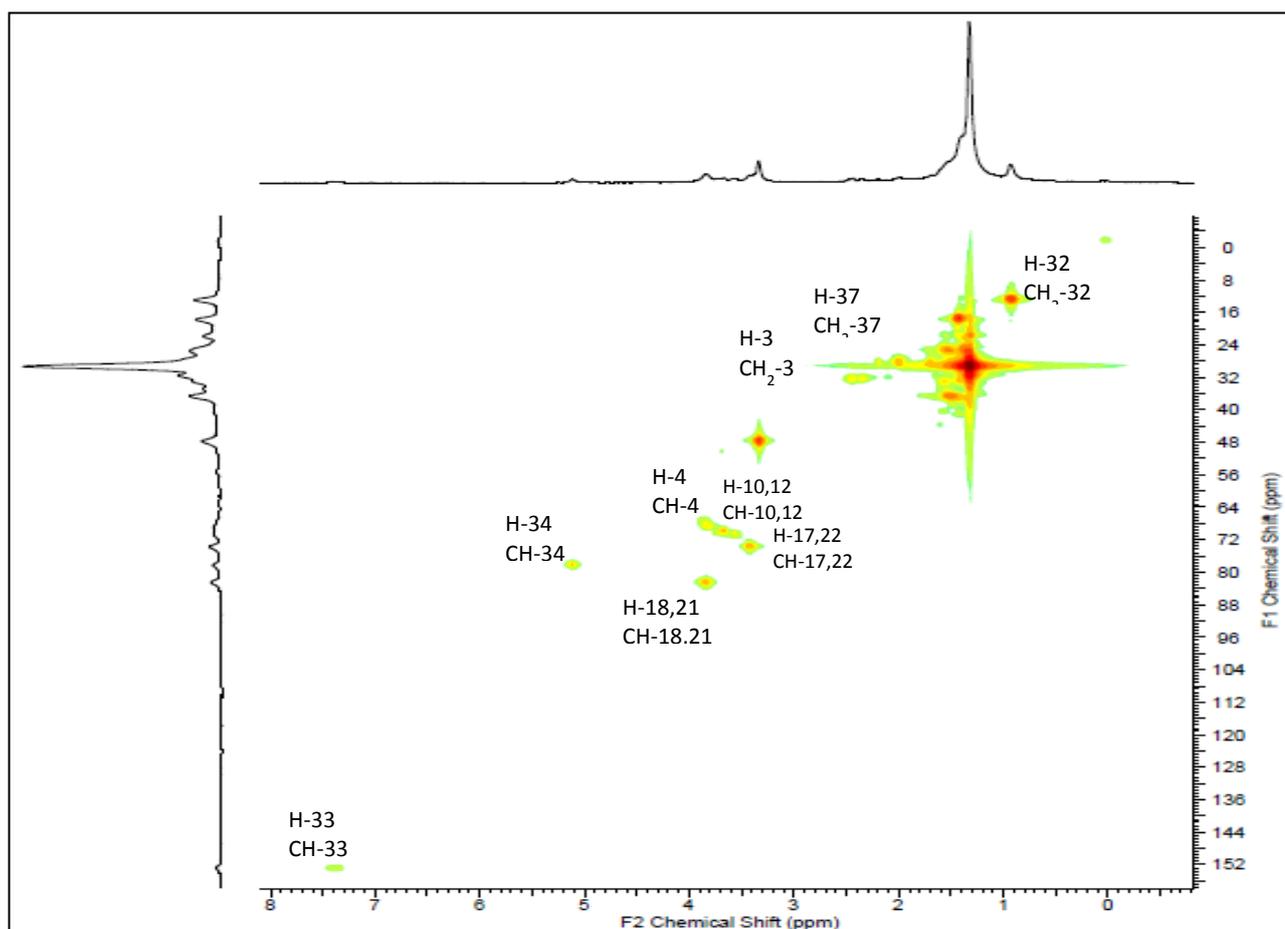


Figura 57 - Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMQC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de **ACG3** em CDCl_3

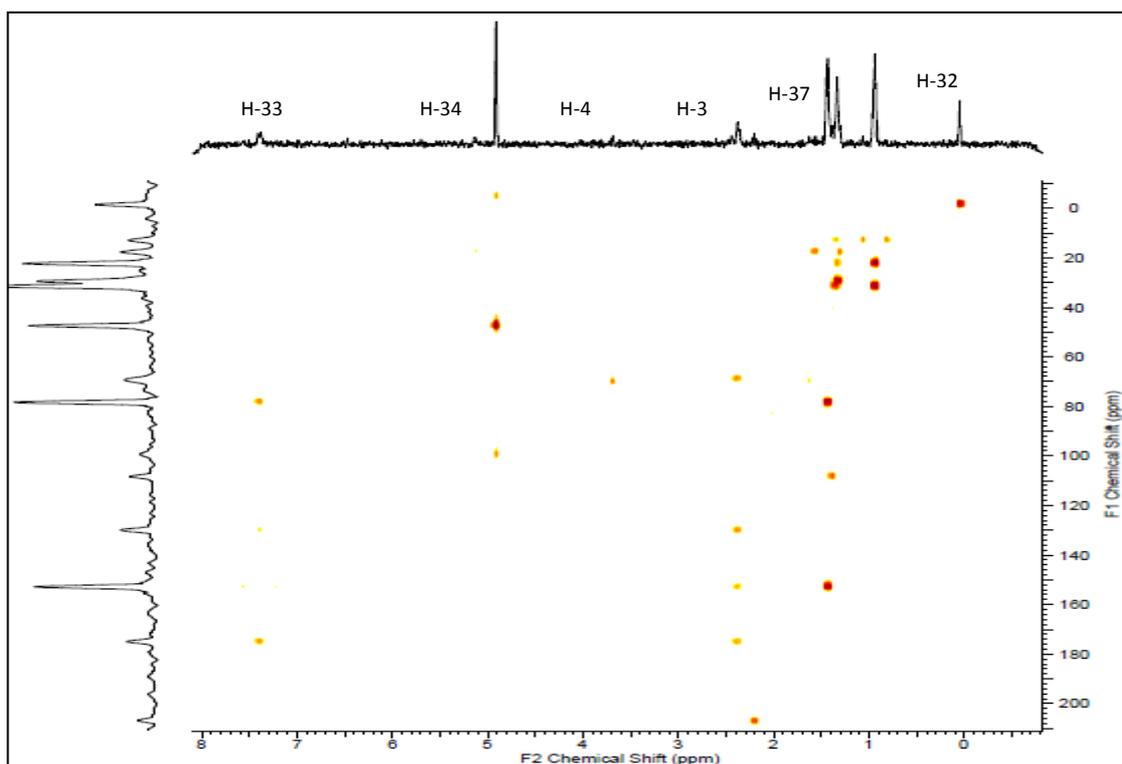


Figura 58 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) HMBC (^1H :500 e ^{13}C :125 MHz) de **ACG3** em CDCl_3

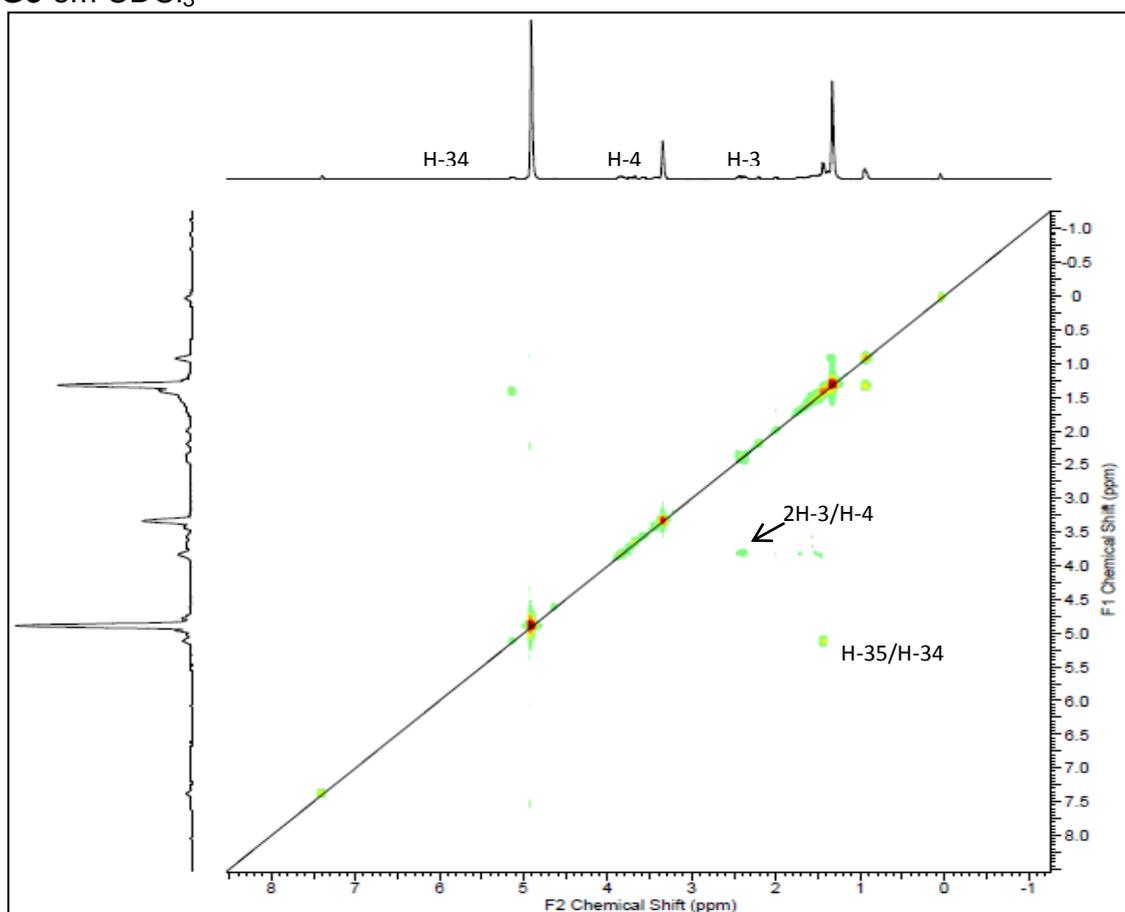


Figura 59 – Espectro de 2D (=Mapa de contornos) ^1H - ^1H -COSY (500MHz) de **ACG3** em CDCl_3

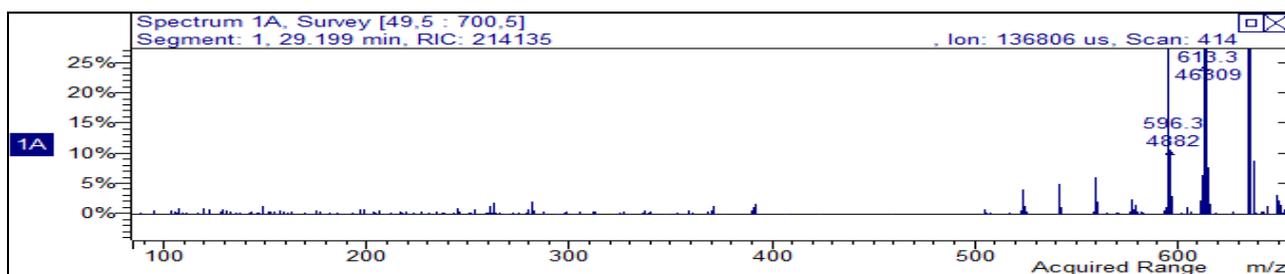


Figura 60 - Espectro de massas de baixa resolução da amostra **ACG3**, obtido através de ionização por eletrospray.

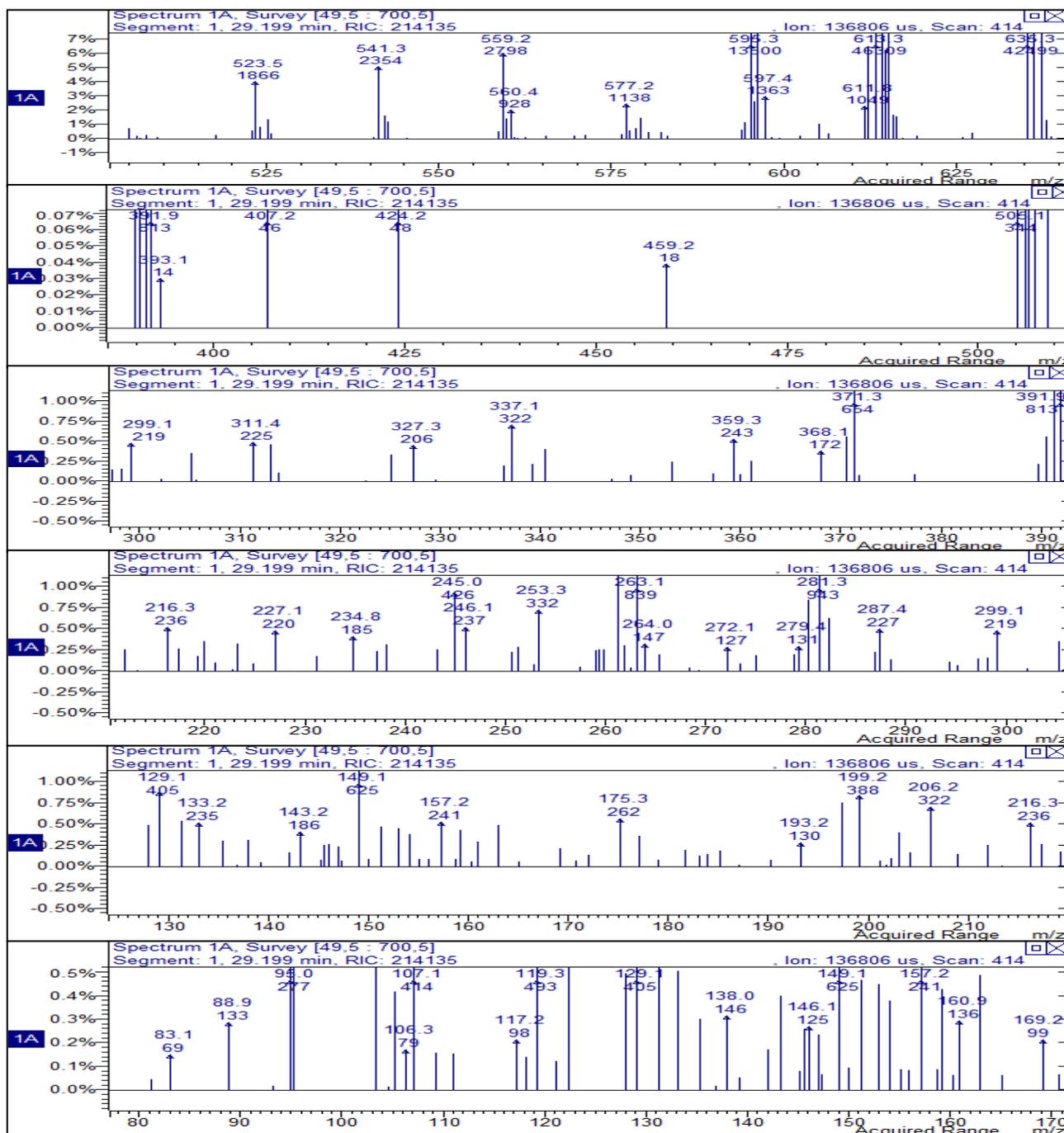


Figura 61 – Espectros/ampliação de massas de **ACG3** obtido em CLAE-EM-ESI baixa resolução em modo positivo.

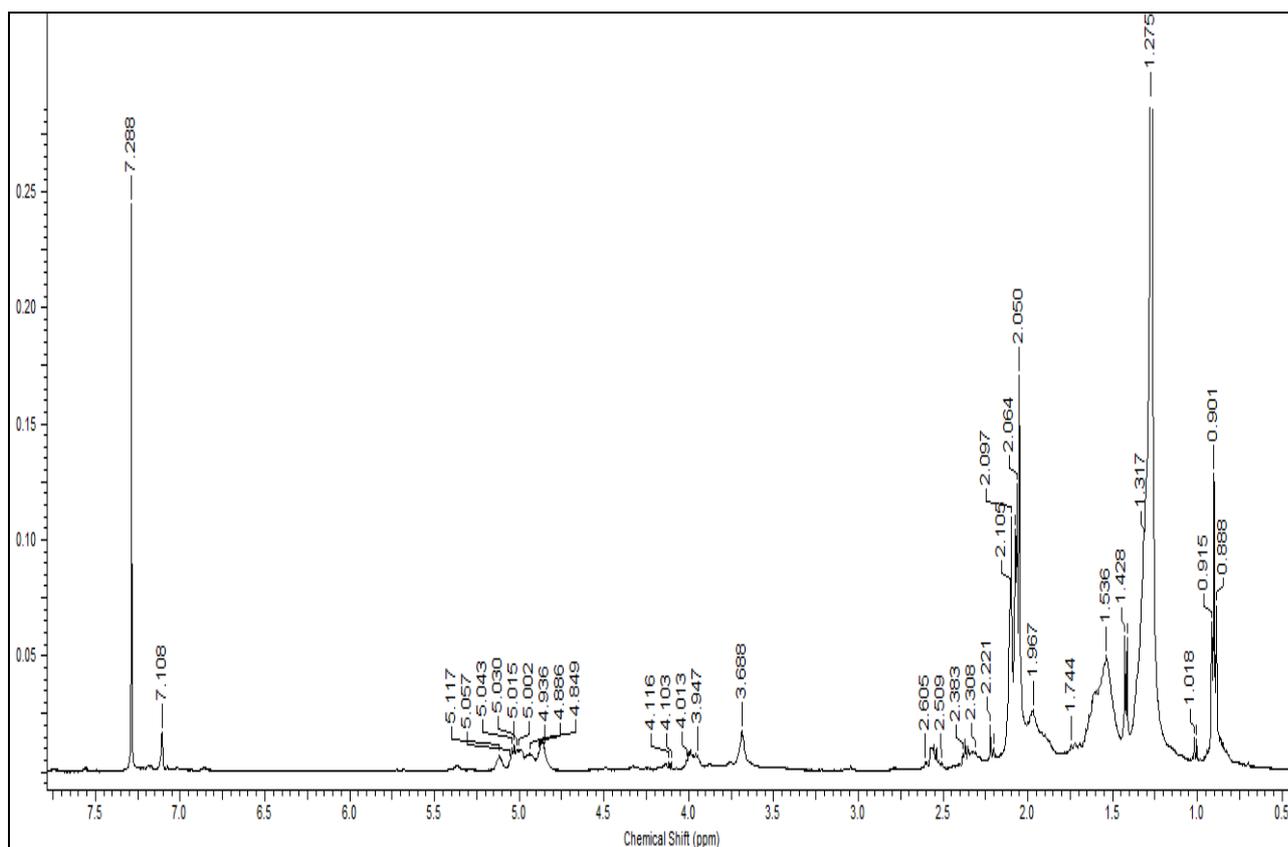


Figura 62 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de **ACG3a** obtido em CDCl_3

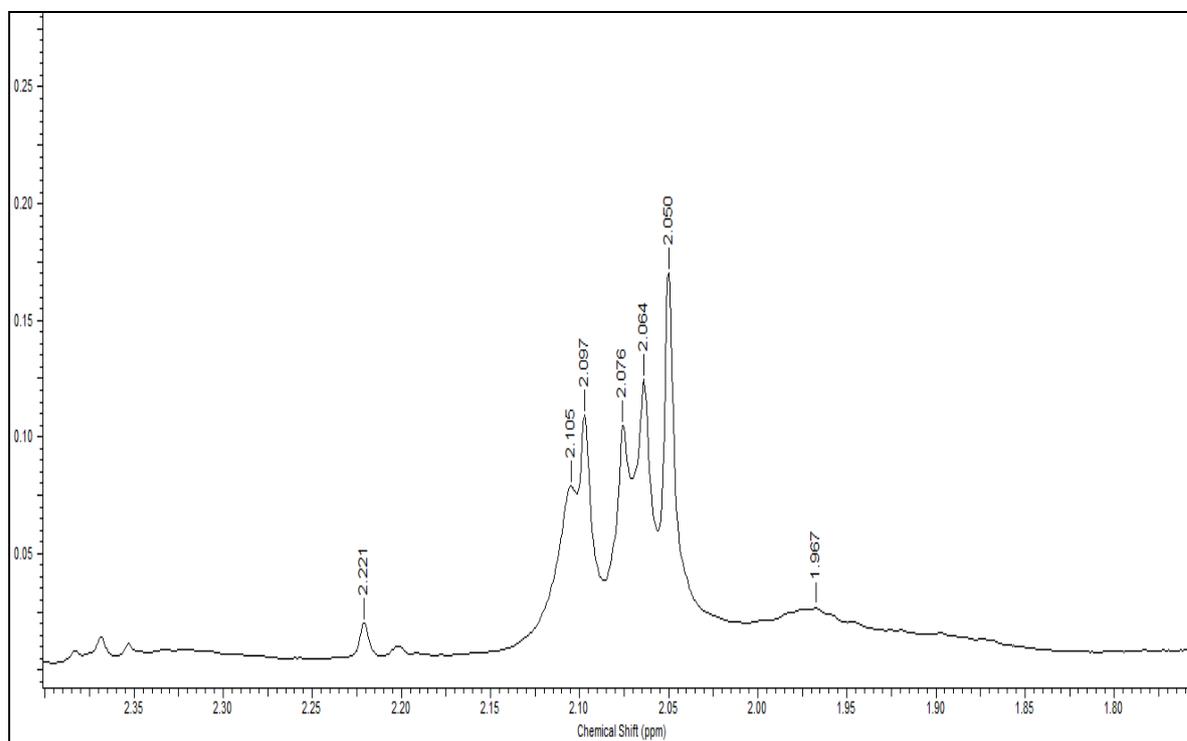


Figura 63 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de **ACG3a** obtido em CDCl_3

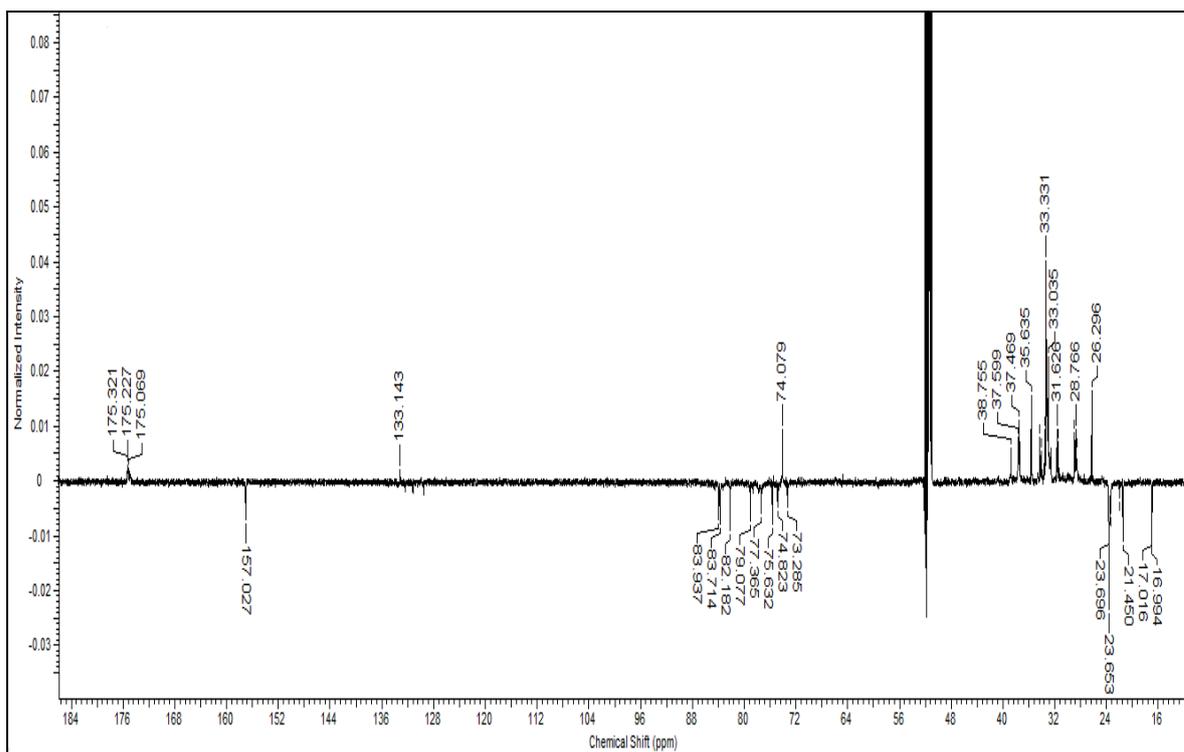


Figura 64 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de **ACG3a** em CDCl_3

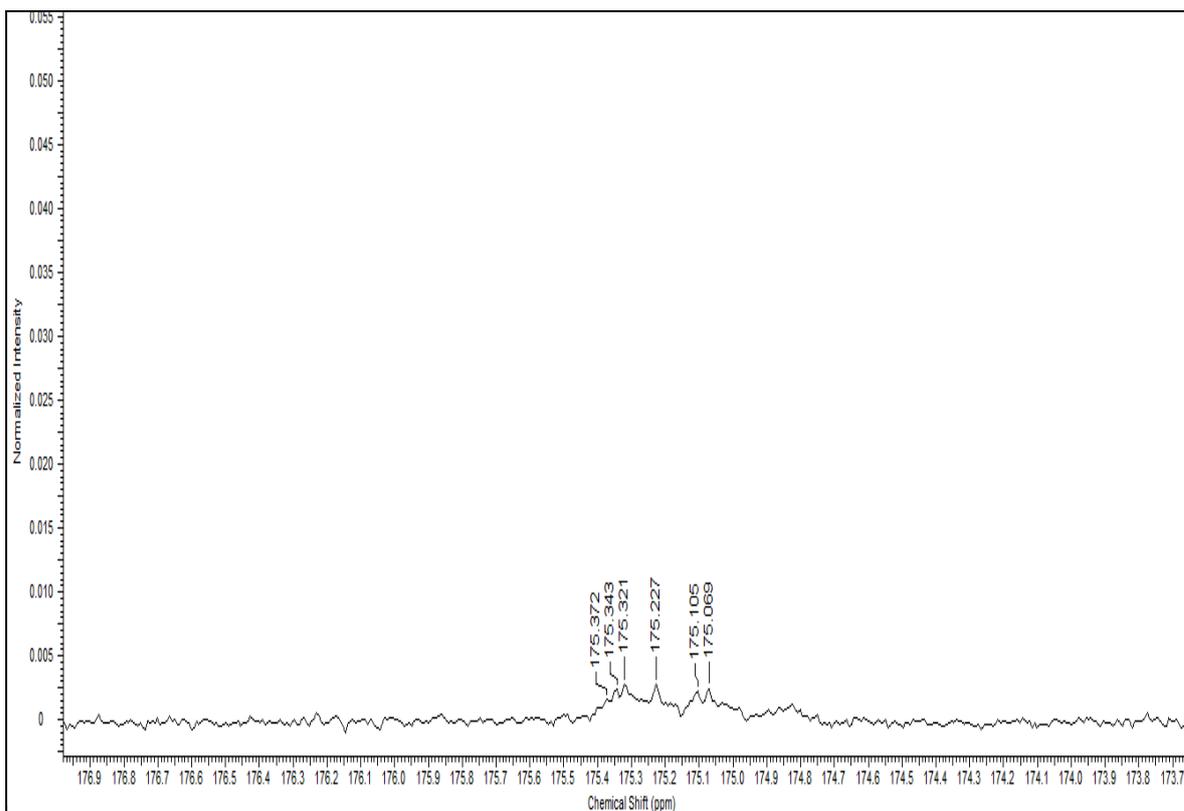


Figura 65 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT-Q (125MHz) de **ACG3a** em CDCl_3

6. CONCLUSÕES

Em concordância com as expectativas iniciais do trabalho, os resultados obtidos de atividade larvicida frente à *Aedes aegypti* dos extratos e frações mostraram que a espécie *A. coriacea* é bastante promissora na busca de novos compostos biocidas, visto que apresentaram alto potencial biológico, alguns superior aos encontrados na literatura do gênero *Annona*.

Os extratos hexânicos (coletados em MT e MS) apresentaram grande potencial larvicida e mais ativos que os respectivos extratos metanólicos. Do fracionamento dos extratos de *A. coriacea* foram obtidas muitas frações potencialmente ativas, com destaque as obtidas do extrato metanólico. Estas que apresentaram excelentes resultados de atividade larvicida frente à *Aedes aegypti* (100% de mortalidade com 1,4 ppm); sendo mais potente que acetogenina ativa relatada na literatura (10 ppm para eliminar 100% larvas).

Foi verificada relação direta da purificação cromatográfica das amostras que continham acetogeninas, com aumento no potencial larvicida, comprovando que essas substâncias são as responsáveis pela alta atividade larvicida encontrados nos extratos avaliados e sendo, entretanto fontes promissoras de compostos inseticidas frente à larvas de *Aedes aegypti*.

As várias frações obtidas a partir dos extratos de *A. coriacea*, apresentaram-se como mistura de ACGs isômeras. No entanto, foi possível propor estruturas para três ACGs, uma do tipo *bis*-THF conhecida como bullacina (ACG1), já isolada em *A. bullata* e outras duas *mono*-THF denominadas coriapentocina A (ACG2) e B (ACG3), sendo relatadas pela primeira vez na família Annonaceae.

Os resultados da atividade larvicida encontradas para as acetogeninas bullacina e coriapentocina A corroboram com a atividade descrita na literatura, visto que a acetogenina com unidade *bis*-THF apresentou maior potencial larvicida frente *A. aegypti* que a com unidade *mono*-THF, apesar de ter apresentado atividade larvicida significativa; sendo pela primeira vez relatada tal atividade biológica.

As análises do perfil cromatográfico via CLAE-EM-ESI das amostras *A. coriacea* permitiram detectar picos característicos de ACGs com mesma massa molecular nas frações contendo esta classe de metabólitos. Das frações potencialmente ativas frente à *Aedes aegypti* da espécie *A. coriacea* foram verificados picos com razão *m/z* 596, 604, 606, 612, 622 e 638 comuns nos dois extratos.

Através desta verificação, foi possível sugerir apenas correlação da atividade larvicida com as massas moleculares das ACGs verificadas nas frações ativas trabalhadas, visto que é frequente a ocorrência de isômeros constitucionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOU, E.; WILLIAMS, R. B.; SCHILLING, J. K.; MALONE, S.; MEYER, J.; WISSE, J. H.; FREDERIK, D.; KOESE, D.; WERKHOVEN, M. C. M.; SNIPES, C. E.; WERK, T. L.; KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic diterpenoids from two lianas from the Suriname rainforest. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 6009–6014, 2005.

AGRA, M. de F. **Farmacopéia Popular da Paraíba**. João Pessoa, Editora Universidade Federal da Paraíba (MEC), 1977.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis.**; Distrito Federal: Editora da Embrapa, 1ª ed, 1998a.

ALMEIDA, S. P.; SANO, S. M. **Cerrado: ambiente e flora**. Distrito Federal, Editora da Embrapa, 1998b, p. 286-556.

ALVES, T. M. de A.; BRANDÃO, A. F. S. M.; GRANDI, T. S. M.; SMANIA, E. de F. A.; SMANIA Jr, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Revista Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

ARIVOLI, S.; TENNYSON, S. Mosquitocidal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit (Lamiaceae) extracts against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA:CULICIDAE). **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 2, n, 5, p. 143-149, 2011.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 17-25, 2003.

AUGUSTO, L. G. S.; CAMARA NETO, H. F. O combate químico das pragas domésticas: um problema oculto de saúde pública. In: L. G. da S. Augusto; R. M. Carneiro; P. H. Martins. **Abordagem ecossistêmica em saúde – ensaios para o controle da dengue**. Editora UFPE, Recife, 2005, 382 p.

BARDÓN, A.; NESKE, A.; COLOM, O. A.; ZAFRA-POLO, M. C.; CHAHBOUNE, N. Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 335-340, 2009.

BARDÓN, A.; NESKE, A.; POPICH, S.; COLOM, O. A.; BLESSING, L. di T. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 307-3010, 2010.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M-C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from *Annonaceae*: recente progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Products Reporter**. v. 22, p. 269-303, 2005.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M., DE QUEIROGA, M. de F. C.; CASTRO JR, F. P. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology** v. 36, n. 2, p. 303-307, 2007.

BISSET, J. A.; RODRIGUEZ, M. M.; CÁCERES, L. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos em 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 55, p. 191-195, 2003.

BOAVENTURA, M. A. D.; PIMENTA, L. P. S.; LIMA, L. A. R. S. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1129–1138, 2010.

BOBADILLA, M. ZAVALA, F.; SISNIEGAS, M.; ZAVALA, G.; MOSTACERO, J; TARAMONA, L. Evaluación larvívica de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus (guanábana) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). **Revista Peruana de Biología**, v. 12, p. 145-152, 2005.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. da S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Revista Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2005, 816 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2007**. Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2007.

BRITO, B.; RODRIGUEZ, M.; SAMANIEGO, I.; JARAMILLO, M. I.; VAILLANT, F. Characterising polysaccharides in cherimoya (*Annona cherimola* Mill) puree and their enzymatic liquefaction. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 3, p. 355-361, 2008.

CAMPOS, J; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 232-236, 2001.

CAMPOS, P. R. B. **Acidólise enzimática de óleo de soja para obtenção de triacilglicerois estruturados funcionais**. Bragança Paulista, Universidade São Francisco, 2010. Dissertação de Mestrado.

CARNEIRO, A. P.; PEREIRA, M. J.B.; GALBIATI, C. Efeito biocida de *Annona coriacea* Mart 1841 sobre ovos e ninfas do vetor *Rhodnius neglectus* Lent 19541. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 6, n. 2, p.131-136, 2011.

CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, A. C. Q.; RAMOS, V. H. V. **O cultivo da pinha, fruta do conde ou ata no Brasil**. Circular Técnica EMBRAPA Cerrados, Planaltina, n. 9, p. 10-11, 2000.

CARVALHO, M. do S. L. de.; CALDAS, E. D.; DEGALLIERC, N.; VILARINHOSA, P. de T. R.; SOUZA, L. C. K. R. de.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOXA, M. B.; OLIVEIRA, C. de. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n. 5, p. 623-629, 2004.

CATTO, J. B.; BIANCHIN, I.; SAITO, M. L.; **Efeito Acaricida *in vitro* de Extratos de Plantas do Pantanal no Carrapato de Bovinos, Rhipicephalus (Boophilus) Microplus**. Campo Grande, Editora da Embrapa, 2009.

CAVÉ, A.; MENESES DA SILVA, E. L.; ROBLOT, F.; LAPRÉVOTE, O.; VARENNE, P. Coriacin and 4-deoxycoriacin, Two New mono-THF acetogenins from the roots os *Annona coriacea*. **Natural Product Letters**, v. 7, n. 3, p. 235-242, 1995.

CAVÉ, A.; DA SILVA, E. L. M.; ROBLOT, F.; MAHUTEAU, J. Coriadienin, the first annonaceous acetogenin with two double bonds isolated from *Annona coriacea*. **Jounal of Natural Products**, v. 59, p. 528-30, 1996.

CAVÉ, A.; MENESES DA SILVA, E. L. M.; ROBLOT, F.; LAPRÉVOTE, O.; STERANI, L. Coriaheptocins A and B, the First Heptahydroxylated Acetogenins, Isolated from the Roots of *Annona coriacea*. **Jounal of Natural Products**, v. 60, p.162-167, 1997a.

CAVÉ, A.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; WAECHTER, A-I. Glaucafilin, an acetogenin from *Annona glauca*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1537-1540, 1997b.

CHAMPY, P.; GUERINEAU, V.; LAPREVOTE, O. MALDI-TOF MS Profiling of Annonaceous Acetogenins in *Annona muricata* Products for Human Consumption. **Molecules**, v. 14, p. 5235-5246; 2009a.

CHAMPY, P.; NDOB, I. B. BA.; GLEYE, C.; LEWIN, G.; AKENDENGUÉ, B. Annonaceous acetogenins: Precursors from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, p. 72-76, 2009b.

CHANG, F.R., YANG, P.Y.; LIN, J.Y.; LEE, K. H.; WU, Y.C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal Natural Products**. v. 61, n. 4, p. 437-439, 1998.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. *Annonaceae* (Soursop Family). In: Smith, N.; Mori, S. A.; Henderson, A.; Stevenson, D. W. & Heald, S. V. **Flowering Plants of the Neotropics**. The New York Botanical Garden, p. 18-20, 2004.

CHEN, C-Y.; WU, Y-C. Annocherine C, A new C-hydroxybenzylisoquinoline and other constituents from the leaves of *Annona cherimola*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 48, p. 1203-1206, 2001.

CHENG, S-S.; CHANG, H-T.; CHANG, S-T.; TSAI, K-H.; CHEN, W-J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 99-102, 2003.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 185-189. 2000.

COELHO, A. A. M. **Análise inseticida de extratos de plantas do bioma cerrado sobre triatomíneos e larvas de *Aedes aegypti***. Brasília, UnB, 2006. Dissertação de mestrado.

COELHO, M. B.; DE SOUZA, I. A.; FREIRE, M. G. M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M. L. R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, v. 48, p. 529-535, 2006.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 146, p. 406-414, 2007.

CORREIA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa, Rio de Janeiro, 1984.

CORTES, D.; CHAHBOUNE, N.; BARRACHINA, I.; ROYO, I.; ROMERO, V.; SAÉZ, J.; TORMO, J. R.; DE PEDRO, N.; ESTORNELL, E.; ZAFRA-POLO, M. C.; PELÁEZ, F. Guanaconetins, new antitumoral acetogenins, mitochondrial complex I and tumor cell growth inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1089-1094, 2006.

COSTA, M. O vetor da dengue como objeto de atuação dos agentes de vigilância ambiental e de pesquisas com plantas inseticidas do cerrado, em Tangará da Serra, MT. Cáceres, UNEMAT, 2011. Dissertação de mestrado.

COUTINHO L. M. **O bioma do cerrado**. In: Klein AL (Org), Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois, Editora UNESP, São Paulo, p. 77-91, 2002.

CRUZ, G. L. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1985.

DESAI, N. S.; Barhate, C. R.; BIYANI, S. O.; KULKARNI, S. R.; NAGARSENKER, M. S. Quantitative Analysis of Flavonoids in *Annona squamosa* leaf extracts and its pellet formulation by validated high-performance thin-layer chromatographic technique. **Journal of Planar Chromatography**, v. 24, n. 4, p. 306–311, 2011.

DILL, E. M. **Efeito residual do extrato de *Annona coriacea* sobre *Aedes aegypti* e o comportamento, atitudes e práticas da população de Tangará da Serra - MT na prevenção da dengue**. Dissertação (Mestrado). Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres, 2011.

DOMINGUEZ-MARTINEZ, V. G.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M.; COLAR GOMEZ, E.; ATZIN GAR., J. Pupicidal activity of annonacin for *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Folia Entomologica Mexicana**, v. 42, n. 3, p. 349-358, 2003.

DURIGAN G., BAITELO, J.B., FRANCO, G.A.D.C. & SIQUEIRA, M.F. 2004. **Plantas do cerrado paulista. Imagens de uma paisagem ameaçada**. São Paulo, Editora Páginas e Letras, 2004.

FENG, L.; ZHOU, L.; SUN, Y.; GUI, J.; WANG, X.; WU, P.; WAN, J.; REN, Y.; QIU, S.; WEI, X.; LI, J. Specific inhibitions of annonaceous acetogenins on class II 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Streptococcus pneumonia*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3512–3519, 2011.

FERREIRA, J. S.; FERREIRA, L.; PERESTRELO, R. Comparative analysis of the volatile fraction from *Annona cherimola* Mill. Cultivars by solid-phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 1087-1096, 2009.

FISCHER, D. C. H.; GUALDA, N. C. A.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, C. S.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; ALVES, M. de O.; YOGIA, A.; SANTIC, S. M. di.; AVILA, P. E.; KIRCHGATTERC, K.; MORENO, P. R. H. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquiniline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropical**, v. 92, p. 261-266, 2004.

FISCHER, D. C. H.; SIQUEIRA, C. A. T.; OLIANI, J.; SARTORATTO, A.; QUEIROGA, C. L.; MORENO, P. R. H.; REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and in vitro antiprotozoal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 33-40, 2011.

FORTANA, J. D.; LANÇAS, F. M.; PASSOS, M.; CAPPELARO, E.; VILEGAS, J.; NOSEDA, M.; POMÍLIO, A. B.; VITALE, A.; WEBBER, A. C.; MAUL, A. A.; PERES, W. A.; FOERSTER, A. Selective polarity and adsorption-guided extraction/purification of *Annona* sp. Polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, 1998.

FORMAGIO, A. S. N.; MASETTO, T.E.; BALDIVIA, D.S.; VIEIRA, M. do C.; ZARATE, N.A.H. PEREIRA, Z. V. Potencial alopatóico de cinco espécies da família *Annonaceae*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 843-847, 2005.

GALLARDO, T.; ARAGÓN, R.; TORMO, J.R.; BLÁSQUEZ, A.; ZAFRA-POLO, M.C.; CORTES, D. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry**, v. 47, p. 811-816, 1998.

GOSWAMI, N. G.; RABHA, B. Preliminary evaluation of mosquito larvicidal efficacy of plant extracts. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 44, p. 145-148, 2007.

GREEN, M. M.; SINGER, J. M.; SUTHERLAND, D. J.; HIBBEN, C. R. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (marigold) toward *Aedes aegypti*. **American Mosquito Control Association**, v. 7, p. 282-286, 1991.

GROSS, R. W.; HAN, X. Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of human erythrocyte plasma membrane phospholipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Vol. 91, p. 10635-10639, 1994.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUPTA, A.; PANDEY, S.; SHAH, D. R.; YADAV, J. S.; SETH, N. R. Annonaceous acetogenins: The unrevealed area for cytotoxic and pesticidal activities. **Systematic Reviews in Pharmacy**, n. 2, v. 2, p. 104-109, 2011.

GUSMÃO, D. S.; PÁSCOA, V.; MATHIAS, L.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, F. J. A. *Derris (Lonchocarpus) urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 3, p. 371-375, 2002.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 33-42, 2001.

HENAO, G. J.; PAJÓN, C. M. G.; TORRES, J. M. C. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. **Rev CES Medicina**, v. 21, p. 47-54, 2007.

HO, S-H.; WANG, J.; SIM, K-Y.; IMIYABIR, Z.; YAP, K. F.; SHAARI, K.; GOH, S. Meliternatin: a feeding deterrent and larvicidal polyoxygenated flavone from *Melicope subunifoliolata*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 7, p. 1121-1124, 2003.

HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; JACQUEMIN, H.; TOUCHE, A. Alkaloids of *Annonaceae* XXXVI. Alkaloids from *Annona crassiflora* Mart. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v. 16, n. 1, p. 4-6, 1982.

HOMBACH, J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. **Pan American Journal of Public Health**, v. 21, n. 4, 2007.

IBGE. SIDRA. Banco de dados agregados. Senso agropecuário e Produção Agrícola Municipal 2008. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 13 jul. 2012.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; PEREIRA, M. J. B.; POSSAMAI, A. C. S.; AZEVEDO, V. H. D. Extratos aquosos de *Xylopiá aromática* e *Annona crassiflora* sobre capim-marandu (*Brachiaria brizantha*) e soja. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 3, p. 245-250. 2009a.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C. de.; SANTANA, C. T.; POSSAMAI, A. C. S.; PEREIRA, K. M.; SILVA, B.A.S. Investigação da Atividade Alelopática de *Annona coreacea* e *Annona dioica* sobre *Brachiaria brizantha*, *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia*. Resumos do VI CBA e II CLAA. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 134-138, 2009b.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; PEREIRA, M. J. B.; PEREIRA, K. M. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: Efeitos sobre plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 28, n. 3, p. 489-498, 2010.

IOSET, J. R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 613-617, 2000.

JIRAKANJANAKIT, N.; SAENGTHARATIP, S.; RONGNOPARUT, P.; DUCHON, S.; BELLEC, C.; YOKSAN, SUTEE. Trend of temephos resistance in *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes in Thailand during 2003–2005. **Environmental Entomology**, v. 36, n. 3, p. 506-511, 2007.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. L. Uvaricin, a new antitumor agente from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, v. 17, n.16, p. 3151-3153, 1982.

KAUSHIK, R.; SAINI, P. Screening of some semi-arid region plants for larvicidal activity against *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 46, p. 244–246, 2009.

KHALEQUZZAMAN, M.; SULTANA, S. Insecticidal activity of *Annona squamosa* L. seed extracts against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Bio-Science**, v. 14, p. 107-112, 2006.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p. 147-155, 2005.

KIM, J-C.; LU, N. H.; LIM, C. H.; PARK, S. M.; JANG, K. S.; CHOI, G. J.; CHOI, Y. H.; NGUYEN, M. C.; KIM, W. K.; DANG, Q. L. Nematicidal and antifungal activities of Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11160-11167, 2011.

LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora***. Minas Gerais, UFMG, 2011. Dissertação de mestrado.

LAPRÉVOTE, O.; SILVA, E. L. M. ; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; SERANI, L. Structure elucidation of Annoheptocins, two new heptahydroxylated C37 acetogenins by high-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1936-1944, 1998.

LEAMAN, D. J.; ARNASON, J. T.; YUSUF, R.; SANGAT-ROEMANTYO, H.; SOEDJITO, H.; ANGERHOFER, C. K.; PEZZUTO, J. M. Malaria remedies of the Kenyah of the Apo Kayan, East Kalimantan, Indonesian Borneo: A quantitative assessment of local consensus as an indicator of biological efficacy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 1-16, 1995.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVE, A.; DESCONCLOIS, J. F.; FORGACS, P.; JACQUEMIM, H. Alcaloides des annonacées: alcaloides d' *Annona muricata* L.L. **Planta Medica**, v. 42, p. 37-77, 1982.

LI, X.; CHEN, J.; TANG, Y.; SHI, Z.; LI, N.; Recent progress on the total synthesis of acetogenins from *Annonaceae*. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 4, n. 48, 68 p., 2008.

LI, XIANG.; YANG, HAI-JUN.; ZHANG, NING.; CHENG, JIAN-WEI.; WANG, MING-YAN. Two new cytotoxic acetogenins from *Annona squamosa*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 3, p. 250-256, 2009a.

LI, X.; YANG, H.; TANG, Y.; ZHANG, N.; CHEN, J.; CAI, B. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC–DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 140–144, 2009b.

LI, X.; CHEN, Y.; CHEN, J-W. Cytotoxic bistetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Journal of natural Products**, v. 74, p. 2477-2481, 2011b.

LIAW, C-C.; YANG, Y-L.; CHEN, M.; CHANG, F-R.; CHEN, S-L.; WU, S-H.; WU Y-C. Mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from *Annona squamosa* as cytotoxic agents and calcium ion chelators. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 764-771, 2008.

LIMA, M. R. F. de. **Contribuição para o conhecimento fitoquímico e da atividade biológica de *Annona crassiflora* Mart. e *Schinus terebinthifolius* Raddi**. Universidade Federal de Alagoas, 2005. Tese de doutorado.

LIMA, E. P.; OLIVEIRA FILHO, A. M. de O.; LIMA, J. W. de O.; RAMOS JUNIOR, A. N.; CAVALCANTI, L. P. de G.; PONTES, R. J. S. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006a.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Two new adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from seeds of *Annona cornifolia*. **Planta Medica**, v. 75, n. 1, p. 80–83, 2009.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H.; SARTORI, S.; BACHER, L. B.; LACERDA, M. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2006.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa, Editora Plantarum, v. 2. 2ªed., 2002.

LUNA, J, E, D.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; SILVA, M. A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temefhos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 824-3, 2004.

MAAS, P., RAINER, H.; LOBÃO, A. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

MACEDO, M.; CARVALHO, J. M. K.; NOGUEIRA, F. L. Plantas medicinais e ornamentais da área de aproveitamento múltiplo de Manso, Chapada dos Guimarães, Mato Grosso. 1ª Cuiabá, Editora UFMT, 2002.

MAGADULA, J. J.; INNOCENT, E.; OTIENO, J. N. Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 9, p. 674-680, 2009.

MARCONDES. C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. Editora Atheneu, São Paulo, v. 6, 2001,103p.

MATA, R.; CHÁVEZ, D. Purpurediolin and Purpurenin, two new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the seeds of *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 5, p. 580-584, 1998.

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

McLAUGHLIN, J. L.; RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. Annonaceous Acetogenins: A review. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 2, p. 237-278, 1990.

MCLAUGHLIN, L. L. GU, Z-M.; FANG, X-P.; WOOD, K. V. Bullacin: A new cytotoxic Annonaceous Acetogenin from *Annona bullata*. **Heterocycles**, v.36, n. 10, p. 2221-2228, 1993.

McLAUGHLIN, J. L.; ZHAO, G-X.; CHAO, J-F.; ZENG, L.; RIESER, M. J. The absolute configuration of adjacent bis-THF acetogenins and asimincin, a novel highly potent asimincin isomer from *Asimina triloba*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 25-32, 1996.

McLAUGHLIN, J. L.; ALALI, F. Q.; LIU, X. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. Invited Review. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.

MCLAUGHLIN, J. L. WU, F-E.; ZENG, L.; GU, Z-M.; ZHAO, G-X.; ZHANG, Y.; SHWEDLER, J. T. Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n.6, p. 902-908, 1995b.

MCLAUGHLIN, J. L. WU, F-E.; ZENG, L.; GU, Z-M.; ZHAO, G-X.; ZHANG, Y.; SHWEDLER, J. T. New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, annomuricin C and muricatocin C, from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n.6, p. 909-915, 1995c.

MCLAUGHLIN, J. L. Paw paw and Cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1311-1321, 2008.

MCLAUGHLIN, J. L. HOPP, D. C.; GU, Z. Three new bioactive bis-adjacent THF-ring acetogenins from the bark of *Annona squamosa*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.6, p. 569-575, 1998.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: UFC, 1988. 124p.

MANICA, I.; ICUMA, I. M.; JUNQUEIRA, K. P.; OLIVEIRA, M. A. S.; CUNHA, M. M.; OLIVEIRA JUNIOR, M. E.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ALVES, R. T.; MANICA, I. (Ed). Frutas Anonáceas: Ata ou Pinha, Atemólia, Cherimólia e Graviola. **Tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Editora: Cinco Continentes. 596 p., 2003.

MENESES DA SILVA, E. L.; ROBLLOT, F.; CAVÉ. A. Acetogenin from Annonaceae. Part 57. Coriacyclodienin and coriacycloenin: Two new Annonaceous Acetogenins from *Annona coriacea*. **Heterocycles** v. 45, n. 5, p. 915-925, 1997.

MENDONÇA, F. A. C.; SILVA, K. F. S.; SANTOS, K. K.; RIBEIRO JÚNIOR, K. A. L.; SANT'ANA, A. E. G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 629-636, 2005.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORRIES, C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Revista Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MANBU, L.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165-170, 2007.

MESQUITA, M. L. **Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica**. Brasília, UNB, 2009. Tese de doutorado.

MONZON, R. B.; ALVIOR, J. P.; LUCZON, L. L.; MORALES, A. S.; MUTUC, F. E. Larvicidal potential of five Philippine plants against *Aedes aegypti* (Linneus) and *Culex quinquefasciatus*

(Say). **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 25, p. 755-759, 1994.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B. Produtos naturais no controle da dengue. In: **Produtos naturais – estudos químicos e biológicos**. Editora EdUECE, Fortaleza, p. 149-162, 2007.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Biochemistry System Ecology**, v. 31, p. 535-537, 2003.

MURPHY, R. C.; FIEDLER, J.; HEVKO, J. Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 2, p. 479-526, 2001.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NASCIMENTO, F. C.; BOAVENTURA, M. A. D.; ASSUNÇÃO, A. C. S.; PIMENTA, L. P. S. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, v. 26, p. 319-322, 2003.

NASCIMENTO, M. C. S. do. **Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades**. Seropédica, Programa de Pós-Graduação em Química, UFRJ, 2008. Tese de doutorado.

OLIVEIRA, A. B.; SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofuranica citotóxica de *Annona crassiflora* (araticum). **Química Nova**, v. 17, n. 5, 1994.

OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA, M. J. B. Efeito antialimentar do extrato metanólico de *Annona crassiflora* Mart. Sobre o percevejo marrom *Euschistus heros* (Fabr.1798) (Heteroptera: Pentatomidae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

OLIVEIRA, A. B. de.; Lombardid, J.A.; Stehmann, J. R.; Santos, J. R. dos.; Kroonb, E. G.; Brandão, G. C. Antiviral Activity of Plants Occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): Part III. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 223-236, 2011.

OLIVEIRA, A. B. de.; BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; SANTOS, J. R. dos.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J. A. Antiviral activity of plants occurring in the states of Minas Gerais (Brazil):Part III. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, n. 4, p. 223-236, 2011.

OMENA, M. C., NAVARRO, D. M. A. F, PAULA, J. E., LUNA, J. S., LIMA, M. R. F., SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2549-2556. 2007.

ORSINI, F.; PELLIZONI, F., The structure of Annonalide. **Tetrahedron Letters**. v. 12, p. 1085-1088, 1977.

PARVIN, S.; ISLAM, E.; RAHMAN, M. Y.; HAQUE, E. Pesticidal activity of Pure Compound Annotemoyin-1 isolated from chloroform extract of the plant *Annona squamosa* Linn. against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Biological Sciences**. v. 6, n. 12, p. 1088-1091, 2003.

PIMENTA, L. O. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine** v. 10, p. 209–212, 2003.

- PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; DOS SANTOS, L. A. R. Cornifolin, a new bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenin from *Annona cornifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 78-82, 2006.
- PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. de V.; MAAS, P. J. M. Flora Paraibana: *Annonaceae* Juss. **Acta Botanica Brasílica**, v. 18, n. 2, p. 281-293. 2004.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Embrapa, 1ª edição. Editora da Embrapa, 1994.
- PRADO, M. S. A.; BRITO, H. O.; NORONHA, E. P.; FRANCA, L. M.; BRITO, L. M. O. Phytochemical analysis composition from *Annona squamosa* (ATA) leaf ethanolic extract. **Revista Brasileira de Fármacia**, v. 39, n. 3, p. 180-184, 2008.
- QUEIROZ, E. F.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.; PAULO, M. Q.; FOURNET, A. Pseudoanone and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 438-440, 1996.
- RAHMAN, M. M.; PARVIN, S.; HAQUE, M. E.; ISLAM, M. E.; MOSADDIK, M. A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 484-489, 2005.
- RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Biodiversity Patterns of woody cerrado vegetation: an overall view. In: PENNINGTON, R.T.; LEWIS, G.P.; RATTER, J.A. (eds.) **Neotropical savannas and seasonally dry forests**. Plant diversity biogeography and conservation, CRC Press, Florida, 2006.
- RODRIGUES, A. M. S.; DE PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J. F.; ESPÍNDOLA, L. S. Larvicidal activity of some cerrado plants extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.
- RODRÍGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; FERNANDEZ, D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.23, n.4, p. 420-429, 2007.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; PASTORE, G. Evaluation of the Antioxidant Properties of the Brazilian Cerrado Fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, 2006.
- ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G. EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidante activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by eletrospray ionization spectrometry. **Food chemistry**, v. 104, p. 1048-1054, 2007.
- ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity *in vitro*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 814-821, 2010.
- ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats Influência dos extratos etanólicos de araticum (*Annona crassiflora*) na atividade das enzimas hepáticas de ratos intoxicados por CCl₄. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 93-100, 2011.
- SAITO, M. L., M.L.; POTT, A.; FERRAZ, J. M. G.; NASCIMENTO, R. dos S. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH) e *Anticarsia gemmatalis* HUBNER. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 14, p. 1-10, 2004a.

SAITO, M. L.; POTT, A. FERRAZ. J. M. G.; NASCIMENTO, R. dos S. Avaliação da Atividade Inseticida em Espécies de Plantas do Pantanal Matogrossense. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 19, 2004b.

SANABRIA, L.; SEGOVIA, E. A.; GONZÁLEZ, N.; ALCARAZ, P. BILBAO, V. N. Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos em larvas de *Aedes aegypti* (primeiros ensayos). **Memórias del instituto de investigaciones en ciencias de la Salud**, v. 5, n. 1, p. 26-31, 2009.

SANCHEZ, C. M.; GONZALEZ, N.; GONZALEZ, E. Larvicidal effect of aqueous plant extracts on *Aedes aegypti*. **Manejo Integrado de Plagas**. v. 45, p. 30-33, 1997.

SANTOS, A. F.; SANT'ANA, E. G. Molluscidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 115-120, 2001.

SANT'ANA, A.E.G; LUNA, J de S.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C. de.; NAVARRO, D. M. A.; de PAULA, J. E. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2549–2556, 2007.

SANT'ANA, A.E.G; LUNA, J de S.; SANTOS, A. F. dos.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C. de.; MENDONÇA, F.A.C. de.; BIEBERA, L. W. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.199–206, 2005.

SANT'ANA, E. G.; LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; GENET, J-P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 137-147, 2006.

SANTIAGO, G. M. P.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L.; SANTOS, R. P.; POULIQUEN, Y. B. M.; ARRIAGA, A. M. C.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.)Kuntze Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.5, n.3, p. 187-190, 2005.

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

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

SANTOS, L.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; OLIVEIRA, A.B.; CASSADY, J.M. Grossamide and N-trans-caffeoyltyramine from *Annona crassiflora* seeds. **Planta Medica**. v. 62, n. 1, p. 76-79, 1996a.

SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; SUN, N.-J.; CASSADY, J. M.; OLIVEIRA, A. B. Araticulin, a new bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 705–707, 1996b.

SANTOS, L. A. R.; BOAVENTURA, M. A. D.; PIMENTA, L. P. S. Cornifolin, a new bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from *Annona cornifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 1, p. 78–82, 2006.

SANTOS, L. A. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A. St - Hil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 48-51, 2007.

SANTOS, P. R. D. dos. **Estudo químico de *Annona dioica***. Seropédica, Programa de Pós-Graduação em Química, UFRRJ, 1993. Tese de doutorado.

- SAKTHIVADIVEL M.; THILAGAVATHY D. Larvicidal and chemosterilants activity of the acetone fraction of petroleum ether extract from *Argemone mexicana* L. seed. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 213-216, 2003.
- SCHLIE-GUZMÁN, M. A.; GARCIA-CARRANCA, A.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. *In Vitro* and *In Vivo* Antiproliferative Activity of Laherradurin and Cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1128-1133, 2009.
- SIVAGNANAME, N.; KALYYANASUNDARAM, M. Laboratory evaluation of methalonic extract of *Atlantia monophylla* (family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 115-118, 2004.
- SHIRWAIKAR, A.; RAJENDRAN, K.; KUMAR, C. D.; BODIA, R. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 171-175, 2004.
- SIDDIQUI, B. S.; AFSHAN, F.; GHASUDDIN; FAIZI, S.; NAQVI, S. N. H.; TARIQ, R. M. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. **Phytochemical**, v. 53, p. 371-376, 2000.
- SIDDIQUI, B. S.; GULZAR, T.; MAHMOOD, A.; BEGUM, S. KHAN, B.; AFSHAN, F. New insecticidal amides from petroleum ether extract of dried *Piper nigrum* L. whole fruits. **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 1349-1352, 2004.
- SILVA, H. H.; SILVA, I. G.; LIRA, K. S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus,1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, v.27, p.51-63, 1998.
- SILVA, M. V.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; FERREIRA, E. C.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SILVA, M. R. R. Growth inhibition effect of Brazilian cerrado plant extracts on *Candida* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 138-141, 2001.
- SIMAS, N. K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; FILHO, A. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myrozylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.
- SIQUEIRA de, J. M.; SILVA da, D. B.; MATOS, M. de F. C.; NAKASHITA, S. T.; MIISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. da S. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfinicos obtidos de *Annonaceae*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007.
- SONNET, P. E.; JACOBSON, M. Tumor inhibitors II. Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 8, p. 1254-1256, 1971.
- SOUZA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; KAPLAN, M. A. C. Propriedades Analgésica e Antiinflamatória do extrato metanólico de folhas de *Annona coriacea* Mart. (*Annonaceae*). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 872-877, 2007.
- TAUIL, P. L. Urbanização e Ecologia da Dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 99-102, 2001.
- TEIXEIRA, K. R. P.; BRITO, J. R.; OLIVEIRA, L. M. F.; COSTA, L. F.; OLIVEIRA, A. M.; FONSECA, C. A. Incidência do vírus da dengue na região metropolitana de Goiânia. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 53-55, 2006.

TEMPONE, A.G.; TREIGER BORBOREMA, S.E.T; ANDRADE Jr., GUALDA, N.F.A.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S. ; BACHERA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005.

TOUBOUL, D.; ALLEGRAND, J.; SCHMITZ-AFONSO, P.; GUÉRINEAU, V.; GIULIANI, A.; LEVEN, J.; CHAMPY, P.; LAPRÉVOLE, O. Structural study of acetogenins by tandem mass spectrometry under high and low collision energy. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 3602-3608, 2010.

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

VEGA, M. R. G. **Constituintes Químicos e a atividade biológica de *Eupatorium macrocephalum* Less (Asteraceae) e *Annona dioica* St. HILL (Annonaceae): Uma contribuição ao estudo de plantas medicinais no Paraguai.** Seropédica, Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, UFRJ, 2007. **Tese de doutorado.**

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.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Plantas inseticidas. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.** 1º edição. Editora UFRGS e UFSC, Porto Alegre e Florianópolis p. 739-754, 1999.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M. W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J. T. B.; CORREA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos Naturais no controle de insetos.** Serie de textos da escola de verão em Química. Editora UFSCar, São Carlos, p. 23-46, 2001.

VILAR, J. B.; FERRI, P. H.; CHEN-CHEN, L.; FERREIRA, F. L.; GUILLO, L. A. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p.141-147, 2008.

WANDSCHEER, C. B.; DUQUE, J. E.; da Silva, M. A. N.; FUKUYAMA, Y.; WOHLKE, J. L. ADELMANN, J.; FONTANA, J. D. Larvicidal action of ethanolic extracts from endocarps of *Melia acedach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon**, v. 44, p. 829-835, 2004.

WEINBERG, M. DE L. D.; PIRES, V.; WEINBERG, J.; OLIVEIRA, A. B. DE. Inhibition of drug-induced contractions of guinea-pig ileum by *Annona crassiflora* seed extract. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 70-72, 1993.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector control: methods for use by individuals and communities**, Geneva, 1997.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Report on Insect Vectors and Human Health**, Geneva, 2003.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**, Geneva, 2005.

WU, J.; GU, Z-M.; ZHOU, D. Screening for Annonaceous acetogenins in Bioactive plant extracts by liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 3, p. 242-248, 1997.

WU, Y.; LIAW, C.; CHANG, F.; CHEN, S.; WU, C.; LEE K. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona Montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4767-4776, 2005.

WU, Y.; LIAW, C.; YANG, Y.; CHEN, M.; CHANG, F.; CHEN, S.; WU, S. Mono-tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa* as Cytotoxic Agents and Calcium Ion Chelators. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 5, p. 764-771, 2008.

YANG, H.; ZHANG, N.; LI, X.; HE, L.; CHEN, J. New nonadjacent bis-THF ring acetogenins from seeds of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 177-181, 2009.

YU, J-G.; HU, E. X.; HO, HO, D. K.; BEAN, F. M.; STEPHENS, R. E. JOHN M. CASSADY. Absolute Stereochemistry of (+)-Gigantecin from *Annona coriacea* (*Annonaceae*). **The Journal of Organic Chemistry**, v. 59, p. 1598-1599, 1994.

ZAFRA-POLO, M. C.; GONZALEZ, M. C.; ESTORNELL, E.; SAHPAZ, S.; CORTEST, D. Acetogenins from *Annonaceae*, Inhibitors of Mitochondrial Complex I. **Phytochemist**, v. 42, n. 2, p. 253-271, 1996.

ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N. H.; SHI, G.; GU, Z-M.; HE, K.; MCLAUGHLIN, J. L. Recent Advances in Annonaceous acetogenins. **Natural Product Reports**, v. 13, n. 4, p. 275-306, 1996.

ANEXOS

Cromatogramas *A. coriacea*

i) Frações do extrato hexânico (EHex-c2) de *A. coriacea*

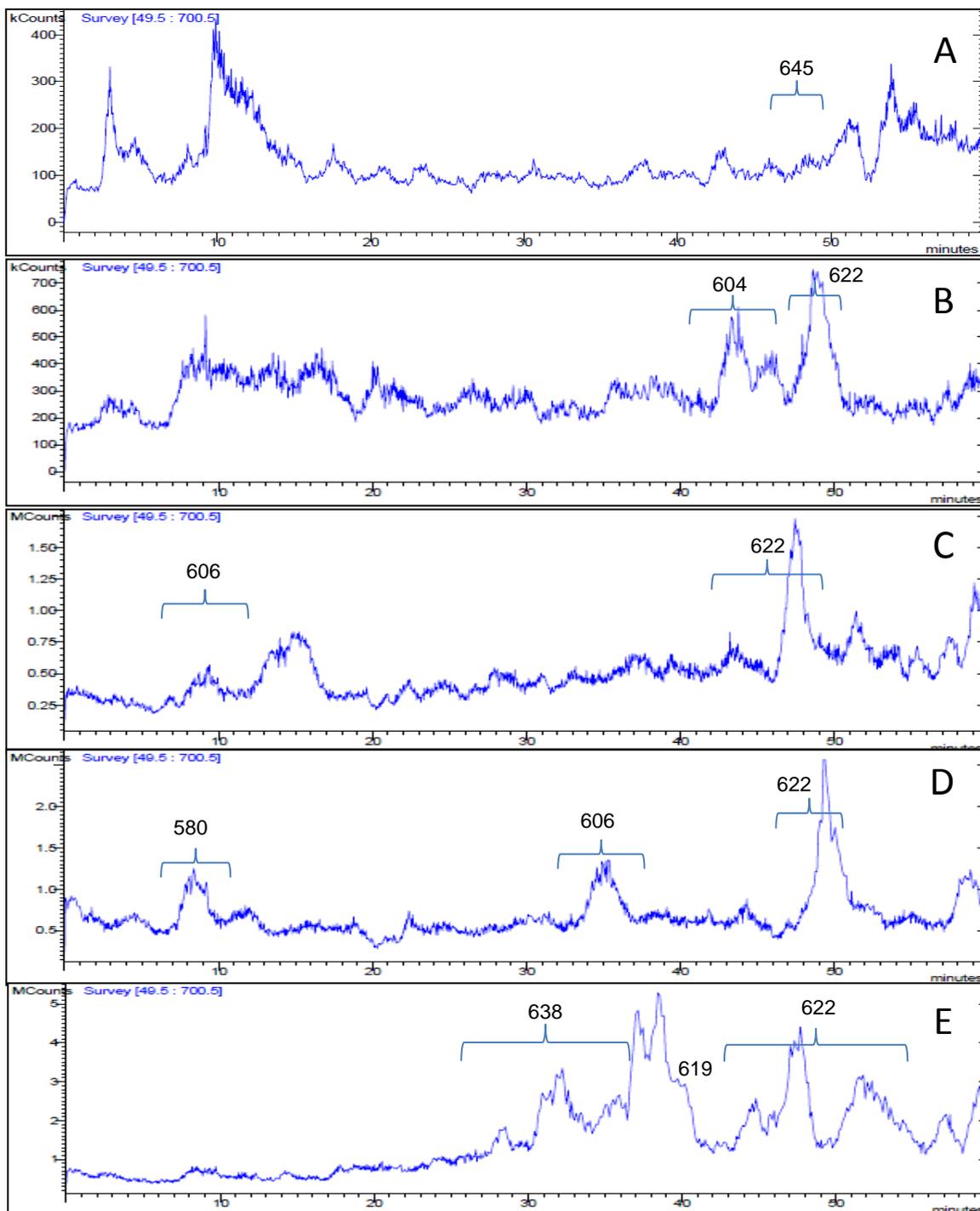


Figura 66– Cromatogramas M2-B (A); M2-C (B); M2-D (C); M2-E (D); M2-F (E) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

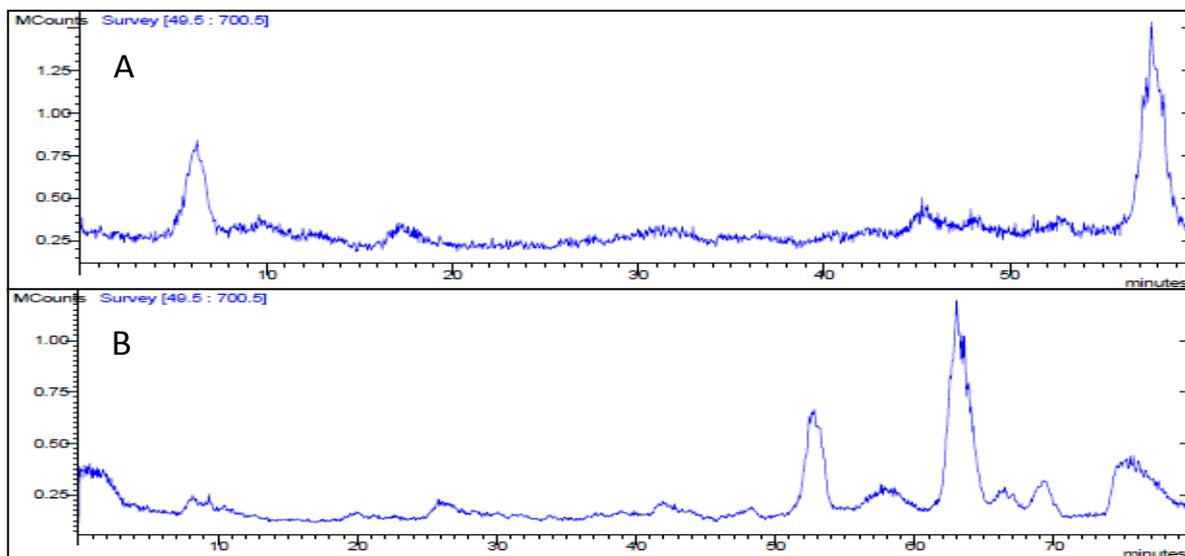


Figura 67 – Cromatograma de M1-30A (A) e M1-30B (B) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

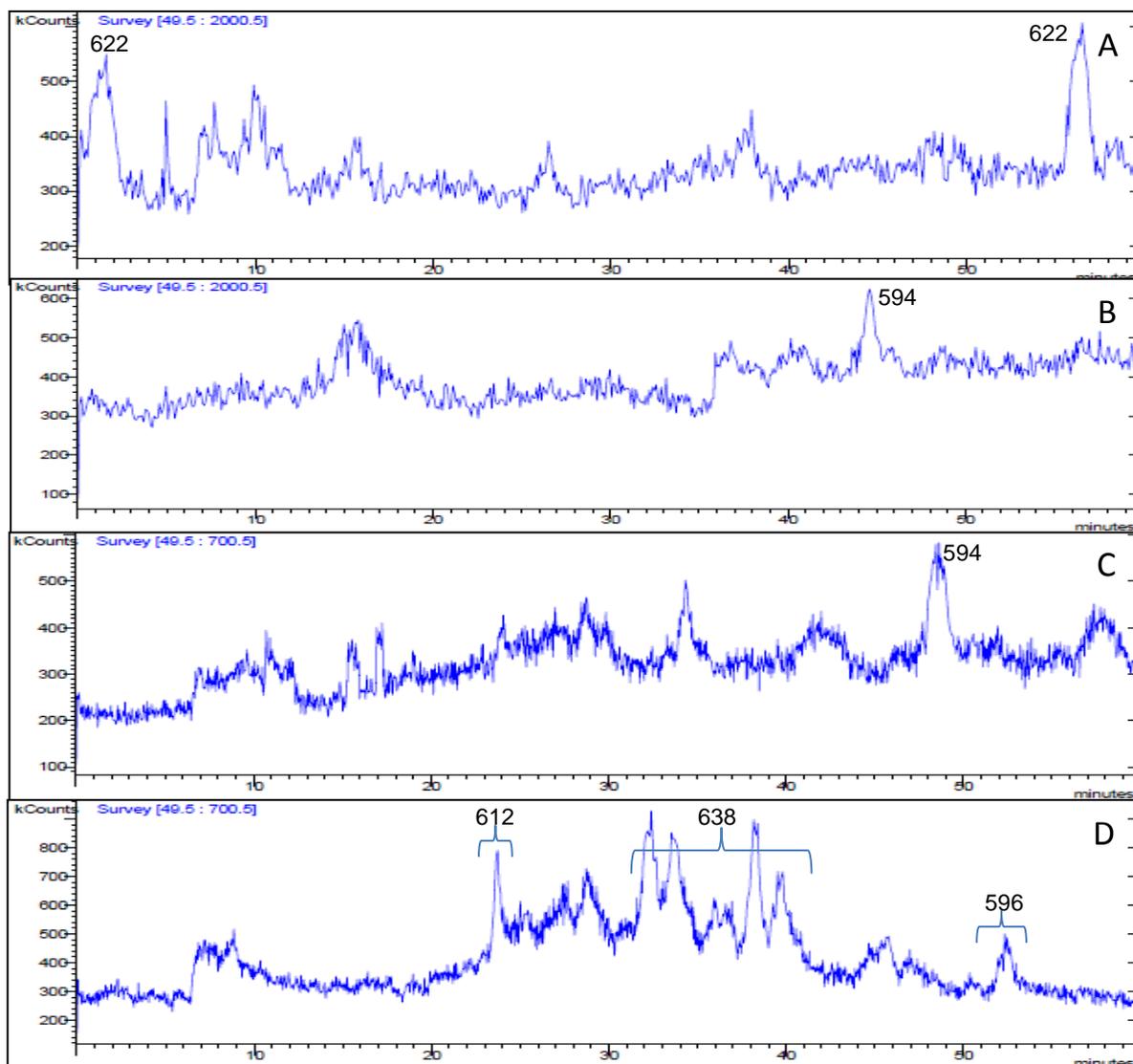


Figura 68– Cromatograma de M3-B (A); M3-C (B); M3-D (C); M3-E (D) obtido em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

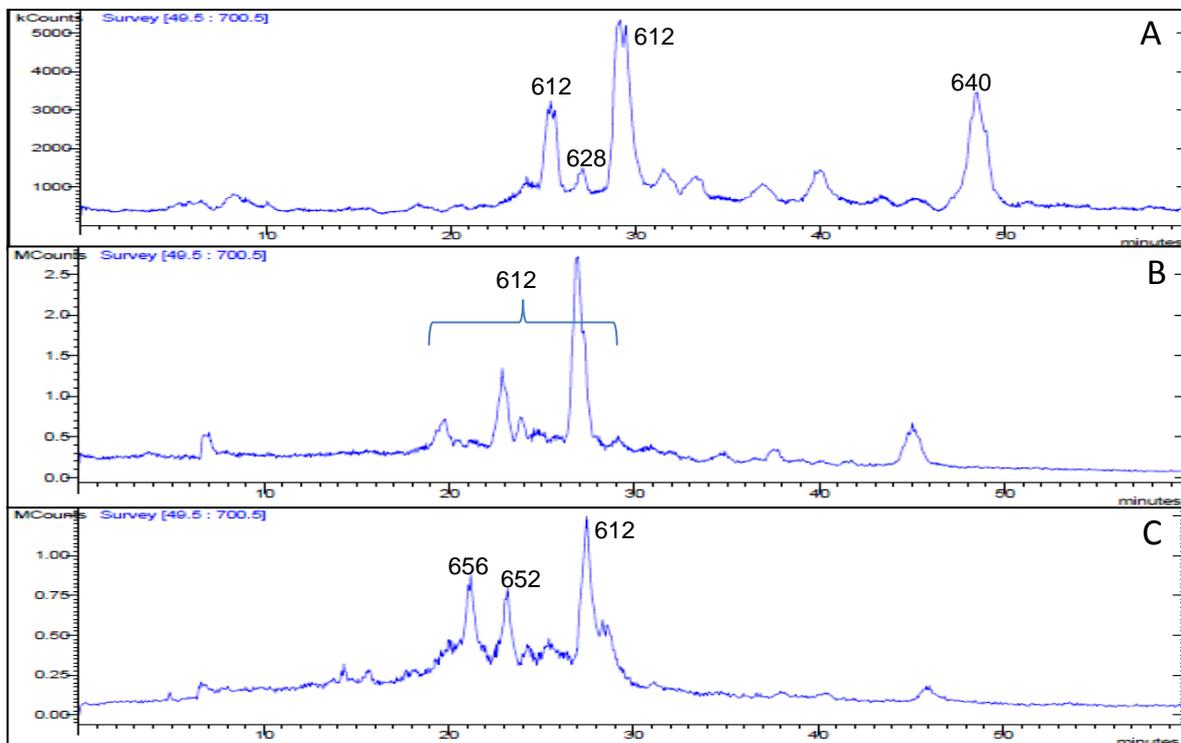


Figura 69– Cromatograma de M3-20 (A); M3-22 (B); M3-F (C) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

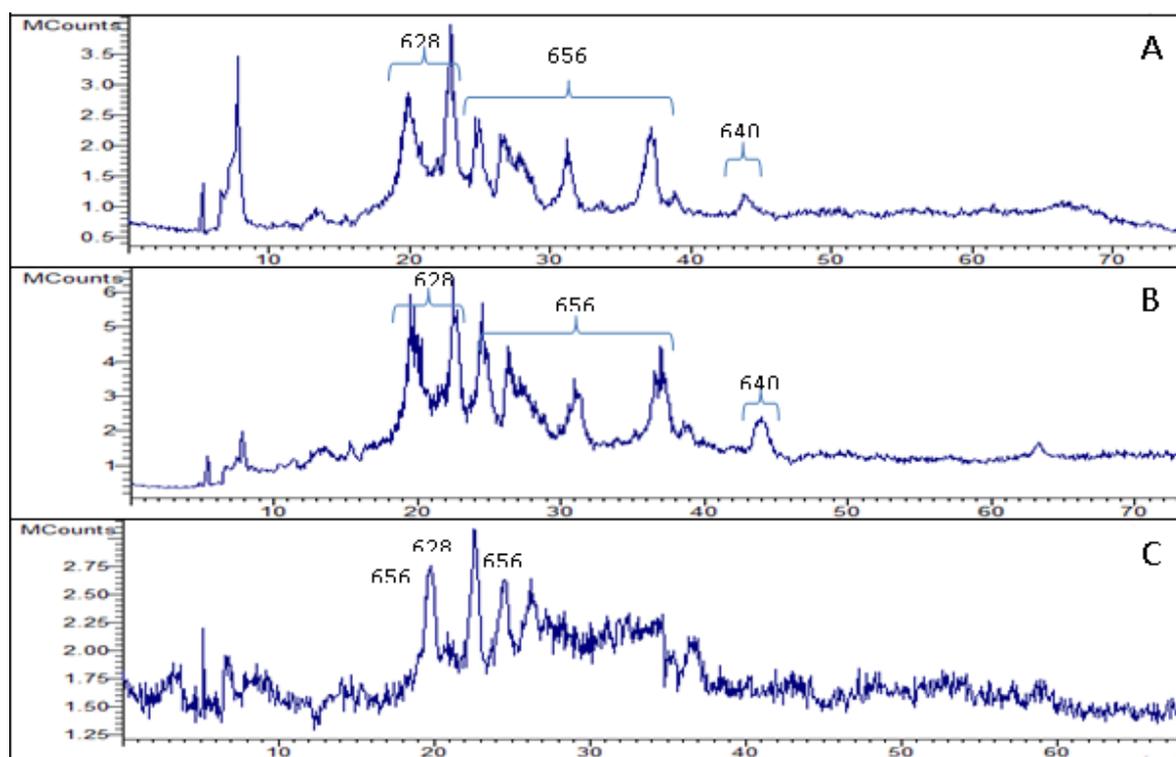


Figura 70 – Cromatograma de M3-17 (A), M3-18 (B) e M3-19 (C) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

ii) Frações do extrato metanólico (E13) de *A. coriacea*

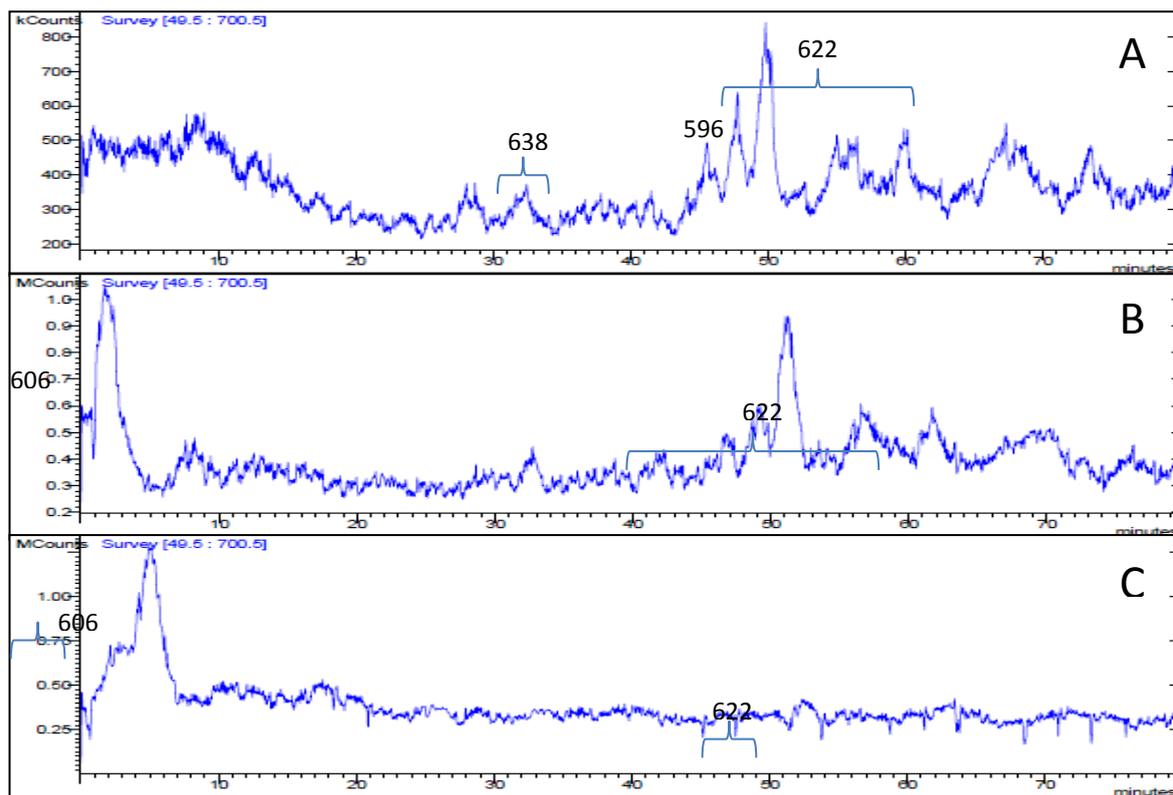


Figura 71 – Cromatograma de B1-A (A); B1-B (B); B1-C (C) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

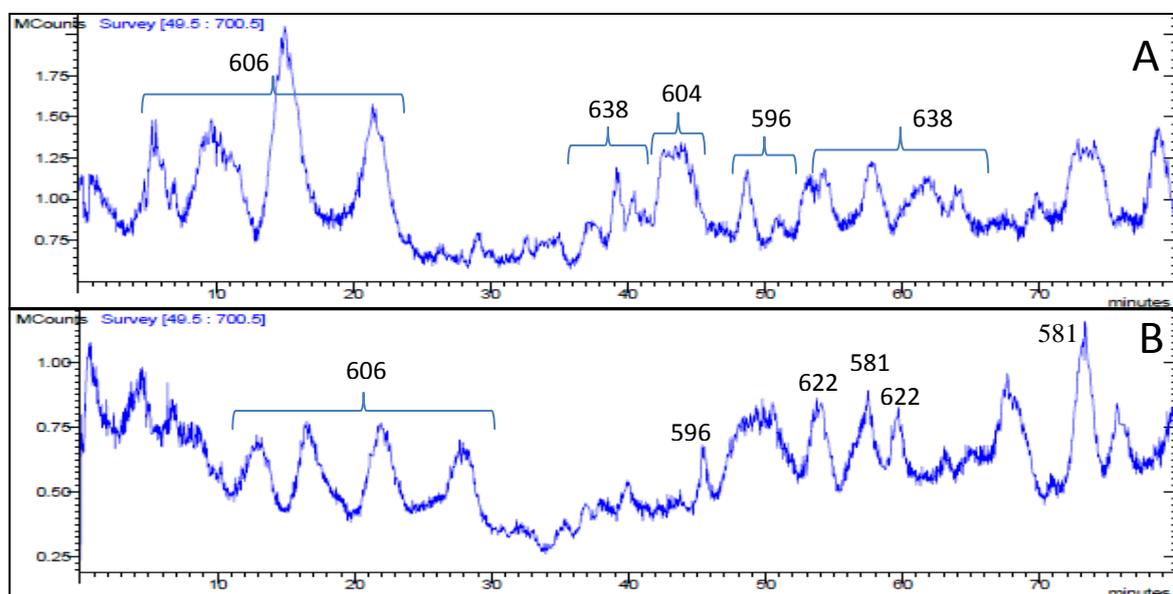


Figura 72 – Cromatograma de B2-A (A); B2-B (B) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

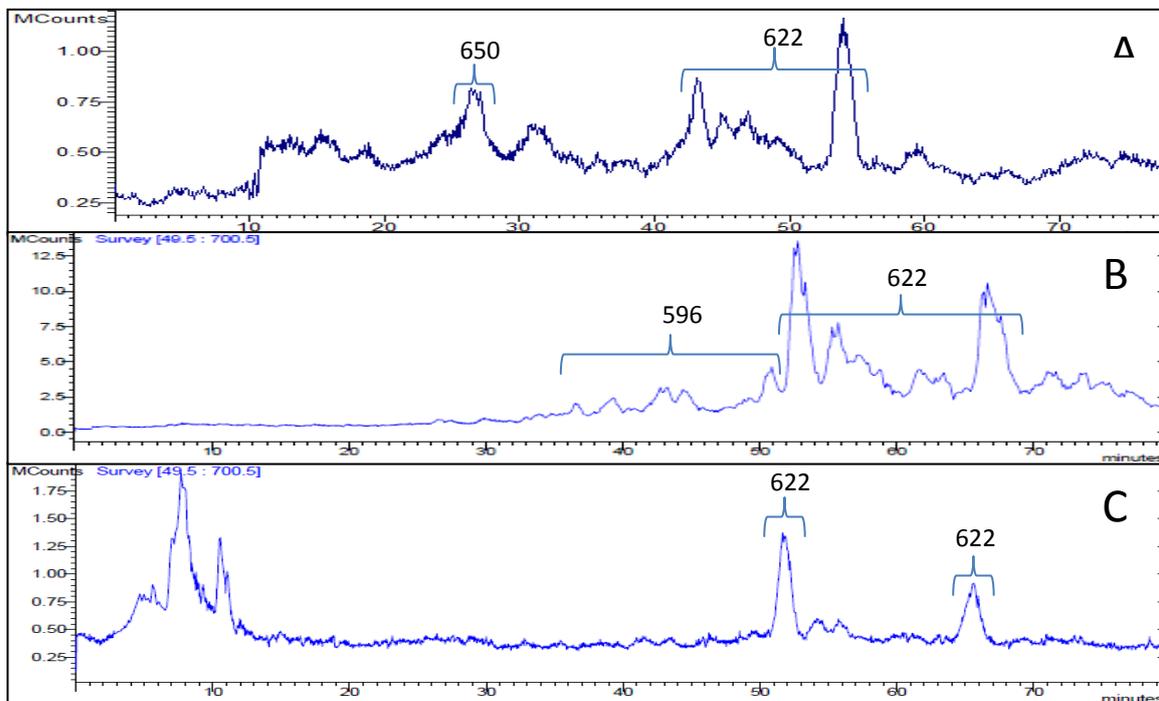


Figura 73 – Cromatograma de B3-B (A); B3-C (B); B3-D (C) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

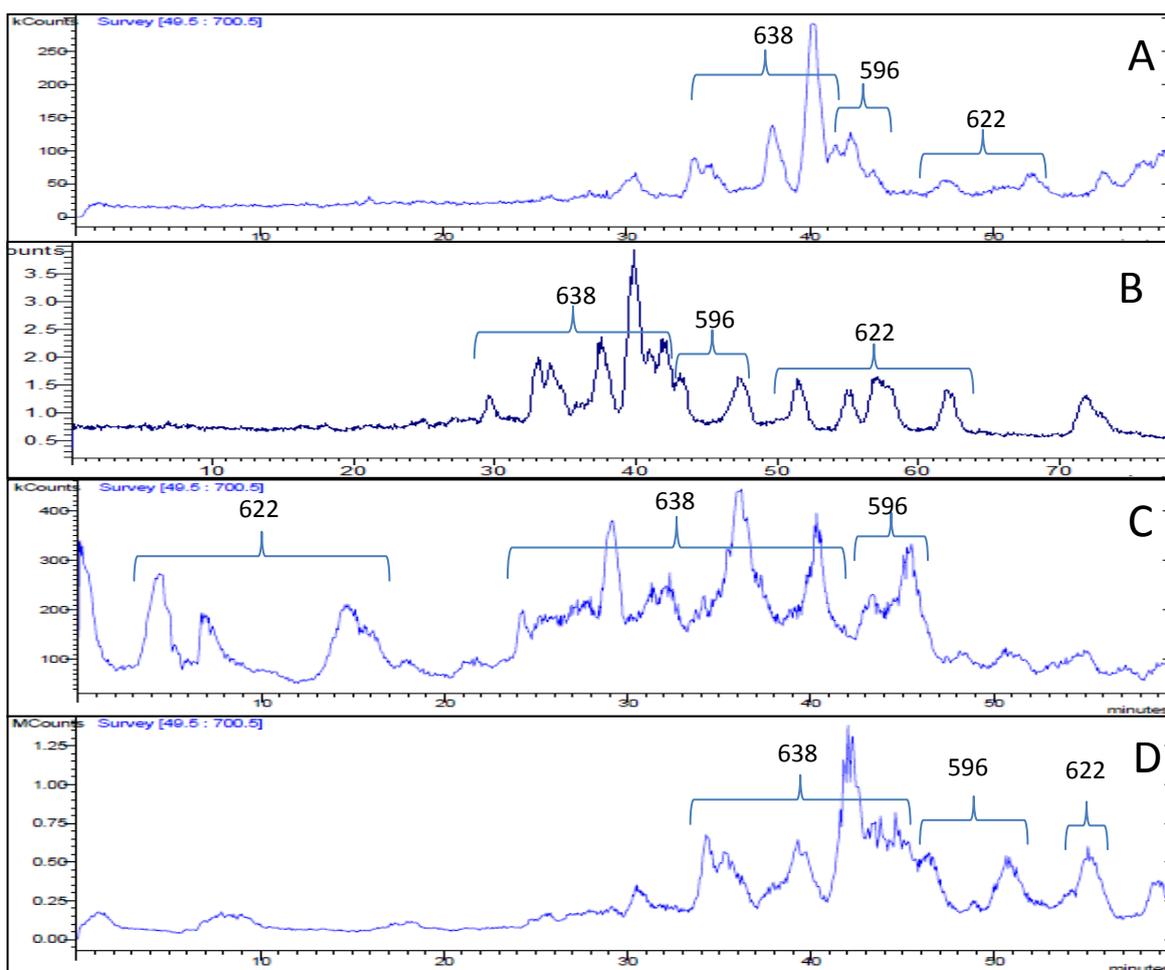


Figura 74 – Cromatograma de B4-D (A); B4-E (B); B4-F (C); B4-G (D) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

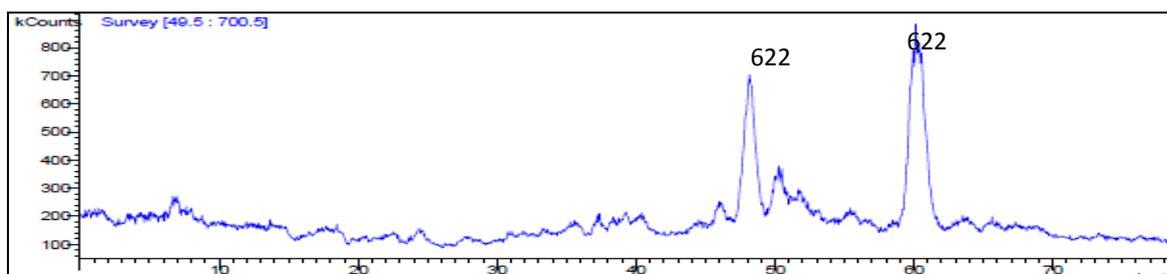


Figura 75 – Cromatograma de B3-f1 em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

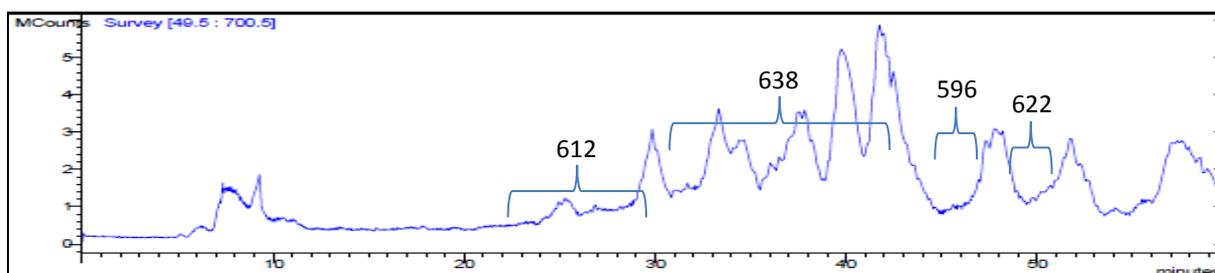


Figura 76 – Cromatograma de C3 (f8-9) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

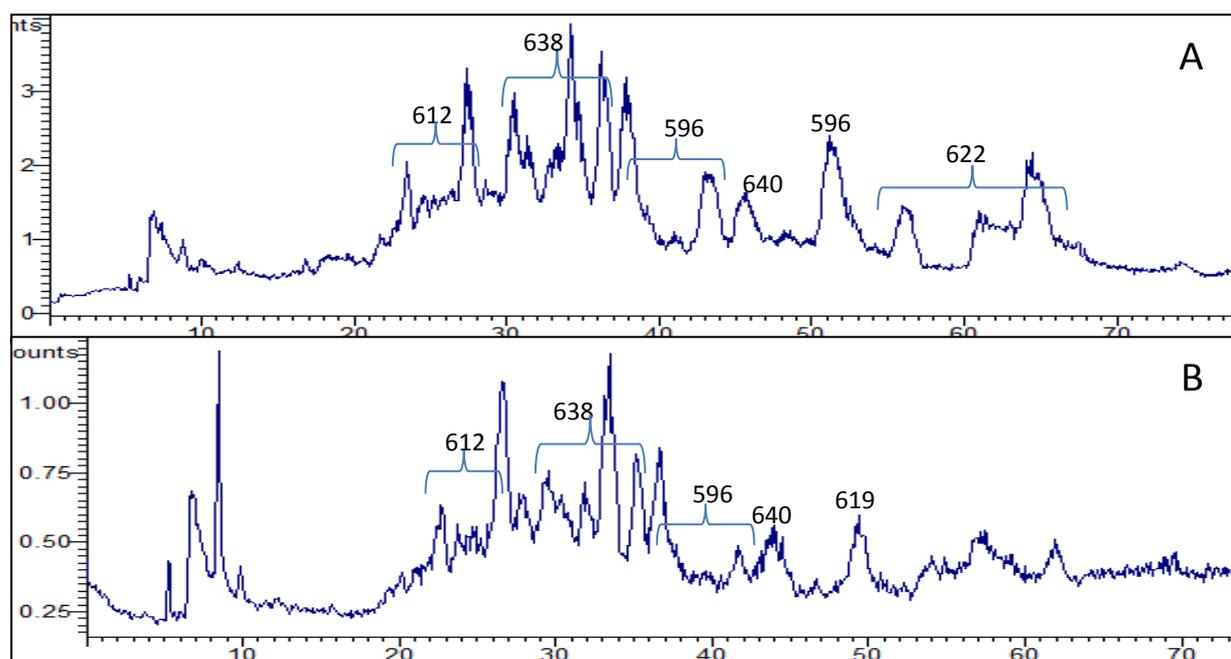


Figura 77 – Cromatograma de C2-C (A) e C2-D (B) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

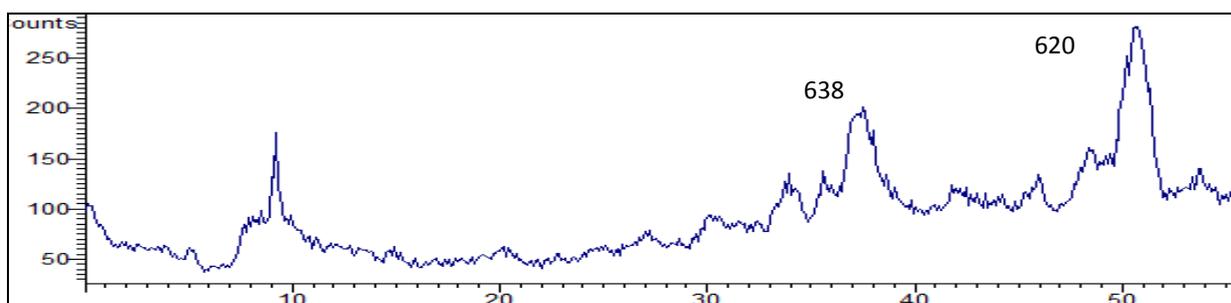


Figura 78 – Cromatograma de D3-C em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

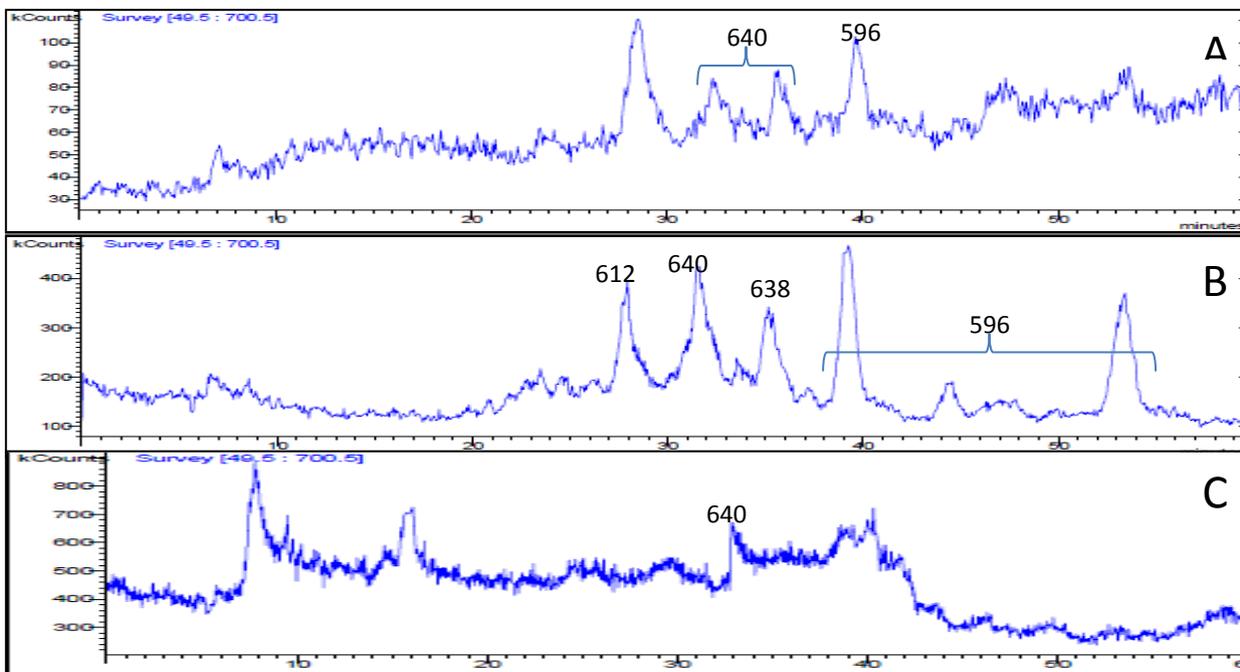


Figura 79 – Cromatograma de D4-A (A); D4-B (B); D4-C (C) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

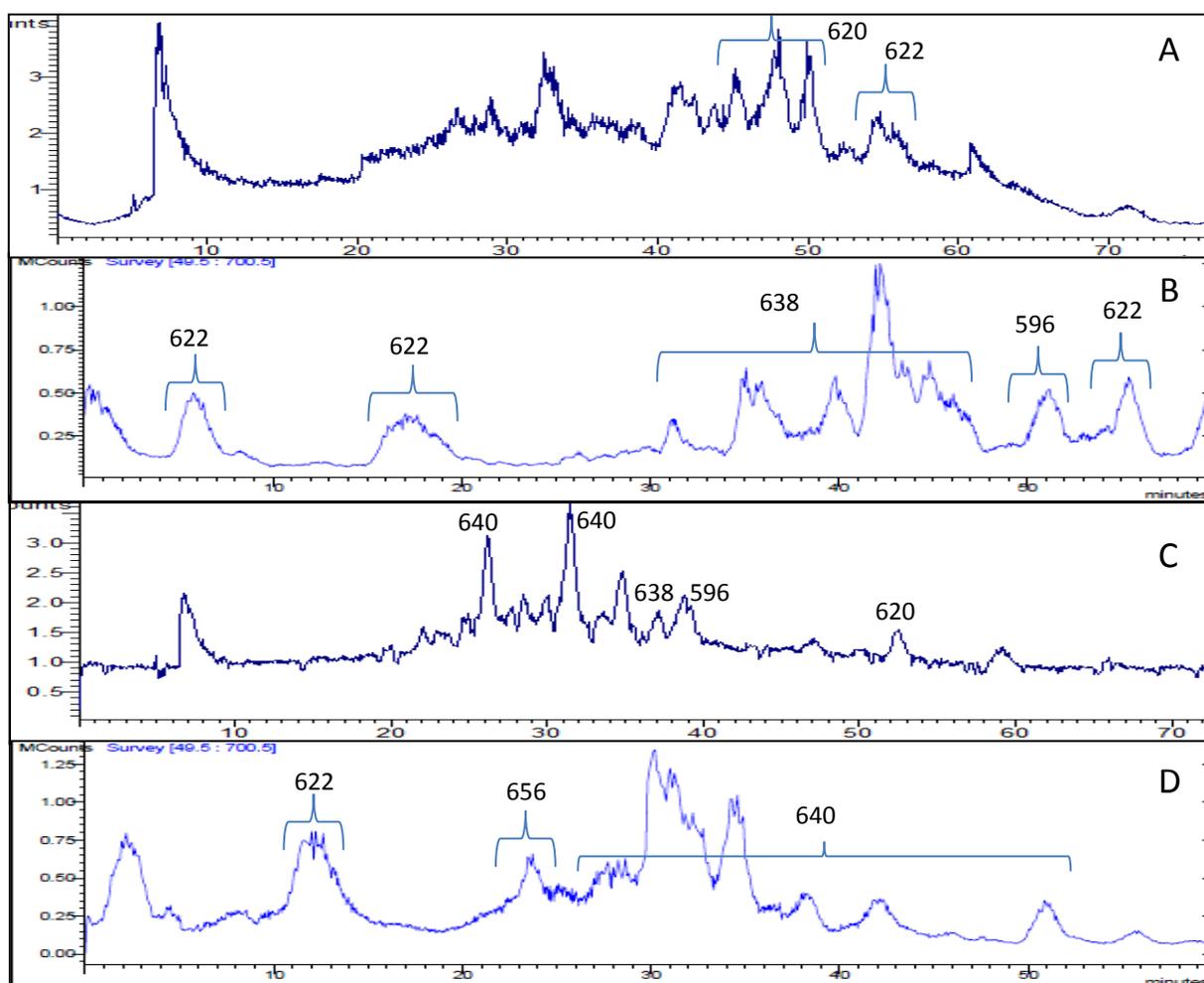


Figura 80 – Cromatograma de E2 (A), E3-B (B), E3-A (C) e E4 (D) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

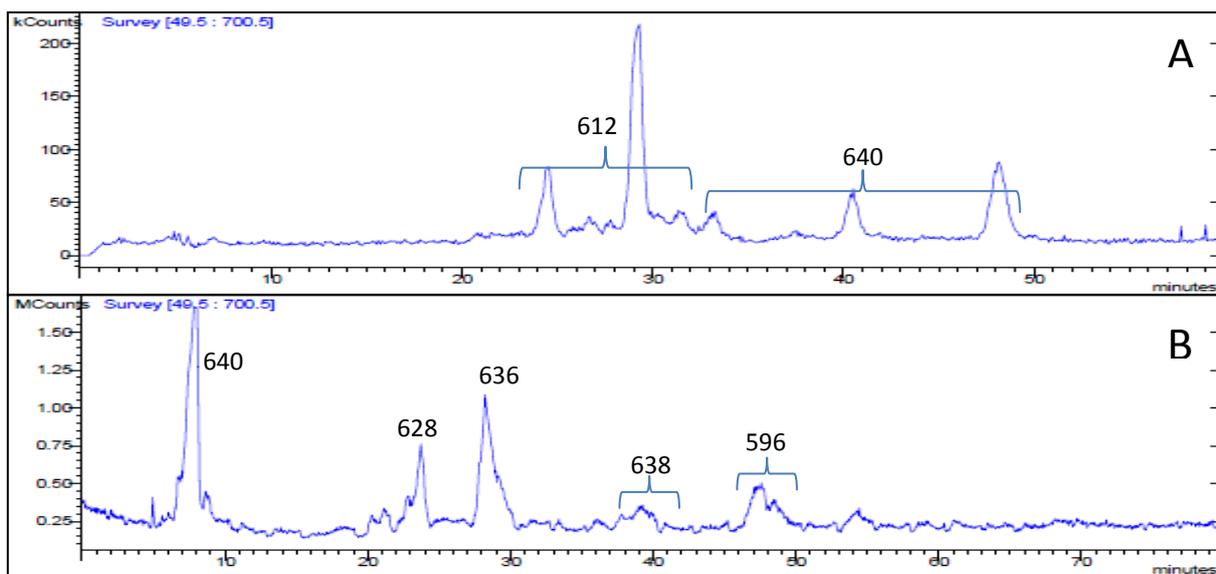


Figura 81 – Cromatograma de F2-C (A); F3-B (B) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).

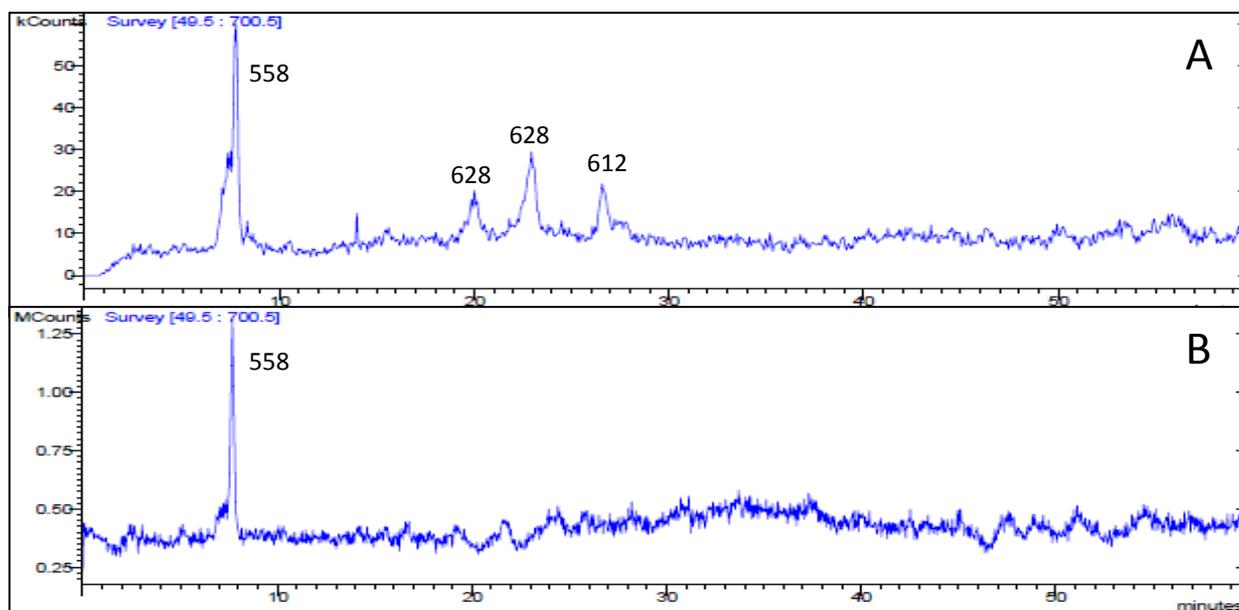


Figura 82 – Cromatograma de ppt52-56C (A) e ppt52-56M (B) em CLAE-EM-ESI (baixa resolução).