



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

JOÃO GABRIEL MORAES JUNQUEIRA

**ESTUDO QUÍMICO DE *Annona coriacea* Mart. E *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.
(Annonaceae)**

CATALÃO - GO

2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	João Gabriel Moraes Junqueira		
E-mail:	jgmjunqueira@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor:	Estudante/Bolsista		
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	GO
		CNPJ:	00889834/0001-08
Título:	ESTUDO QUÍMICO DE <i>Annona coriacea</i> Mart. E <i>Xylopiia aromatica</i> (Lam.) Mart. (Annonaceae)		
Palavras-chave:	<i>Annona coriacea</i> , <i>Xylopiia aromatica</i> , metabólitos secundários, COVs, alcaloide		
Título em outra língua:	CHEMICAL STUDY OF <i>Annona coriacea</i> Mart. and <i>Xylopiia aromatica</i> (Lam.) Mart. (Annonaceae)		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Annona coriacea</i> , <i>Xylopiia aromatica</i> , secondary metabolites, VOCs, alkaloid		
Área de concentração:	Química		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	26/03/2015		
Programa de Pós-Graduação:	em Química – UFG/RC		
Orientador (a):	Profª. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino		
E-mail:	vanessa.pasqualotto@pq.cnpq.br		
Co-orientador (a):*	Lincoln Lucilio Romualdo		
E-mail:	lincoln.romualdo@gmail.com		

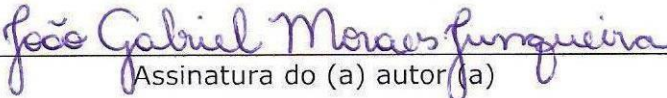
*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


Assinatura do (a) autor(a)

Data: 17/11/2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

JOÃO GABRIEL MORAES JUNQUEIRA

**ESTUDO QUÍMICO DE *Annona coriacea* Mart. E *Xylopia aromatica*
(Annonaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Química da Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Área de concentração: Química

Linha de pesquisa: Produtos Naturais e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino

Co-orientador: Prof. Dr. Lincoln Lucilio Romualdo

CATALÃO - GO

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

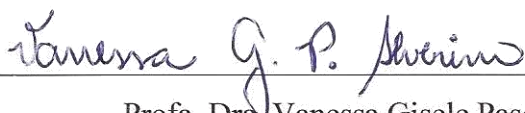
Junqueira, João Gabriel Moraes
ESTUDO QUÍMICO DE *Annona coriacea* Mart. E *Xylopiá aromática* (La
m.) Mart. (Annonaceae) [manuscrito] / João Gabriel Moraes
Junqueira. - 2015.
xvi, 123 f.

Orientador: Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino; co
orientador Dr. Lincoln Lucilio Romualdo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Regional
Catalão, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão,
2015.

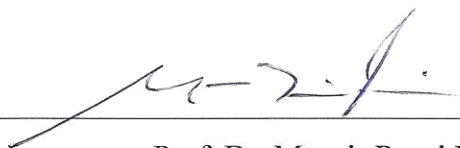
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. *Annona coriacea* . 2. *Xylopiá aromática* . 3. metabólitos
secundários. 4. COVs. 5. alcaloide. I. Pasqualotto Severino, Vanessa
Gisele, orient. II. Romualdo, Lincoln Lucilio, co-orient. III. Título.

*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de Dissertação de Mestrado do candidato **João Gabriel Moraes Junqueira** realizada em 26 de março de 2015.*



Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino



Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero

Dedico este trabalho ...

...À minha Mãe (Maristela);

Ao meu Pai (Márcio Antônio) *in memoriam*;

Ao meu irmão (Márcio Henrique);

Aos meus avós (Gabriel, Iracy, João e Maria Abadia),

pelo apoio, carinho, amor e ensinamentos que tive durante minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. **Vanessa G. Pasqualotto Severino** por todo apoio, amizade, confiança, incentivo e pelo tempo dedicado a este trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Lincoln L. Romualdo** por todo ensinamento transmitido.

À Profa. Dra. **Richele P. Severino** pelo convite e por ter me apresentado a Química de Produtos Naturais.

À Me. **Michelle Nauara G. do Nascimento** pelo auxílio neste trabalho e amizade. Foram momentos enriquecedores ao seu lado.

À Dra. **Ana Paula Terezan** pelo auxílio neste trabalho e todo ensinamento compartilhado.

Ao Dr. **Francisco Wendel B. de Aquino** pela ajuda com a parte de quimiometria e todo auxílio para conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. **Elaine Rosecher Carbonero** por toda experiência de vida transmitida em muitas de nossas conversas no laboratório.

Ao Prof. Dr. **Antônio Gilberto Ferreira**, do Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos e Prof. Dr. **Luciano Morais Lião**, do Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás - Regional Goiânia, pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Prof. Dr. **Helder Nagai Consolaro** pela identificação da espécie *Annona coriacea* Mart. e a Profa. Me. **Larissa Cavalheiro da Silva** por identificar a espécie *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.

Aos meus amigos (**Estefânia, Evandro, Jordana, Juliana, Leonardo, Michelle Machado e Renan**) que fizeram e fazem parte do Laboratório de Química de Produtos Naturais, em que compartilhamos bons momentos e ensinamentos juntos durante esse tempo.

Aos meus **Colegas (Antônia, Felipe e Luciana)** do Laboratório de Produtos Naturais pelos bons momentos que passamos.

À **Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão** e ao **Programa de Pós-Graduação em Química** pelo suporte para realização deste trabalho.

À **CAPES** pela bolsa concedida.

Ao meu pai (**Márcio Antônio**) *in memoriam*, por todos os valores e ensinamentos que me ensinou, graças a você consegui alcançar mais este objetivo em minha vida.

À minha mãe (**Maristela**) que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e que nunca mediu esforços para poder me ajudar.

À toda minha família que sempre me apoiou e compreendeu minha ausência. Em especial para **Antônio Gabriel, Eder, Francisco, Gabriel, Graciely, Iracy, Joana Darc, João, Márcio Henrique, e Maria Abadia.**

Aos meus amigos **Ana Paula, Cleire, Jane, João José, Karla, Nilda e Raphael Lucas** pelos bons momentos vividos.

À **Deus** por todo conforto nos momentos mais difíceis e por guiar minha vida.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

“Pare de pensar que você não está pronto. Ninguém realmente se sente 100% pronto quando uma oportunidade aparece. É isto acontece porque as mais grandiosas oportunidades na vida nos forçam a crescer além das nossas zonas de conforto, o que significa que não estaremos totalmente confortáveis, no início.”

Autor desconhecido

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 01: ESTUDO QUÍMICO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Annona coriacea* Mart. E *Xylopi aromatic* (Lam.) Mart (Annonaceae)

FIGURA 1.1 - Hidrodestilação via aparelho tipo Clevenger	6
FIGURA 1.2 - Esquema representativo dos tipos de revestimentos poliméricos comerciais para <i>SPME</i>	7
FIGURA 1.3 - Modos de extração utilizando fibras de <i>SPME</i> : (a) extração direta, (b) extração no modo <i>headspace</i> e (c) extração no modo indireto	9
FIGURA 1.4 - Sistema utilizado para extração dos COVs no <i>HSE</i>	10
FIGURA 1.5 - Sistema utilizado para extração dos COVs por <i>HSD</i>	11
FIGURA 1.6 - Flores de Annonaceae e adaptação ao besouro polinizador: (a) <i>G. neglecta</i> com polinizador pequeno (Nitidulidae), (b) <i>A. coriacea</i> e <i>A. crassiflora</i> com polinizador grande (Dynastinae)	12
FIGURA 1.7 - (a) Espécie e (b) flores de <i>X. aromatica</i>	14
FIGURA 3.1 - Extração dos COVs das flores de <i>A. coriacea</i> utilizando a fibra PA	20
FIGURA 3.2 - Extração <i>in vivo</i> dos COVs das flores de <i>X. aromatica</i> utilizando os revestimentos: (i) PDMS, (ii) PA, (iii) CAR/PDMS e (iv) DVB/CAR/PDMS.....	22
FIGURA 3.3 - Realização do branco para as extrações <i>in vivo</i> utilizando os revestimentos: (i) PDMS, (ii) PA, (iii) CAR/PDMS e (iv) DVB/CAR/PDMS.....	22
FIGURA 3.4 - (a) Flor lacrada no <i>vial</i> de <i>HS-SPME</i> , (b) exposição da fibra PA e (c) CAR/PDMS	23
FIGURA 3.5 - Realização do branco para as extrações <i>in vitro</i> utilizando os revestimentos: (i) PA e (ii) CAR/PDMS	24
FIGURA 4.1 - Cromatogramas de íons totais (CIT) obtidos após análise de <i>HS-SPME</i> do aroma floral de <i>A. coriacea</i> com as fibras (a) PA, (b) PDMS e (c) CAR-PDMS.....	29
FIGURA 4.2 - (a) CIT obtido após análise de <i>HS-SPME</i> da fibra PA e padrão da diidro- β -ionona; (b) espectro de massas do composto (5) e (c) padrão da diidro- β -ionona	31
FIGURA 4.3 - Flor de <i>A. coriacea</i> e besouro da família Dynastinae.....	33
FIGURA 4.4 - CIT obtido após análise de <i>HS-SPME</i> com as fibras (a) PA, (b) PDMS e (c) CAR-PDMS	39
FIGURA 4.5 - Representação da matriz de dados utilizada nas análises de ACP para os experimentos <i>in vivo</i>	41
FIGURA 4.6 - Cromatogramas normalizados para as extrações de DVB/CAR/PDMS 15 e 120 min e CAR/PDMS 15min.....	50
FIGURA 4.7 - CIT obtido após análise do óleo essencial via CG-EM.....	63

CAPÍTULO 02: ESTUDO QUÍMICO DO CAULE E DAS FOLHAS DE *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae)

FIGURA 1.1 - (a) Estrutura química de capsaicina	74
FIGURA 1.2 - (a) Estrutura química de zucapsaicina	75
FIGURA 1.3 - O Cerrado brasileiro e suas regiões	76
FIGURA 1.4 - Frutos de (a) <i>A. crassiflora</i> , (b) <i>A. squamosa</i> e (c) <i>A. muricata</i>	78
FIGURA 1.5 - Estrutura química de uvaricina	79
FIGURA 1.6 - Estruturas químicas da bulatacina (4) e bulatacinona (5)	79
FIGURA 1.7 - Estruturas básicas dos esqueletos de alcaloides: (a) aporfínicos e (b) oxaporfínicos	80
FIGURA 1.8 - Estruturas químicas de (6) liriodenina, (7) <i>O</i> -metilmoscatolina e (8) kuafumina	81
FIGURA 1.9 - Espécie de <i>A. coriacea</i> , com sua flor, situada nas dependências da UFG/RC.....	82
FIGURA 3.1 - Fluxograma do fracionamento da FAC	95
FIGURA 3.2 - Cromatograma da fração 5.4.1 obtido por CLAE no modo analítico	97
FIGURA 3.3 - Cromatograma obtido por CLAE no modo analítico	98
FIGURA 3.4 - Fluxograma do fracionamento da FAF.....	99
FIGURA 4.1 - Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) da substância 01	103
FIGURA 4.2 - Espectro de RMN de ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) da substância 01	104
FIGURA 4.3 - Mapa de contorno de HSQC da substância 01 (CD ₃ OD, 500 MHz) ...	105
FIGURA 4.4 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância 01 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	106
FIGURA 4.5 - Mapa de contorno de HMBC da substância 01 (CD ₃ OD, 500 MHz) ..	107
FIGURA 4.6 - Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 01 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	108
FIGURA 4.7 - Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz,) da substância 02	112
FIGURA 4.8 - Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 600 MHz) da substância 02	113
FIGURA 4.9 - Mapa de contorno de HSQC da substância 02 (CDCl ₃ , 600 MHz)	114
FIGURA 4.10 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância 02 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	115
FIGURA 4.11 - Mapa de contorno de HMBC da substância 02 (CDCl ₃ , 600 MHz) ..	116
FIGURA 4.12 - Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 02 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	117
FIGURA 4.13 - Espectro de COSY da substância 02 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	118
FIGURA 4.14 - Expansão do espectro de COSY da substância 02 (CDCl ₃ , 600 MHz)....	119

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO 01: ESTUDO QUÍMICO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Annona coriacea* Mart. E *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart (Annonaceae)

TABELA 1.1 - COVs isolados a partir de várias fontes naturais	2
TABELA 1.2 - Compostos majoritários extraídos de diversas partes de <i>X. aromatica</i> .	14
TABELA 4.1 - Identificação dos COVs do aroma floral da espécie <i>A. coriacea</i> usando os revestimentos PA, PDMS e CAR/PDMS	28
TABELA 4.2 - Identificação dos COVs das folhas de <i>A. coriacea</i> usando os revestimentos: PA, PDMS e CAR/PDMS	35
TABELA 4.3 - Identificação dos compostos voláteis das flores de <i>X. aromatica</i> usando diferentes revestimentos	44
TABELA 4.4 - Identificação dos compostos voláteis das flores de <i>X. aromatica</i> nos modos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	57
TABELA 4.5 - Composição química (%) do óleo volátil de <i>X. aromatica</i>	63

CAPÍTULO 02: ESTUDO QUÍMICO DO CAULE E DAS FOLHAS DE *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae)

TABELA 1.1 - Diterpenoides isolados de <i>A. coriacea</i>	83
TABELA 1.2 - Acetogeninas isoladas de <i>A. coriacea</i>	84
TABELA 1.3 - Alcaloides identificados de <i>A. coriacea</i>	89
TABELA 3.1 - Massa obtida do material vegetal e extrato.....	94
TABELA 3.2 - Massa obtida para as frações dos diferentes extratos	94
TABELA 3.3 - Eluição gradiente empregada no modo analítico.....	96
TABELA 3.4 - Eluição gradiente empregada no modo analítico.....	98
TABELA 4.1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 01 e comparação como os dados da literatura.....	102
TABELA 4.2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 02 e comparação com os dados da literatura.....	110
TABELA 4.3 - Correlações observadas nos experimentos de HSQC e HMBC para a substância 02	111

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 01: ESTUDO QUÍMICO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Annona coriacea* Mart. E *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart (Annonaceae)

GRÁFICO 4.1 - Efeito do revestimento das fibras de <i>HS-SPME</i> dos COVs das flores de <i>A. coriacea</i>	27
GRÁFICO 4.2 - Efeito do revestimento das fibras de <i>HS-SPME</i> dos COVs das folhas de <i>A. coriacea</i>	34
GRÁFICO 4.3 - <i>Scores</i> dos experimentos <i>in vivo</i> com exposição das fibras CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PA e PDMS por 15, 30, 45, 60 e 120	42
GRÁFICO 4.4 - <i>Loadings</i> dos experimentos <i>in vivo</i> com tempo de exposição das fibras CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PA e PDMS por 15, 30, 45, 60 e 120 min	48
GRÁFICO 4.5 - <i>Scores</i> dos experimentos <i>in vitro</i> : fibras (CAR/PDMS e PA), tempo de exposição (15 e 60 min) e temperatura (29 e 40 °C)	53
GRÁFICO 4.6 - <i>Loadings</i> para CP1 e CP2 obtidos a partir da ACP realizada com os dados dos experimentos <i>in vitro</i>	54
GRÁFICO 4.7 - Dendograma obtido a partir da AHA realizada com os dados dos experimentos <i>in vitro</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Å	angstrom
ACP	Análise de Componentes Principais
AD-QMP	Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais
AHA	Análise Hierárquia de Agrupamentos
CAR/PDMS	Carboxen/Polidimetilsiloxano
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE	Cromatografia por Exclusão
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
CP	Componente Principal
CPA	Cromatografia em Pressão Atmosférica
CW/DVB	Carbowax/Divinilbenzeno
<i>d</i>	dubleto
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddt</i>	duplo duplo tripleto
DV	Destilação à Vapor
DVB/CAR/PDMS	Dinivilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano
EFSC	Extração com Fluido Supercrítico
ELL	Extração Líquido-Líquido
eV	elétron volts
HD	Hidrodestilação
<i>HS</i>	<i>Headspace</i>
<i>HSE</i>	<i>Headspace</i> Estático
<i>HSD</i>	<i>Headspace</i> Dinâmico
Hz	hertz
IK	Índice de Retenção de Kovats
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>KNN</i>	<i>K-Nearest Neighbor</i>
<i>m</i>	multiplete
MHz	Mega Hertz

m/m	razão massa massa
m/v	razão massa volume
MIFAC	Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classes
MM	Massa Molar
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS	Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno
QMP	Quadrados Mínimos Parciais
RCP	Regressão por Componentes Principais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	singleto
<i>SPE</i>	<i>Solid Phase Extraction</i>
<i>SPME</i>	<i>Solid Phase MicroExtraction</i>
v/v	razão volume volume
Φ	diâmetro
δ	deslocamento químico em partes por milhão
δ_C	deslocamento químico de carbono
δ_H	deslocamento químico de hidrogênio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 01: ESTUDO QUÍMICO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Annona coriacea* Mart. E *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart (Annonaceae)

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS	1
1.1.1 - Hidrodestilação.....	5
1.1.2 - Microextração em Fase Sólida	6
1.2 - A FAMÍLIA ANNONACEAE	11
1.2.1 - <i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.	13
1.3 - QUIMIOMETRIA.....	15
1.3.1 - Análise de Componentes Principais (ACP)	16
1.3.2 - Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA)	17
1.4 - JUSTIFICATIVA.....	17
2 - OBJETIVOS	18
2.1 - OBJETIVO GERAL	18
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	19
3.1 - MATERIAIS UTILIZADOS	19
3.1.1 - Para <i>SPME</i>	19
3.1.2 - Padrões	19
3.1.3 - Solventes	19
3.1.4 - Equipamentos.....	19
3.2 - METODOLOGIA	20
3.2.1 - Procedimento de Amostragem <i>HS-SPME</i> para <i>A. coriacea</i>	20
3.2.1.1 - Extração dos COVs das flores <i>in vivo</i>	20
3.2.1.2 - Extração dos COVs das floras <i>in vitro</i>	21
3.2.2 - Condições Analíticas Usadas para Análise de <i>HS-SPME</i> das Flores e Folhas de <i>A. coriacea</i>	21
3.2.3 - Procedimento de Amostragem <i>HS-SPME</i> para <i>X. aromatica</i>	21
3.2.3.1 - Extração <i>in vivo</i> dos COVs das flores.....	21
3.2.3.2 - Extração <i>in vitro</i> dos COVs das flores.....	23

3.2.4 - Extração do Óleo Essencial de <i>X. aromatica</i> por Hidrodestilação	24
3.2.5 - Parâmetros Analíticos Usados para Análise de <i>HS-SPME</i> e Óleo Essencial das Flores de <i>X. aromatica</i>	24
3.2.6 - Identificação dos COVs	25
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS COVs DE <i>A. coriacea</i>	26
4.1.1 - <i>HS-SPME</i> das Flores (<i>in vivo</i>).....	26
4.1.2 - <i>HS-SPME</i> das Folhas (<i>in vitro</i>)	33
4.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DAS FLORES DE <i>X. aromatica</i>	40
4.2.1 - Extração <i>in vivo</i> dos COVs das Flores de <i>X. aromatica</i>	40
4.2.1.1 - Avaliação quimiométrica das quatro fibras empregadas no estudo do tempo de extração <i>in vivo</i>	41
4.2.1.2 - Seleção da fibra de <i>SPME</i>	43
4.2.1.3 - Avaliação quimiométrica entre seleção da fibra e tempo de extração	48
4.2.2 - Extração <i>in vitro</i> dos COVs das Flores de <i>X. aromatica</i>	51
4.2.2.1 - Temperatura de extração <i>in vitro</i> dos COVs.....	52
4.2.2.2 - Avaliação quimiométrica das fibras, temperatura de extração e tempo de extração no modo <i>in vitro</i>	52
4.2.3 - Comparação dos COVs Utilizando <i>HS-SPME</i> nos Modos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	56
4.2.4 - Obtenção e Caracterização Química do Óleo essencial de <i>X. aromatica</i>	62
5 - CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66

CAPÍTULO 02: ESTUDO QUÍMICO DO CAULE E DAS FOLHAS DE *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae)

1 - INTRODUÇÃO	74
1.1 - PRODUTOS NATURAIS	74
1.2 - O CERRADO	75
1.3 - A FAMÍLIA Annonaceae.....	77
1.4 - O GÊNERO <i>Annona</i>	77
1.4.1 - Acetogeninas	78
1.4.2 - Alcaloides.....	80

1.5 - <i>Annona coriacea</i> Mart.....	81
2 - OBJETIVO	90
2.1 - OBJETIVO GERAL	90
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	91
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	91
3.1 - MATERIAIS	91
3.1.1 - Fases Estacionárias.....	91
3.1.2 - Solventes	92
3.1.3 - Reveladores	92
3.1.4 - Equipamentos	92
3.2 - METODOLOGIA DO ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DO CAULE E DAS FOLHAS DE <i>A. coriacea</i>	93
3.2.1 - Coleta do Material Vegetal	93
3.2.2 - Obtenção dos Extratos.....	93
3.2.3 - Extração Líquido-Líquido de EEF e EEC.....	94
3.2.4 - Fracionamento Cromatográfico da Fração Acetato de Etila do Caule (FAC) de <i>A. coriacea</i>	95
3.2.5 - Fracionamento Cromatográfico da Fração Acetato de Etila das Folhas (FAF) de <i>A. coriacea</i>	96
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	100
4.1 - CONSTITUIENTES ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>A. coriacea</i>	100
4.2 - IDENTIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>A. coriacea</i>	100
4.2.1 - Identificação Estrutural da Substância 01	100
4.2.2 - Identificação Estrutural da Substância 02	109
5 - CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS	120

CAPÍTULO 01

ESTUDO QUÍMICO DOS COMPOSTOS
ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Annona*
coriacea Mart. E *Xylopia aromatica* (Lam.)
Mart. (Annonaceae)

RESUMO

CAPÍTULO 01: ESTUDO QUÍMICO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Annona coriacea* Mart. E *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart

(**Annonaceae**) - Nesta pesquisa realizou-se o estudo do perfil químico dos compostos orgânicos voláteis (COVs) das flores e folhas das espécies *Annona coriacea* e *Xylopia aromatica* (Annonaceae), por meio da extração *in vivo* e *in vitro*, através das técnicas de *headspace*-microextração em fase sólida (*HS-SPME*), hidrodestilação e caracterização via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Pela análise da fração volátil das flores e folhas de *A. coriacea* observou-se COVs diferentes, de acordo com os revestimentos usados, visto que a seleção da fibra se torna um dos principais fatores para a análise de COVs em partes vegetais diferentes. O perfil químico das flores de *X. aromatica* foi obtido via *HS-SPME*, em que se comparou a eficiência das extrações *in vivo* e *in vitro*, em função do maior número de COVs presentes no aroma floral. Uma vez que foram obtidos vários dados químicos, foi realizada a análise multivariada dos mesmos, a qual forneceu informações relevantes, contribuindo para a otimização de algumas condições, tais como seleção da fibra, tempo de extração e temperatura de extração que rendessem a caracterização do maior número de COVs. Neste contexto, as condições que apresentaram os resultados mais promissores foram: fibras de CAR/PDMS e PA, tempo de extração igual a 60 min e temperatura de extração de 29 °C. O óleo essencial das flores de *X. aromatica* foi obtido por hidrodestilação e caracterizado quimicamente por CG-EM. O composto majoritário presente foi a pentadecan-2-ona (16,38%). As técnicas de extração utilizadas foram úteis, entretanto houve variação quali e quantitativa dos COVs, o que é esperado devido ao processo de extração ser diferente. Assim, observou-se que dependendo do objetivo da pesquisa ou do que se procura na fração volátil, faz-se necessária a utilização da técnica que dê os resultados mais promissores para a investigação realizada ou de forma que se complementem. Desta maneira, o estudo de *A. coriacea* e *X. aromatica* contribuiu para o conhecimento do perfil químico dos COVs presentes nestas espécies, visto que a partir destas investigações os mesmos podem ser aplicados em várias áreas industriais, por exemplo cosmético, alimentos, dentre outros.

Palavras-chave: COVs; *Annona coriacea*; *Xylopia aromatica*; flores; extrações *in vivo* e *in vitro*; *HS-SPME*; Hidrodestilação; Quimiometria.

ABSTRACT

CHAPTER 01: CHEMICAL STUDY OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS

***Annona coriacea* Mart. AND *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart (Annonaceae)** - In this research was performed the study of the chemical profile of the volatile organic compounds (VOCs) of flowers and leaves of species *Annona coriacea* and *Xylopia aromatica* (Annonaceae) by means of extraction *in vivo* and *in vitro*, through the techniques headspace-solid phase microextraction (HS-SPME), hydrodistillation and characterization by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). By the analysis of the volatile fraction of flowers and leaves of *A. coriacea* it was observed different VOCs, according to the coatings utilized, since the selection of the fiber becomes one of the main factors for VOCs analysis in different vegetables parts. The chemical profile of the flowers of *X. aromatica* was obtained through HS-SPME, which compared the efficiency of *in vivo* and *in vitro* extractions, due to the higher number of VOCs present in the floral aroma. Once were obtained various chemical data, the multivariate analysis of the data was performed, which provided relevant information, contributing to the optimization of some conditions, such as selection of fiber, extraction time and extraction temperature yielded the characterization of the most number of VOCs. In this context, the conditions that presented the most promising results were: fibers CAR/PDMS and PA, extraction time equal the 60 min and extraction temperature of 29 °C. The essential oil of the flowers of *X. aromatica* was obtained by hydrodistillation and chemically characterized by GC-MS. The major compound present was the pentadecan-2-one (16.38%). The extraction techniques utilized were helpful, however there was qualitative and quantitative variation of VOCs, which is expected due to the extraction process be different. Thus, it is observed that depending on the objective of the survey or that searches for in the volatile fraction, it is necessary to use the technique to give the most promising results for the investigation held or in order to complement each other. In this way, the study of *A. coriacea* and *X. aromatica* contributed to the knowledge of the chemical profile of VOCs present in these species, seen from these investigations that the same can be applied in several industrial areas, for example cosmetic, food, among others.

Keywords: VOCs; *Annona coriacea*; *Xylopia aromatica*; flowers; extraction *in vivo* and *in vitro*; HS-SPME; Hydrodistillation; Chemometrics.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

As plantas em geral possuem capacidade em comunicar com outras espécies através da emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs), os quais são oriundos de vários órgãos como caules, flores, folhas, frutos, raízes e sementes. O interesse científico em analisar os COVs representa um significativo campo de pesquisa moderna, com interesse direto de diversos seguimentos industriais, como a indústria de alimentos, medicamentos, cosméticos, perfumaria, aromaterapia, pesticida, repelentes, produtos de uso doméstico, etc (ZHU et al., 2013).

Os COVs produzidos por plantas são responsáveis por várias interações entre as mesmas e outros organismos. A fragrância floral está diretamente envolvida na atração de polinizadores, além de orientá-los para os órgãos reprodutivos. O perfume de uma flor, juntamente com a sua cor, são considerados os principais sinais para atrair insetos, garantindo assim a polinização. Além disso, alguns COVs têm propriedades repelentes, ou seja, são produzidos e emitidos pela planta contra o ataque de herbívoros (DA SILVA et al., 1999).

Diversos COVs florais são agradáveis para o sistema sensorial humano, com potencial para emprego em componentes de perfumes. As fragrâncias florais naturais são geralmente usadas como ingredientes, sendo assim necessário o conhecimento específico destes componentes (LI, LEE, SHEN, 2006).

Além dos COVs exalados por plantas, ainda é possível obter os óleos essenciais, os quais geralmente são líquidos, voláteis, límpidos e formados por uma mistura de compostos, como monoterpenos/oides (acíclicos, monocíclicos e bicíclicos), sesquiterpenos/oides, derivados do fenilpropano, ésteres, cetonas, etc. (SOUZA, MELLO, LOPES, 2012), geralmente complexa, caracterizados por um forte odor (BAKKALI et al., 2008; BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009).

Alguns óleos essenciais apresentam propriedades medicinais, tais como: bactericida, fungicida, antimicrobiana, analgésica, sedativa, anti-inflamatória, espasmolítica e anestésica; são usados também na preservação de alimentos (BAKKALI et al., 2008; BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009). Na tabela 1.1 (p. 2-5) são descritos exemplos de substâncias isoladas de óleos essenciais amplamente usadas em diversas áreas (BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009).

TABELA 1.1 - COVs isolados a partir de várias fontes naturais

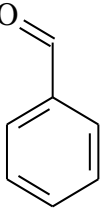
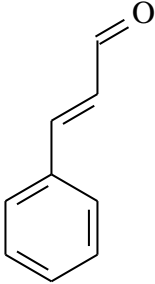
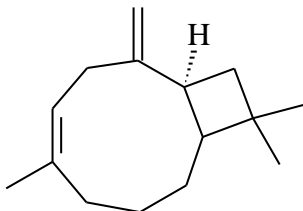
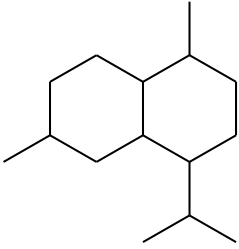
Espécie Vegetal	Composto	Aplicações	Referência
Louro (<i>Laurus nobilis</i> ; carobinha (<i>Memora nodosa</i>))	 <p>(1) benzaldeído</p>	cosméticos, alimentos, perfumaria e pesticida	JANG et al., 2014
Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	 <p>(2) cinamaldeído</p>	alimentos, cosméticos, medicamentos e perfumaria	ZHAO et al., 2014
Orégano (<i>Origamum vulgare</i> L.); cravo (<i>Eugenia caryophyllata</i> L.)	 <p>(3) cariofileno</p>	alimentos, medicamentos, cosméticos e perfumaria	SARPIETRO et al., 2015
Zimbro selvagem (<i>Juniperus oxycedrus</i>); ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>)	 <p>(4) cadineno</p>	perfumaria e cigarros	ÓLEOS ESSENCIAIS, 2015

TABELA 1.1 - COVs isolados a partir de várias fontes naturais

(continuação)

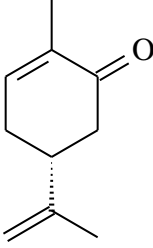
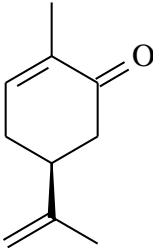
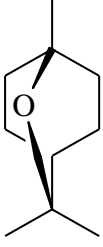
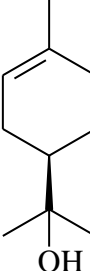
Espécie	Composto	Aplicações	Referência
Hortelã (<i>Mentha spicata</i> Var.); alcarávia (<i>Carum carvi</i> L.)	 (5) (R)-carvona	alimentos, medicamentos, cosméticos e perfumaria (R)-carvona têm efeito estimulante em ratos, enquanto (S)-carvona tem efeito relaxante	BUCHBAUER et al., 2005; SOUZA et al., 2013
	 (6) (S)-carvona		
Eucalipto (<i>Eucalyptus smithii</i>) marmeleiro prateado (<i>Croton argyrophyloides</i>)	 (7) (eucaliptol)	alimentos, medicamentos, cosméticos, perfumaria e aromaterapia	MITIĆ-ĆULAFIĆ et al., 2009
Pinho (<i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) Kuntze)	 (8) terpineol	medicamentos, cosméticos, perfumaria, repelentes e produtos de uso domésticos	BAPTISTELLA et al., 2009

TABELA 1.1 - COVs isolados a partir de várias fontes naturais

(continuação)

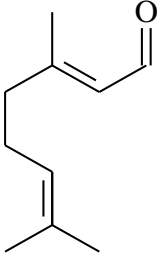
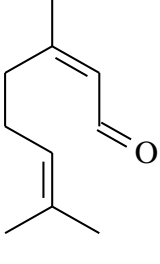
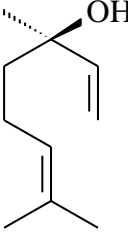
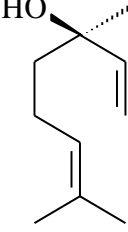
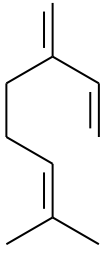
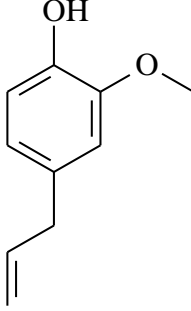
Espécie	Composto	Aplicações	Referência
<p>Capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)</p>	 <p>(9) geranial (<i>trans</i>-citral)</p>	<p>alimentos, perfumaria e repelentes</p>	<p>PARK, HONG, CHOI, 2015</p>
	 <p>(10) neral (<i>cis</i>-citral)</p>		
<p>Pau-rosa (<i>Aniba rosaeodora</i>)</p>	 <p>(11) (<i>R</i>)-linalol</p>	<p>medicamentos, cosméticos, perfumaria e produtos de uso doméstico</p>	<p>DA SILVA et al., 2003; MITIĆ-ĆULAFIĆ et al., 2009</p>
	 <p>(12) (<i>S</i>)-linalol</p>		

TABELA 1.1 - COVs isolados a partir de várias fontes naturais (conclusão)

Espécie	Composto	Aplicações	Referência
Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>); louro (<i>Laurus nobilis</i>); capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	 <p>(13) mirceno</p>	medicamentos, cosméticos e produtos de uso domésticos	MITIĆ-ĆULAFIĆ et al., 2009
Cravo (<i>Eugenia caryophyllata</i>); noz-moscada (<i>Myristica fragrans</i>)	 <p>(14) eugenol</p>	medicamentos, alimentos e perfumaria	ITO, MURAKAMI, YOSHINO, 2005

Para extração de constituintes voláteis, existe um grande número de métodos, tais como maceração com solvente, por *Soxhlet*, com fluido supercrítico (EFSC) e métodos de destilação, incluindo hidrodestilação (HD), destilação à vapor (DV) e destilação à vácuo (ZHU et al., 2013). Tais métodos são detalhados a seguir.

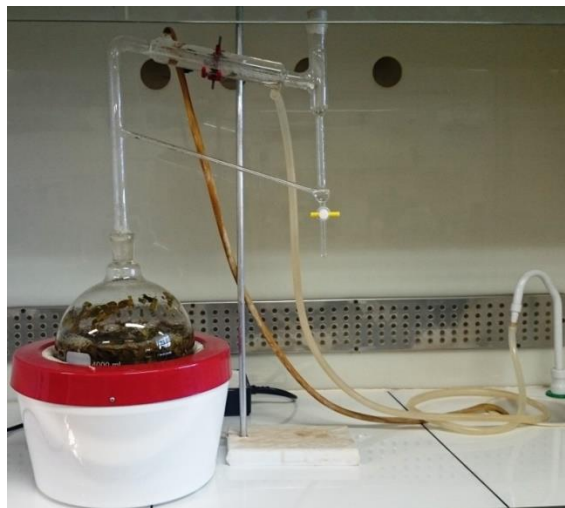
1.1.1 - Hidrodestilação

A hidrodestilação é um dos procedimentos de maior aplicação em escala laboratorial e industrial e está dividido em duas técnicas: arraste à vapor e coação (destilação repetida do mesmo líquido).

Um exemplo de aparelho usado na coação é o Clevenger (Figura 1.1, p. 6), cujo princípio de funcionamento se baseia na imersão da matriz a ser analisada em água na presença de calor, originando uma mistura entre vapor de água e compostos voláteis, os quais são conduzidos para o condensador onde ocorre uma troca térmica e

condensações dos vapores. Após este processo, a fração insolúvel em água se separa por densidade, obtendo-se o óleo essencial (AUGUSTO, LOPES, ZINI, 2003).

FIGURA 1.1 - Hidrodestilação via aparelho tipo Clevenger



Fonte: Elaborada pelo autor

Todavia, alguns métodos de extração podem resultar em grande perda de constituintes químicos durante o pré-tratamento da amostra, devido à sua alta volatilidade. Desse modo, a técnica de microextração em fase sólida, descrita a seguir, tem se tornado cada vez mais atrativa para extração rápida de COVs de plantas (ZHU et al., 2013).

1.1.2 - Microextração em Fase Sólida

A microextração em fase sólida (*SPME - solid phase microextraction*) foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Professor Pawliszyn, em 1990, para facilitar a rápida preparação de amostra, tanto em laboratório quanto no sistema onde se deseja investigar (PAWLISZYN, 2000; SPIETELUN et al., 2013; ZHU et al., 2013; LIU et al., 2014), por exemplo em uma extração de COVs *in vivo*, realizada no ambiente em que se encontra a amostra, seja ela planta ou órgão vivo (CÁCERES et al., 2015).

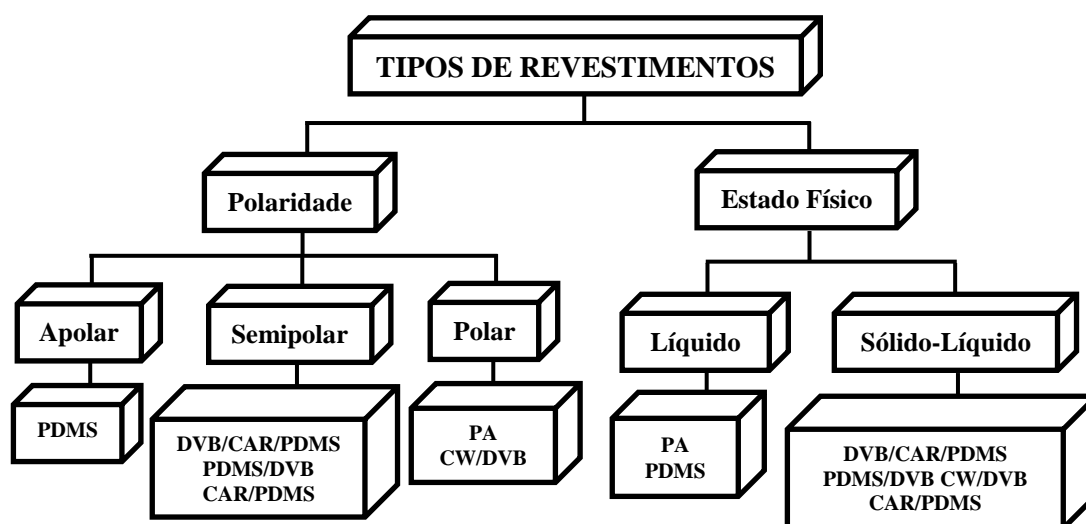
Por meio da *SPME* é empregada uma quantidade pequena de fase de extração, a qual é revestida sobre a superfície de uma fibra de sílica fundida, sendo exposta à matriz por um período de tempo definido. Além disso, combina simultaneamente os processos de amostragem, extração, concentração e limpeza, sendo,

portanto, considerada uma técnica simples, versátil, relativamente de baixo custo do equipamento, com tempo de extração pequeno, sensível e eliminação completa de solventes orgânicos (PAWLISZYN, 2000; SPIETELUN et al., 2013; ZHU et al., 2013; LIU et al., 2014).

As fibras para *SPME* devem ser adequadamente selecionadas para obter seletividade e sensibilidade (ZHU et al., 2013). Por esse motivo, durante as etapas de desenvolvimento de métodos analíticos são avaliadas diferentes fases poliméricas, em consequência, por vezes, do desconhecimento dos compostos-alvos.

Uma ampla variedade de revestimentos poliméricos está disponível para uso (Figura 1.2), sendo os mesmos líquidos puros (homogêneos) ou sólidos porosos (heterogêneos) dispersos em matrizes poliméricas líquidas. Em relação às fases poliméricas líquidas, como polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA), o mecanismo físico-químico responsável pela extração é a partição. Para os revestimentos sólidos porosos, como carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB), dentre outros, além de absorção, o processo também envolve adsorção dos analitos pelos revestimentos da fibra (AUGUSTO, VALENTE, 2002).

FIGURA 1.2 - Esquema representativo dos tipos de revestimentos poliméricos comerciais para *SPME*



Fonte: Modificado de DAMASCENO, 2007

Os revestimentos poliméricos são classificados em homogêneos ou heterogêneos, conforme sua polaridade: a) polares (PA e CW/DVB), b) apolares (PDMS) e c) semipolares (CAR/PDMS, PDMS/DVB - polidimetilsiloxano/divinilbenzeno) (PAWLISZYN, 1999).

A fibra DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano) de triplo revestimento tem polaridade média, e apresentou melhor desempenho em relação às fibras CW/DVB, CAR/PDMS e PDMS por extrair o maior número de compostos voláteis da polpa de seriguela (CEVA-ANTUNES et al., 2006), uma vez que fibras mistas têm dois ou três revestimentos com diferentes polaridades; portanto desempenham maior seletividade na extração de analitos com polaridades semelhante.

Devido à extensa variedade de revestimentos com polaridades distintas, é possível ganhar seletividade, maior diversidade de compostos e redução de interferentes da matriz de interesse (BICCHI, DRIGO, RUBIOLO, 2000).

Há uma diferença significativa no desempenho entre os revestimentos sólidos e líquidos, porém em ambos os casos, o processo de extração começa pela adsorção de analitos na superfície do mesmo, seguida pela difusão dos analitos para o seu interior (PAWLISZYN, 2000).

A migração dos analitos em direção à parte interna do revestimento ou a retenção dos mesmos na superfície do revestimento, depende da magnitude do coeficiente de difusão do analito nesse recobrimento. Caso o coeficiente de difusão dos analitos na fase de extração seja elevado, os analitos são totalmente particionados entre as duas fases, e a extração realizada é de absorção (PAWLISZYN, 2000). Contudo, se o coeficiente de difusão é baixo, os analitos permanecem na interface e o resultado da extração é a adsorção.

Grandes concentrações de analitos podem fazer com que a resposta não seja linear e também saturar as fases estacionárias adsorventes. Deste modo, a interação por absorção permite uma resposta mais promissora em termos de linearidade (quatro vezes superior se comparada com a interação por adsorção). Todavia, a interação por adsorção permite uma maior sensibilidade, seletividade, capacidade de analitos polares e voláteis (LORD, PAWLISZYN, 2000; PAWLISZYN, 2000).

Na fase estacionária adsorvente, os analitos extraídos da amostra são retidos no interior da mesma; logo a capacidade de absorver quantidade específica de analito depende particularmente do tamanho do analito e da espessura do filme. Em fase estacionária adsorvente, os analitos são retidos à superfície de uma estrutura cristalina

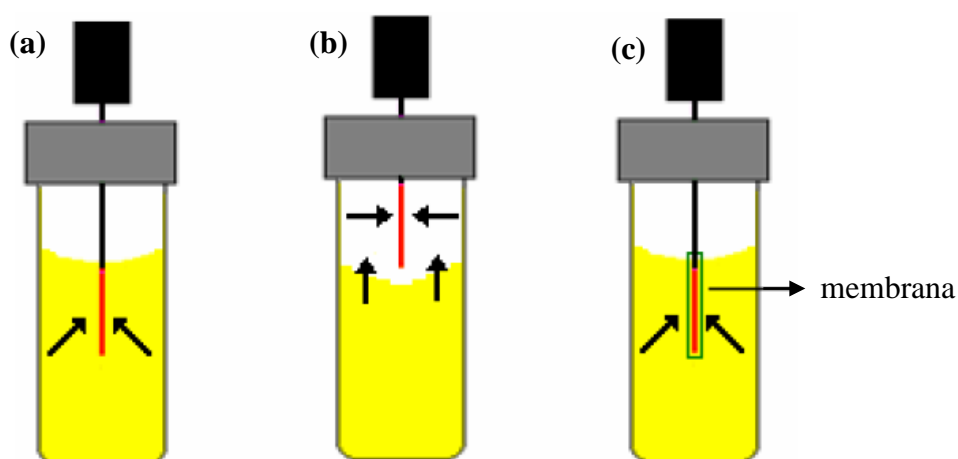
que pode apresentar poros de diferentes diâmetros. Em consequência disso, há um número mais limitado de locais de sorção em relação às absorventes, podendo acarretar competição entre os analitos (LORD, PAWLISZYN, 2000).

Existem três tipos de análise por *SPME*:

- i) extração direta;
- ii) extração no modo *headspace* (*HS*);
- iii) extração no modo indireto (proteção por membrana).

Na extração pelo modo direto (Figura 1.3a), a fibra revestida é inserida na amostra e os analitos são transportados diretamente da matriz de amostra para a fase de extração. No modo *HS* (Figura 1.3b), os analitos precisam ser transportados através da barreira de ar, antes de atingirem o revestimento; diante disso, o principal objetivo deste modo de extração é proteger o revestimento de interferentes não voláteis da matriz de amostra, além de danos causados por moléculas com alta massa molecular. No modo indireto de extração (Figura 1.3c), o revestimento polimérico é envolvido por uma membrana; assim, o revestimento não entra em contato com a matriz e ainda protege o filme polimérico de matrizes complexas. Entretanto, os analitos precisam se difundir através da membrana, o que dificulta a extração dos compostos e conseqüentemente maior tempo de exposição até o equilíbrio ser alcançado (LORD, PAWLISZYN, 2000; PAWLISZYN, 2000).

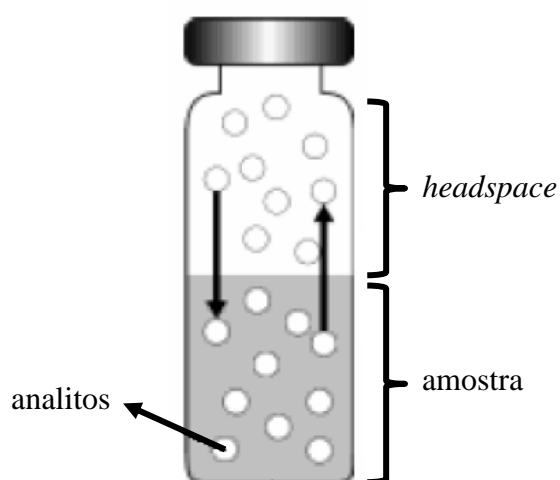
FIGURA 1.3 - Modos de extração utilizando fibras de *SPME*: (a) extração direta, (b) extração no modo *headspace* e (c) extração no modo indireto



Fonte: Modificado de JACQUES, 2012

O método de *HS* é utilizado de duas maneiras: estático ou dinâmico. A análise no modo *headspace* estático (*HSE*) (Figura 1.4) tornou-se a maneira mais simples de investigar os constituintes voláteis, em razão da amostra ser fechada em um recipiente até que o equilíbrio entre os analitos no *headspace* e a fase de extração seja atingida, sem qualquer tratamento prévio da amostra (AUGUSTO, LOPES, ZINI, 2003).

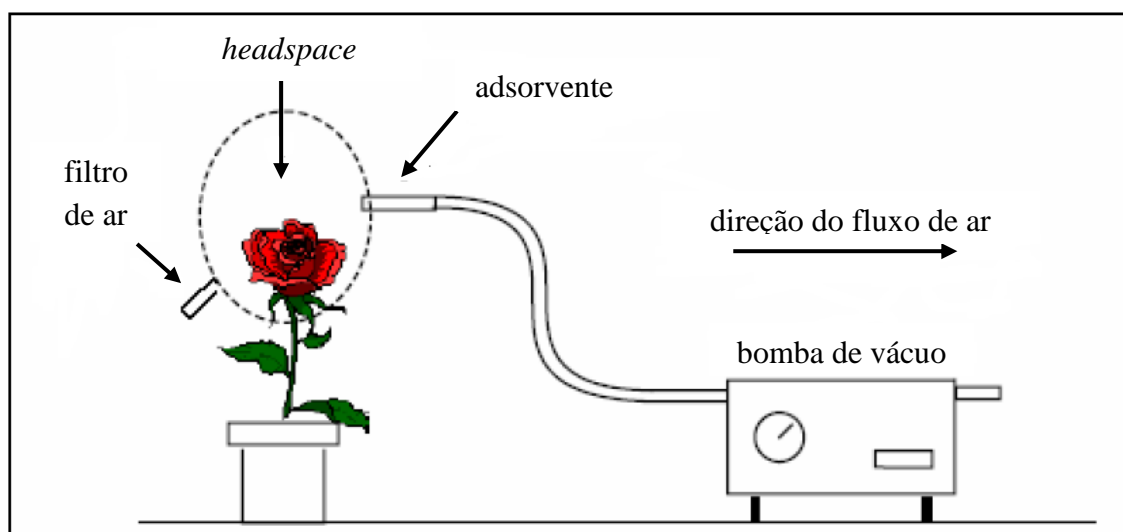
FIGURA 1.4 - Sistema utilizado para extração dos COVs no *HSE*



Fonte: Modificado de KUBOTA, 2007

No *headspace* dinâmico (*HSD*) (Figura 1.5, p. 11), as análises podem ocorrer tanto em laboratório quanto em campo, com a finalidade de extrair os COVs em condições dinâmicas. A parte da qual se deseja extrair os compostos voláteis precisa ser isolada do ambiente, ou seja, a matriz de amostra é enclausurada em um recipiente e posteriormente um fluxo controlado de ar purificado é passado através da mesma, transportando os constituintes voláteis para um tubo onde contém a fase adsorvente, a fim de um acúmulo dos voláteis para posterior análise. Há uma grande variedade de materiais adsorventes disponíveis no mercado, entretanto os mais utilizados são Porapak Q[®], Tenax GC[®], TenaxTA[®], carvão ativado e Carboxen[™] (AUGUSTO, LOPES, ZINI, 2003).

FIGURA 1.5 - Sistema utilizado para extração dos COVs no HSD



Fonte: Modificado de KUBOTA, 2007

1.2 - A FAMÍLIA ANNONACEAE

Um grande número de espécies da família Annonaceae é odorífera, devido à presença de óleos essenciais voláteis emitidos pelos tecidos florais (GOODRICH, 2012). Em grande parte, os constituintes desses óleos essenciais são terpenos (monoterpenos/oides e sesquiterpenos/oides), compostos aromáticos (FOURNIER, LEBOEUF, CAVÉ, 1999; JURGENS, WEBBER, GOTTSBERGER, 2000) ou ésteres de ácidos alifáticos (JIROVETZ, BUCHBAUER, NGASSOUM, 1998).

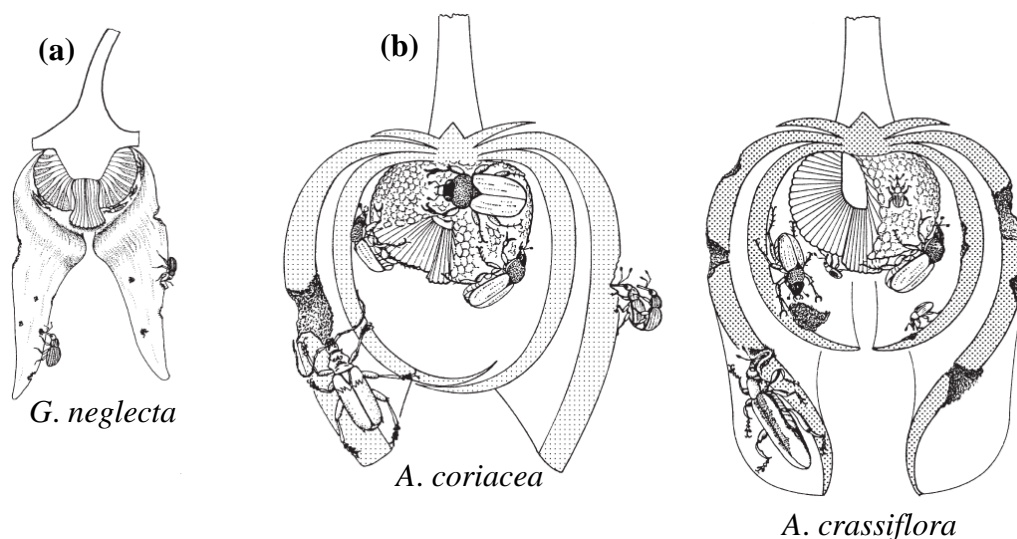
A família Annonaceae desperta interesse econômico em razão dos seus frutos comestíveis, espécies medicinais e fonte de matéria prima para a indústria de cosméticos e perfumaria (MAIA et al., 2005). Como exemplo, tem-se o óleo essencial das flores frescas de ylang-ylang [*Cananga odorata* (Lam.) Hook f. & Thomson], que significa “flor das flores”, que juntamente com jasmim, rosa e neroli, são extraídos e explorados em grande escala. O óleo de ylang-ylang é utilizado principalmente pela perfumaria (inclusive pela conceituada “Chanel”) e indústria de cosmético, desde o alto grau de perfume, tais como xampu, sabão, cremes, loções, a menor grau, na aromaterapia ou como ingredientes alimentares de sorvete e doces (BROKL et al., 2013).

Grande parte dos estudos sobre odores florais refere-se às interações planta-polinizador. No entanto, a mistura dos constituintes pode atuar com um sinal

para outros organismos no ambiente, por exemplo, contra herbívoros. Além disso, os voláteis podem representar subprodutos de vias biossintéticas ou fatores ambientais (GOODRICH, 2012). É importante saber a diferença ao se abordar as misturas complexas do aroma floral no meio ecológico, porque alguns compostos podem ser indicativos à polinizadores, enquanto outros podem ser de defesa da planta (RAGUSO, 2008).

O principal modo de polinização da família Annonaceae é por meio de besouros, em que as flores adaptaram-se a dois tipos de polinizadores: flores pequenas (câmara floral pequena) e delicadas, como das espécies *Xylopia aromatica* e *Guatteria neglecta*, visitadas e polinizadas por besouros pequenos (Figura 1.6a); espécies como *Annona coriacea* e *A. crassiflora*, com flores grandes (câmara floral grande) e robustas, que são visitadas e polinizadas por besouros grandes (Figura 1.6b). As câmaras florais desempenham um papel importante na polinização das flores, pois emitem os odores específicos a fim de atrair os besouros para o interior das mesmas. Após a entrada, os besouros estão a salvo de predadores, além de terem a oportunidade de acasalamento, comida (tecido da pétala e pólen) e sem contato com a luz do dia, já que a maioria deles tem hábito noturno (GOTTSBERGER, 1999).

FIGURA 1.6 - Flores de Annonaceae e adaptação ao besouro polinizador: (a) *G. neglecta* com polinizador pequeno (Nitidulidae), (b) *A. coriacea* e *A. crassiflora* com polinizador grande (Dynastinae)



Fonte: GOTTSBERGER, 1999

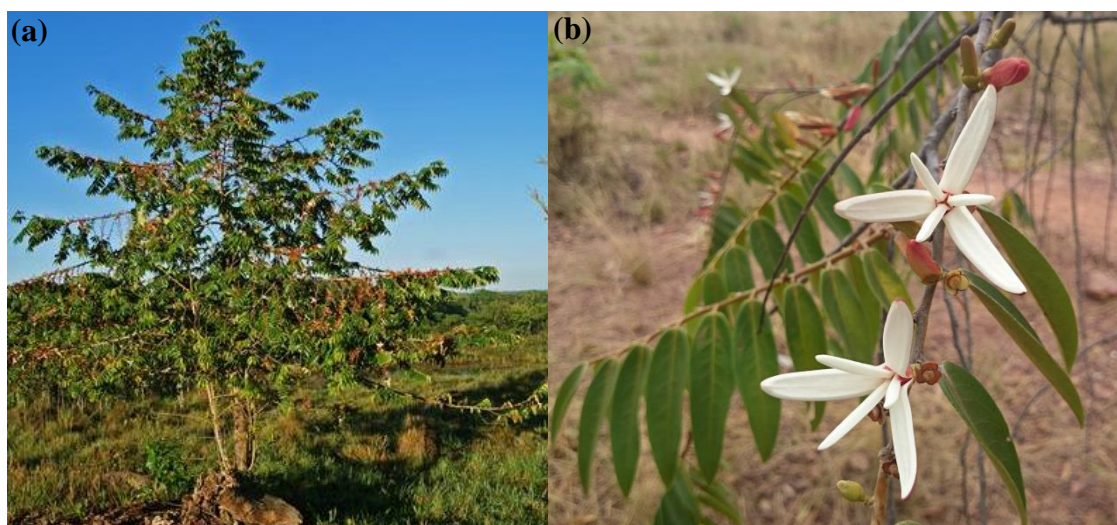
Em algumas espécies de Annonaceae, insetos pequenos, de corpo estreito como os tripses (ordem Thysanoptera) funcionam como polinizadores exclusivos ou adicionais, e há três casos bem relatados para as espécies *Bocageopsis multiflora* (Mart.), *Oxandra euneura* e *X. aromatica* (Lam.) Mart. No caso da *X. aromatica*, alguns nitidulídeos também estão envolvidos (GOTTSBERGER, 1999).

1.2.1 - *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.

O gênero *Xylopia* L. é um dos maiores da família Annonaceae, incluindo 160 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da América, África, Ásia e Oceania (HOCQUEMILLER, CAVÉ, RAHARISOLOLALAO, 1981).

A espécie *X. aromatica* (Lam.) Mart. (Figura 1.7a) (sinonímia: *X. grandiflora* A. St.-Hil, *Uvaria aromatica* Lam.) é uma árvore que pode atingir até 10 m de altura, conhecida popularmente como pimenta-de-macaco, embira, pindaíba ou pimenta-de-bugre (MAIA et al., 2005). As suas sementes são pretas, aromáticas e usadas como condimento; as flores (Figura 1.7b) são grandes, brancas, aromáticas, isoladas ou em pequenos grupos, e nascem diretamente sobre os ramos, próximos às axilas foliares (MARONI, DI STASI, MACHADO, 2006). As folhas são usadas na medicina popular para edema da pele em forma de banho (MACEDO, FERREIRA 2004).

FIGURA 1.7 - (a) Espécie e (b) flores de *X. aromatica*



Fonte: (a) TERRA DA GENTE, 2011; (b) Elaborada pelo autor

Alguns trabalhos, descritos na Tabela 1.2, relatam os constituintes voláteis de *X. aromatica* a partir de suas partes.

TABELA 1.2 - Compostos majoritários extraídos de diversas partes de *X. aromatica*

Parte Vegetal	Método de extração	Compostos	Referência
folha	destilação à vapor	α -cadineno, α -pineno, limoneno, β -cariofileno e α -humuleno	SILVA, ROCHA, 1981
fruto		limoneno, citronelol, β -pineno, α -pineno, carvona, ocimeno e mirceno	
casca		α -pineno, pinocarvona, <i>cis</i> -verbenol, verbenona, mirteal, mirteol, β -pineno, <i>cis</i> -carveol, <i>p</i> -cimeno e terpinen-4-ol	FOURNIER et al., 1994
folha	destilação à vapor	espatulenol, <i>p</i> -cimeno, β -cariofileno, limoneno, α -copaeno, α -pineno, <i>p</i> -cimen-8-ol e cuminaldeído	FOURNIER et al., 1994
	hidrodestilação	espatulenol	PINO et al., 2000
		α -pineno, limoneno, biciclogermacrene, β -pineno e espatulenol	LAGO et al., 2003
flor	<i>HSD</i>	2-feniletíl álcool, nerol, e indol	JURGENS, WEBBER, GOTTSBERGER, 2000

TABELA 1.2 - Compostos majoritários extraídos de diversas partes de *X. aromatica* (conclusão)

Parte Vegetal	Método de extração	Compostos	Referência
folha	hidrodestilação	biclogermacreno, espatulenol, limoneno, α - pineno e β -pineno	MAIA et al., 2005
		β -felandreno, β -mirceno e α -pineno	
fruto	<i>SPME</i>	β -felandreno, β -mirceno, <i>p</i> -menta-(1), 8-diento, α - felandreno e <i>p</i> -cimeno	STASHENKO, JARAMILLO, MARTÍNEZ, 2004
	<i>Purge e trap</i> *		
	destilação simultânea com solvente		
	fluido supercrítico		
	hidrodestilação assistida por micro- ondas		
folha	hidrodestilação	biclogemacreno espatulenol e limoneno	ANDRADE et al., 2004
fruto		limoneno, α -pineno, α - terpinol e β -pineno	
flor		<i>SPME</i>	

* Os COVs são concentrados em uma fase absorvente, seguido por dessorção térmica no CG.

1.3 - QUIMIOMETRIA

A Quimiometria é uma área da Química que utiliza ferramentas estatísticas e matemáticas para planejamento e otimização dos parâmetros experimentais, bem como para a extração de informações relevantes de dados químicos multivariados.

Ao contrário da análise univariada, em que se observa o comportamento de uma única variável por vez (exemplos: o tempo de extração, da força iônica do meio, da temperatura, dentre outros), na análise multivariada é possível lidar com mais de uma variável simultaneamente e assim identificar a existência ou não de correlações entre elas. Este tipo de abordagem permite um entendimento mais completo e sistematizado dos resultados analíticos (LAVINE, WORKMAN-JÚNIOR, 2004; KJELDAHL, BRO, 2010; PEREIRA FILHO, 2015).

Em termos gerais, a Quimiometria pode ser dividida em quatro subáreas que envolvem: a) a Análise Exploratória de Dados, formada pela Análise de Componentes Principais (ACP) (do inglês *PCA - Principal Component Analysis*) e Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA) (do inglês *HCA - Hierarchical Clusters Analysis*) como principais técnicas; b) a Calibração Multivariada, composta pela Regressão por Componentes Principais (RCP) (do inglês *PCR - Principal Component Regression*) e Quadrados Mínimos Parciais (QMP) (do inglês *PLS - Partial Least Squares*) como técnicas mais utilizadas; c) a Geração de Modelos de Classificação, contemplando o método do k-vizinho mais próximo (do inglês *KNN - K-Nearest Neighbor*), Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classes (MIFAC) (do inglês *SIMCA - Soft Independent Modelling of Class Analogy*) e a Análise Discriminante com calibração multivariada por Quadrados Mínimos Parciais (AD-QMP) (do inglês *PLS-DA - Partial Least Square Discriminant Analysis*); e d) o Planejamento Fatorial, utilizado na otimização das condições experimentais (PEREIRA FILHO, 2015).

1.3.1 - Análise de Componentes Principais (ACP)

A Análise de Componentes Principais tem como objetivo projetar o conjunto de dados em um número menor de variáveis chamadas de Componentes Principais (CP). Com este pequeno número de variáveis, este conjunto passa a ser representado por duas matrizes distintas e complementares: *scores* e *loadings*. O gráfico de *scores* fornece informações sobre as amostras, em que se observa a formação de aglomerados e amostras discrepantes. Através dos *loadings* (gráfico ou matriz) se identifica as variáveis mais importantes para a caracterização da amostra. Com estas duas informações, é possível fazer a seleção de variáveis, a fim de identificar as

características específicas para um determinado grupo de amostras (WOLD, ESBENSEN, GELADI, 1987; BRO, SMILDE, 2014).

1.3.2 - Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA)

O objetivo da Análise Hierárquica de Agrupamentos é exibir os dados em um gráfico bidimensional, de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. Os objetos (amostras ou variáveis) mais similares são agrupados em primeiro lugar, e esses grupos iniciais são mesclados de acordo com as suas semelhanças. A fusão de agrupamentos pode ser realizada considerando-se diferentes critérios de ligação, dentre os quais os mais utilizados são a ligação simples ou euclidiana (distância mínima ou vizinho mais próximo), a ligação completa (máximo de distância ou vizinho mais distante) e a ligação média (distância média).

A distância entre os objetos (amostras ou variáveis) indica a similaridade de suas propriedades; desta forma, quanto mais próximos estiverem os pontos no plano amostral, mais similares serão. Os resultados da AHA são apresentados na forma de um gráfico chamado dendograma (FERREIRA et al., 2002; MOHAMMADI et al., 2004).

1.4 - JUSTIFICATIVA

Diante do contexto supra relatado, o foco deste trabalho consistiu em caracterizar, pela primeira vez, os COVs das flores de *A. coriacea*, e identificar os constituintes das folhas via *HS-SPME* para comparação do perfil químico obtido por esta técnica com a de hidrodestilação relatada na literatura (SIQUEIRA et al., 2011).

Além disso, considerando que não há relato na literatura de caracterização no óleo essencial das flores de *X. aromatica*, realizou-se este estudo. Ressalta-se que no ano de 2004 os compostos voláteis do aroma floral de *X. aromatica* foram analisados, no modo *in vitro*, utilizando uma única fibra (CAR/PDMS) (ANDRADE et al., 2004). Por esse motivo, realizou-se a caracterização e comparação dos constituintes voláteis das flores utilizando quatro fibras diferentes nos modos de extração *in vivo* e *in vitro*. Agregou-se a este estudo a análise quimiométrica, buscando a maximização das respostas desta pesquisa, em termos da obtenção do maior número de compostos.

O interesse em investigar os COVs pode ser aliado à parte biológica, principalmente porque essas espécies têm polinizadores específicos, além da importância destes compostos em diversos seguimentos industriais, podendo ser aplicados em alimentos, cosméticos e na perfumaria, posto que tais áreas industriais tem um papel considerável.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral a caracterização química dos COVs das espécies *A. coriacea* e *X. aromatica*, as quais pertencem à família Annonaceae.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil químico da fração volátil das flores e folhas de *A. coriacea*, por *Headspace-Solid Phase MicroExtraction*/Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas (*HS-SPME/CG-EM*);
- Aplicar as ferramentas da Quimiometria para analisar a composição volátil das flores de *X. aromatica* nos modos de extração *in vivo* e *in vitro*;
- Caracterizar e comparar a composição volátil das flores de *X. aromatica* nos modos *in vivo* e *in vitro* por *HS-SPME/CG-EM*;
- Obter o óleo essencial das flores de *X. aromatica* através da técnica de hidrodestilação e identificar os constituintes químicos do mesmo via *CG-EM*.

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - MATERIAIS UTILIZADOS

3.1.1 - Para *SPME*

- Fibras PDMS (100 μm), PA (85 μm), CAR/PDMS (75 μm) e DVB/CAR/PDMS (50/30 μm) da marca Supelco[®] (Bellefonte, PA, USA);
- *Holder* (Suporte manual de fibra *SPME*) da marca Supelco[®] (Bellefonte, PA, USA);
- *Vial* para *HS* (20 mL) da marca Agilent;
- *Kit* de hidrocarbonetos alifáticos, com *n*-alcanos de C₈-C₃₀ (Supelco[®]), para identificação dos constituintes voláteis.

3.1.2 - Padrões:

- (*E*)-cariofileno ($\geq 98,5\%$); α -humuleno ($\geq 96\%$); pentadecan-2-ona ($\geq 98\%$); tridecan-2-ona (99%); *R*-limoneno (padrão analítico), da marca Sigma-Aldrich;
- diidro- β -ionona, cedida pela empresa Firmenich.

3.1.3 - Solventes

- Acetato de etila, acetona, diclorometano e hexano, grau P.A, das marcas Química Araguaya, Panreac e Synth[®];
- Hexano grau CLAE, das marcas Mallinckrodt e ChromAR[®].

3.1.4 - Equipamentos

- Balança analítica: OHAUS AR2140
- Estufa de secagem: Nova Ética 220 W.
- Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas: Agilent, modelo 7820 A - Series MSD 5975, equipado com coluna HP-5 MS da marca Agilent

(5% fenil - 95% metilpolissiloxano (30 m x 0,250 µm x 0,25 µm) e ionização por elétrons (70 eV).

3.2 - METODOLOGIA

3.2.1 - Procedimentos de Amostragem *HS-SPME* para *A. coriacea*

3.2.1.1 - Extração dos COVs das flores *in vivo*

Os COVs das flores de *A. coriacea* foram extraídos em agosto de 2013, por 12 h (18h00min à 06h00min), nas dependências da Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão (UFG/RC), município de Catalão - GO, utilizando fibras com recobrimentos PDMS, PA e CAR/PDMS, no modo *HSE* (Figura 3.1), sendo a extração realizada em três dias consecutivos, à temperatura ambiente. Em seguida, as fibras foram transportadas em tubos de ensaio tampados e mantidas a 7 °C até análise dos COVs no CG-EM.

Os dados e as coordenadas da coleta (GPS: S18°09'16.4"; W47°55'43.2") foram armazenados. Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Helder Nagai Consolaro (Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia - UFG/RC), o qual realizou a identificação do material vegetal e a catalogação do mesmo. Os espécimes testemunhos foram depositados no Laboratório Integrado de Zoologia, Ecologia e Botânica (LIZEB) na UFG/RC, sob o número 47919.

FIGURA 3.1 - Extração dos COVs das flores de *A. coriacea* utilizando a fibra PA



3.2.1.2 - Extração dos COVs das folhas *in vitro*

As folhas (1,0 g) de *A. coriacea* foram coletadas em julho de 2014 nas dependências da UFG/RC, conduzidas ao laboratório de Produtos Naturais desta instituição, cortadas e maceradas com o auxílio de um bastão de vidro em frascos de vidro e os mesmos foram selados, deixando-os em repouso por 10 min para equilíbrio. Em seguida, as fibras PDMS, PA e CAR/PDMS foram expostas ao *HSE* por duas horas (14h00min à 16h00min), sendo a extração realizada em três dias diferentes à temperatura ambiente. Posteriormente, as fibras foram recolhidas, colocadas em tubos de ensaio tampados e mantidas a 7 °C até análise dos COVs no CG-EM.

3.2.2 - Condições Analíticas Usadas para Análise de *HS-SPME* das Flores e Folhas de *A. coriacea*

Os COVs extraídos das flores e das folhas de *A. coriacea* foram dessorvidos no injetor a 250 °C no modo *splitless*, nas seguintes condições: 75 °C por 1 min - 35 °C/min até 100 °C por 5 min - 45 °C/min até 150 °C por 5 min - 55 °C/min até 200 °C por 15 min - 65 °C/min até 250 °C por 10 min - 50 °C/min até 270 °C por 10 min (tempo total de análise 50 min). O hélio foi usado como gás de arraste na vazão de 1 mL/min e no modo scan (45-450 u.m.a.). As temperaturas da interface, fonte de ionização e quadrupolo foram, respectivamente, 280, 230 e 150 °C.

3.2.3 - Procedimentos de Amostragem *HS-SPME* para *X. aromatica*

3.2.3.1 - Extração *in vivo* dos COVs das flores

As extrações *in vivo* dos COVs das flores de *X. aromatica* foram realizadas em outubro de 2014, nas dependências da fazenda Pé do Morro, de propriedade da UFG/RC, município de Catalão - GO. Os dados e as coordenadas da coleta (GPS: S18°06'29'' - 18°07'34'' e 47°59'33'' - 48°00'15'') foram armazenados. A identificação do material vegetal foi realizada em colaboração com a Profa. Me. Larissa Cavalheiro da Silva da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus Sinop*. Os espécimes de identificação foram depositados no herbário Centro-Norte-Matogrossense (CNMT) da mesma Universidade, sob o número 6554.

Os procedimentos para extração dos COVs de *X. aromatica* iniciaram-se às 09h00min, utilizando-se as fibras recobertas com PDMS, PA, CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS no modo *HSE* (Figura 3.2).

FIGURA 3.2 - Extração *in vivo* dos COVs das flores de *X. aromatica* utilizando os revestimentos: (i) PDMS, (ii) PA, (iii) CAR/PDMS e (iv) DVB/CAR/PDMS



Fonte: Elaborada pelo autor

O tempo de equilíbrio foi de 15 min e as extrações dos COVs e o branco, matriz isenta do composto de interesse (Figura 3.3), foram realizadas em 15, 30, 45, 60 e 120 min, ao longo de seis dias não consecutivos, em triplicata à temperatura média de 29 °C. Em seguida, as fibras foram transportadas da fazenda ao laboratório de Produtos Naturais da UFG/RC em tubos de ensaio tampados dentro de uma caixa térmica a 10,7 °C e depois mantidas a 7 °C até análise dos COVs no CG-EM.

FIGURA 3.3 - Realização do branco para as extrações *in vivo* utilizando os revestimentos: (i) PDMS, (ii) PA, (iii) CAR/PDMS e (iv) DVB/CAR/PDMS



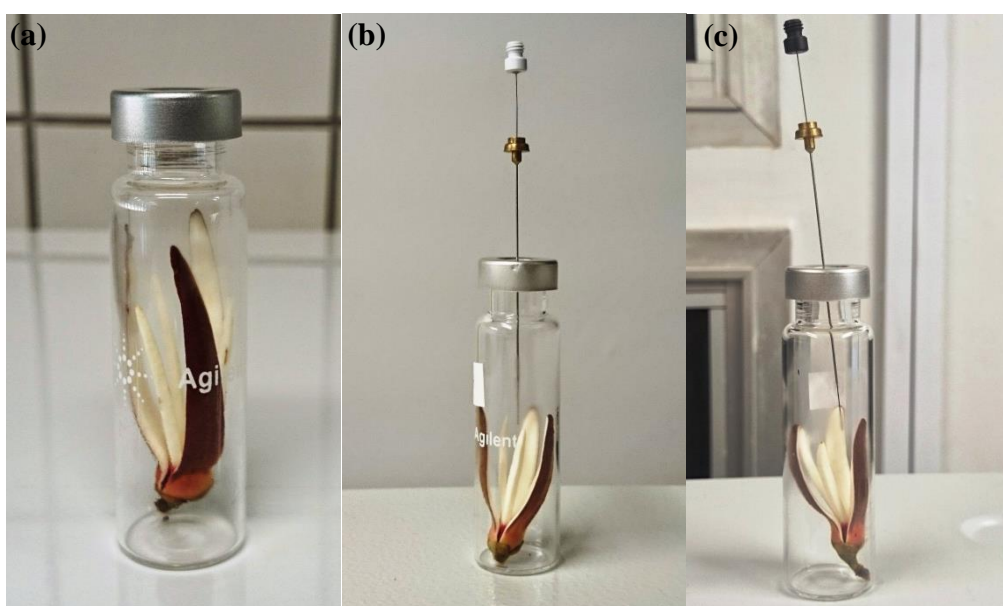
Fonte: Elaborada pelo autor

3.2.3.2 - Extração *in vitro* dos COVs das flores

As flores de *X. aromatica* foram coletadas entre dezembro de 2014 e janeiro de 2015, às 09h00min, nas dependências da fazenda Pé do Morro. Os procedimentos de extrações dos COVs ocorreram imediatamente após a chegada ao laboratório de Produtos Naturais da UFG/RC. Os parâmetros seleção da fibra e tempo de extração foram otimizados para tornar viável a comparação entre os dois modos de extração (*in vivo* e *in vitro*), a fim de obter as condições ideais em termos de número de compostos extraídos, de modo que houvesse a maior representatividade da fração volátil para ambos.

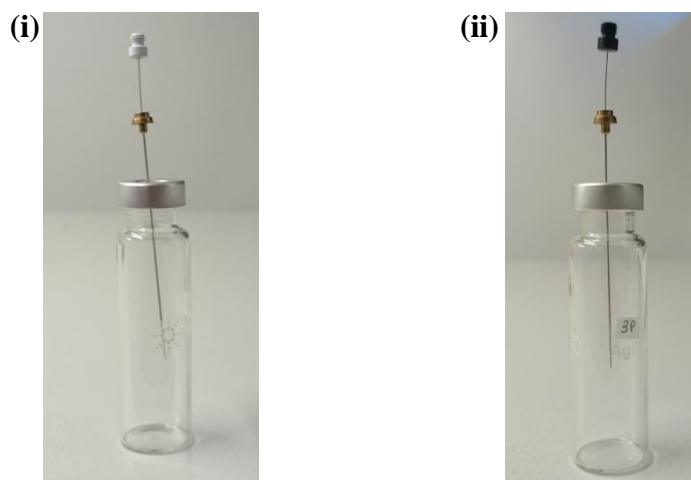
As flores de *X. aromatica* foram inseridas em *vials*, os quais foram lacrados (Figura 3.4a) e permaneceram por 15 min para estabelecimento do equilíbrio. Em seguida, as fibras PA (Figura 3.4b) e CAR/PDMS (Figura 3.4c) foram expostas ao HSE por 15 e 60 min nas temperaturas de 29 e 40 °C, sendo as extrações realizadas uma em cada dia não consecutivos e também ocorreu a realização do branco (Figura 3.5, p. 24). Para o controle destas temperaturas, os *vials* foram inseridos em uma estufa de circulação de ar. Posteriormente, as fibras foram recolhidas, colocadas em tubos de ensaio tampados e mantidas a aproximadamente 7 °C até análise dos COVs no CG-EM.

FIGURA 3.4 - (a) Flor lacrada no *vial* de HS-SPME, (b) exposição da fibra PA e (c) CAR/PDMS



Fonte: Elaborada pelo autor

FIGURA 3.5 - Realização do branco para as extrações *in vitro* utilizando os revestimentos: (i) PA e (ii) CAR/PDMS



Fonte: Elaborada pelo autor

3.2.4 - Extração do Óleo Essencial de *X. aromatica* por Hidrodestilação

As flores frescas (221 g) de *X. aromatica* foram coletadas nas dependências da fazenda Pé do Morro. Posteriormente, cortadas em partes pequenas e submetidas à hidrodestilação durante 4 h, utilizando um aparelho do tipo Clevenger. Em seguida, foi realizada a extração líquido-líquido do hidrolato com diclorometano (30 mL), repetindo-se o processo por três vezes, empregando-se sulfato de sódio anidro para remoção da água. O óleo essencial foi armazenado no *freezer* até análise via CG-EM do mesmo.

Todo o material vegetal utilizado neste trabalho está sob autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético, sob o número 010698/2013-2.

3.2.5 - Parâmetros Analíticos Usados para a Análise por *HS-SPME* e do Óleo Essencial das Flores de *X. aromatica*

Para análise dos constituintes químicos, a programação da temperatura do forno foi: 60 °C, por 2 min, variação de temperatura de 4 °C/min até 250 °C, 250 °C por 10,5 min com tempo total de análise 60 min. O hélio foi usado como gás arraste na vazão de 1 mL/min e no modo *scan* (45-450 u.m.a.). As temperaturas do injetor,

interface, fonte de ionização e quadrupolo foram, respectivamente, 250, 280, 230 e 150 °C. Para a análise de *HS-SPME*, os COVs foram dessorvidos no injetor a 250 °C no modo *splitless*; no entanto, a análise do óleo essencial foi no modo *split* (razão 1:10) e volume de injeção de 1 µL.

3.2.6 - Identificação dos COVs

Os COVs foram identificados através de índice de retenção de Kovats (IK), comparação dos seus respectivos espectros de massas com os da biblioteca *NIST EPA/NIH* disponível no equipamento, com dados da literatura (ADAMS, 2007) e padrões comerciais.

O IK foi calculado por meio da relação dos tempos de retenção (t_R) de uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₃₀), submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica das amostras.

Para o cálculo do índice de retenção utilizou-se a seguinte fórmula (ADAMS, 2007):

$$IK = 100n + 100 \frac{[\log t_R(x) - \log t_R(P_z)]}{[\log t_R(P_{z+1}) - \log t_R(P_z)]}$$

Onde:

n = número de átomos de carbono que antecede o composto x (série dos *n*-alcanos).

$t_R(x)$ = tempo de retenção do composto x.

$t_R(P_z)$ = tempo de retenção anterior ao composto x (série dos *n*-alcanos).

$t_R(P_{z+1})$ = tempo de retenção posterior ao composto x (série dos *n*-alcanos).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS COVs DE *A. coriacea*

4.1.1 - *HS-SPME* das Flores (*in vivo*)

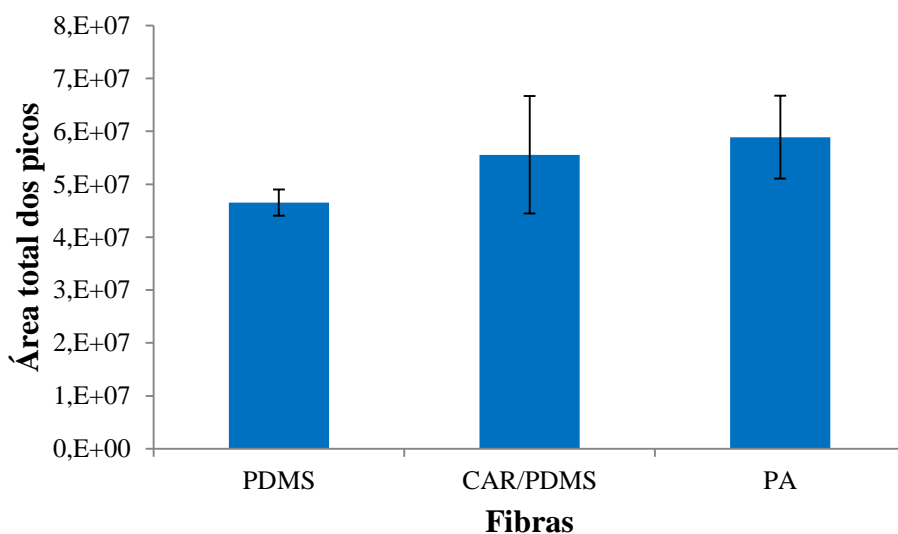
Neste estudo realizou-se a análise do perfil químico das flores de *A. coriacea*, em que a seleção da fibra foi uma variável importante para a obtenção e caracterização do maior número de constituintes voláteis.

Segundo a investigação feita por BICCHI e colaboradores (2000), a seleção de um revestimento depende dos compostos-alvos a serem analisados, em que observaram que dentre as fibras PDMS, CW/DVB, CAR/PDMS, PA, PDMS e DVB/CAR/PDMS utilizadas, os resultados mais expressivos, via *HS-SPME*, foram obtidos para o revestimento líquido (homogêneo), ou seja, PDMS para os compostos menos polares, e o revestimento poroso (heterogêneo), neste caso DVB ou CAR (ou ambos), para constituintes mais polares.

Sabe-se que a extração de compostos voláteis por meio de *HS-SPME* é fortemente influenciada pela polaridade, volatilidade e estado físico da matriz vegetal investigada (BICCHI, DRIGO, RUBIOLO, 2000). Portanto, em consequência disso às fibras PDMS (apolar), CAR/PDMS (semi-polar) e PA (polar) foram usadas neste estudo com o objetivo de identificar as diferentes classes de compostos voláteis.

Analisando a área total do Gráfico 4.1 (p. 27), do perfil químico dos COVs das flores de *A. coriacea*, onde a fibra PA apresentou uma maior capacidade de retenção (área total dos picos), em razão da maior absorção dos constituintes voláteis. Este fato pode ser justificado ao considerar que a extração é baseada no princípio das forças intermoleculares, ou seja, os componentes do aroma floral possuem maior afinidade pela fibra PA (polar), e conseqüentemente apresentaram maiores interações entre constituintes e revestimento. Além disso, revestimentos líquidos têm maior eficiência quando há concentração elevada de COVs, pois a extração ocorre efetivamente por partição, isto é, não há competição entre os COVs nos poros dos revestimentos sólidos. No entanto, para a fase líquida PDMS (apolar) ocorreu o contrário, visto que os COVs apresentaram menor afinidade por este revestimento.

GRÁFICO 4.1 - Efeito do revestimento das fibras de *HS-SPME* dos COVs das flores de *A. coriacea*



Conforme a Tabela 4.1, p. 28, um total 8, 6 e 5 compostos voláteis foram identificados para PA, PDMS e CAR/PDMS, respectivamente, sendo que os constituintes analisados e identificados nos brancos foram descontados na identificação dos COVs do aroma floral desta espécie. A partir das áreas totais dos picos e da identificação dos constituintes voláteis pôde-se observar que a fibra PA foi mais eficiente para caracterizar a fração volátil das flores de *A. coriacea*, porque este revestimento conseguiu extrair o maior número de compostos, de modo que houvesse a maior representatividade da fração volátil.

TABELA 4.1 - Identificação dos COVs do aroma floral da espécie *A. coriacea* usando os revestimentos PA, PDMS e CAR/PDMS

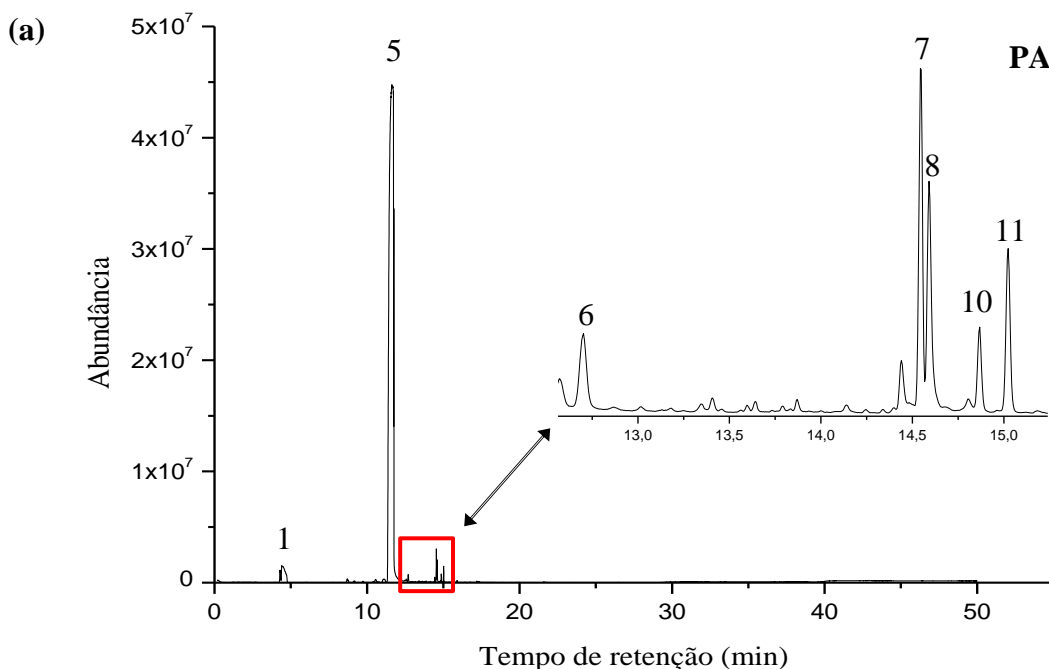
n ^o	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras			Identificação			
			PA	PDMS	CAR/PDMS	IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão ⁵
1	4,46	5-etil-metiltiazol	x	x	x	1021	*	x	*
2	8,71	ionona	x	-	-	1236	*	x	*
3	10,57	isovalerato de benzila	x	-	-	1252	*	x	*
4	11,06	n.i.	x	-	x	1418	*	*	*
5	11,66	diidro-β-ionona	x	x	x	1435	1436	x	x
6	12,70	tiglato de benzila	x	-	-	1465	*	x	*
7	14,56	(Z)- jasmonato de metila	x	x	x	1626	*	x	*
8	14,59	diidrodeidro-β-ionona	x	x	x	1628	*	x	*
9	14,80	n.i.	-	x	-	1638	*	*	*
10	14,87	n.i.	x	x	-	1641	*	*	*
11	15,02	3-oxo-7,8-diidro-β-ionol	x	x	x	1648	*	x	*
12	15,91	benzoato de benzila	-	x	-	1688	*	x	*
Total de compostos identificados por fibras			8	6	5				

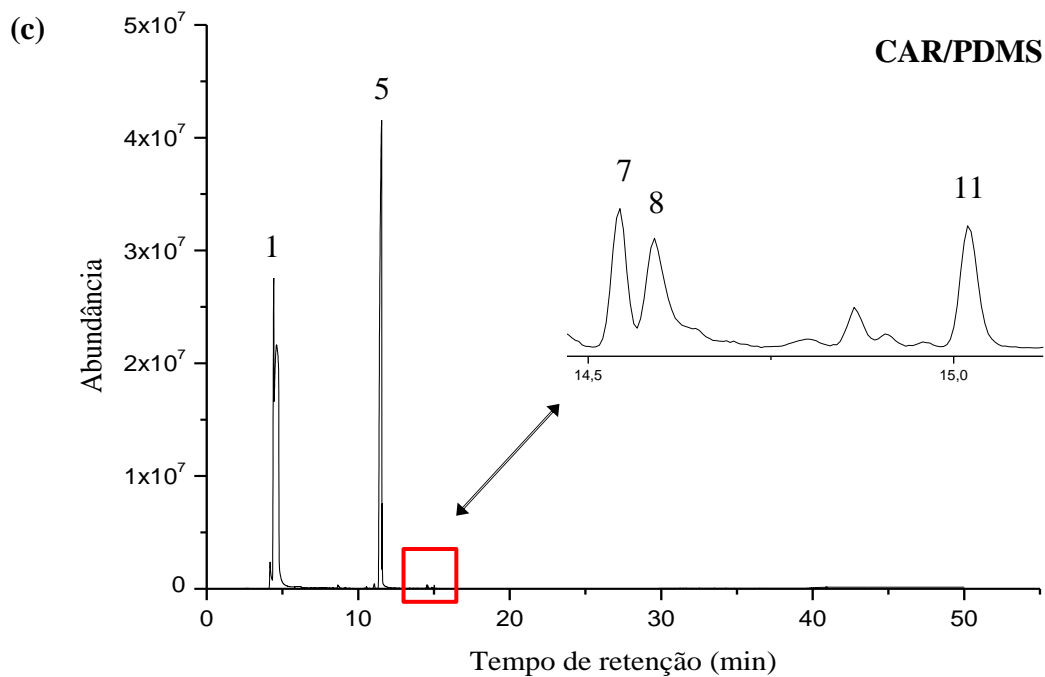
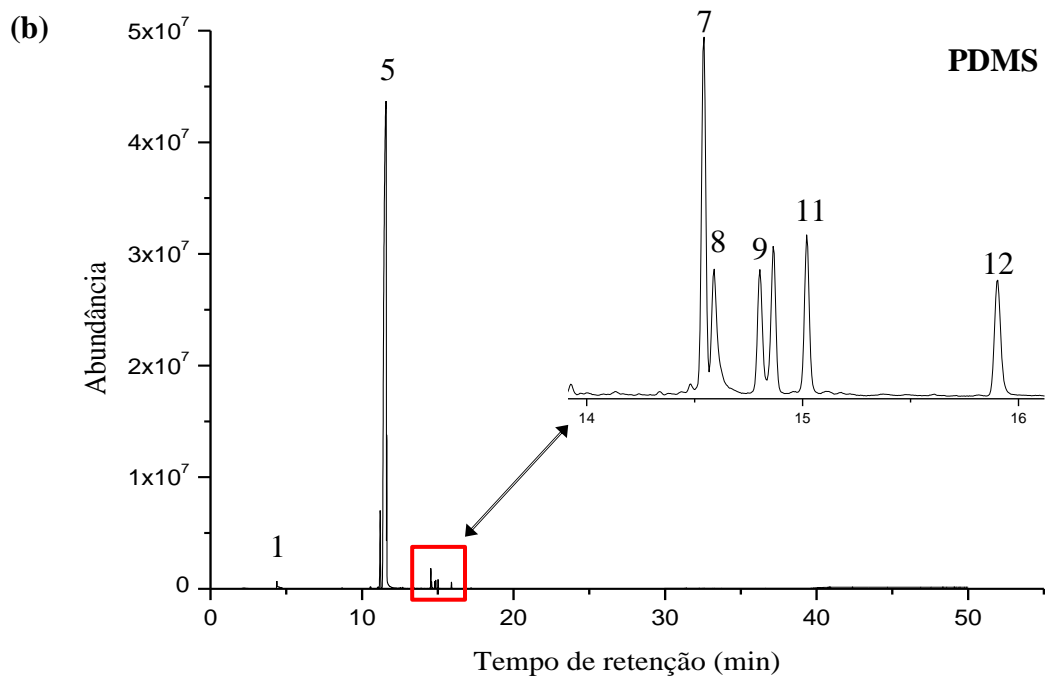
(x) detectado/identificado; (-) não detectado; (n.i./*) não identificado; ¹ tempo de retenção (min); ² Índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série dos *n*-alcanos; ³ Índice de Kovats da literatura (ADAMS, 2007); ⁴ Espectrometria de massa (biblioteca *NIST EPA/NIH* disponível no equipamento); ⁵ Padrão cedido pela Firmenich.

Em relação ao comportamento da extração dos COVs que compõem o perfil químico do aroma floral via *HS-SPME*, outra abordagem pode ser analisada considerando que alguns compostos mostraram seletividade e sensibilidade para determinados revestimentos, devido às suas interações com a fase de recobrimento. Esse evento pode ser verificado nas Figuras 4.1a, b e c. O composto (1), por exemplo, apresentou maior adsorção para a fibra CAR/PDMS, em termos de área ($2,15 \times 10^7$), enquanto que para as fibras PA e PDMS foram de $1,43 \times 10^6$ e $7,69 \times 10^5$, respectivamente. Ou seja, a abundância do mesmo se comportou de forma desigual; logo, este composto mostrou-se mais sensível e seletivo para o primeiro revestimento.

Além disso, é possível observar no gráfico 4.1b a seletividade dos compostos (9) e (12), os quais foram detectados apenas na fibra PDMS. Portanto, ao realizar a análise de constituintes voláteis é de extrema importância considerar o efeito do revestimento para identificar o maior número de compostos e caracterizar a fração volátil com o mínimo de perda.

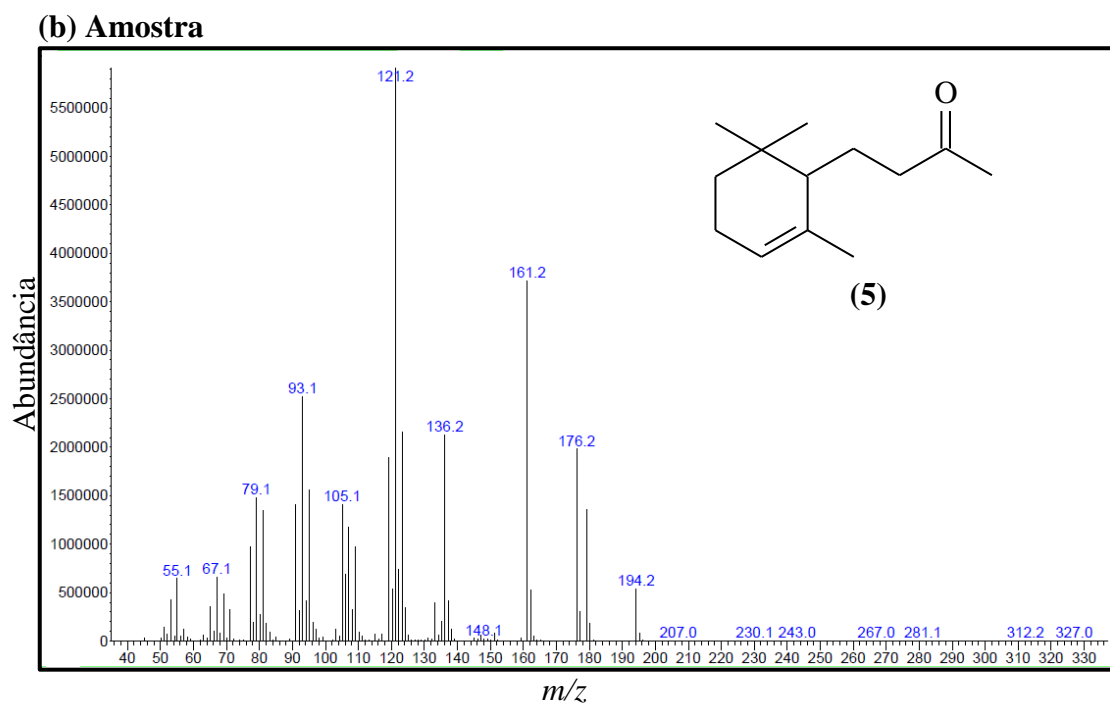
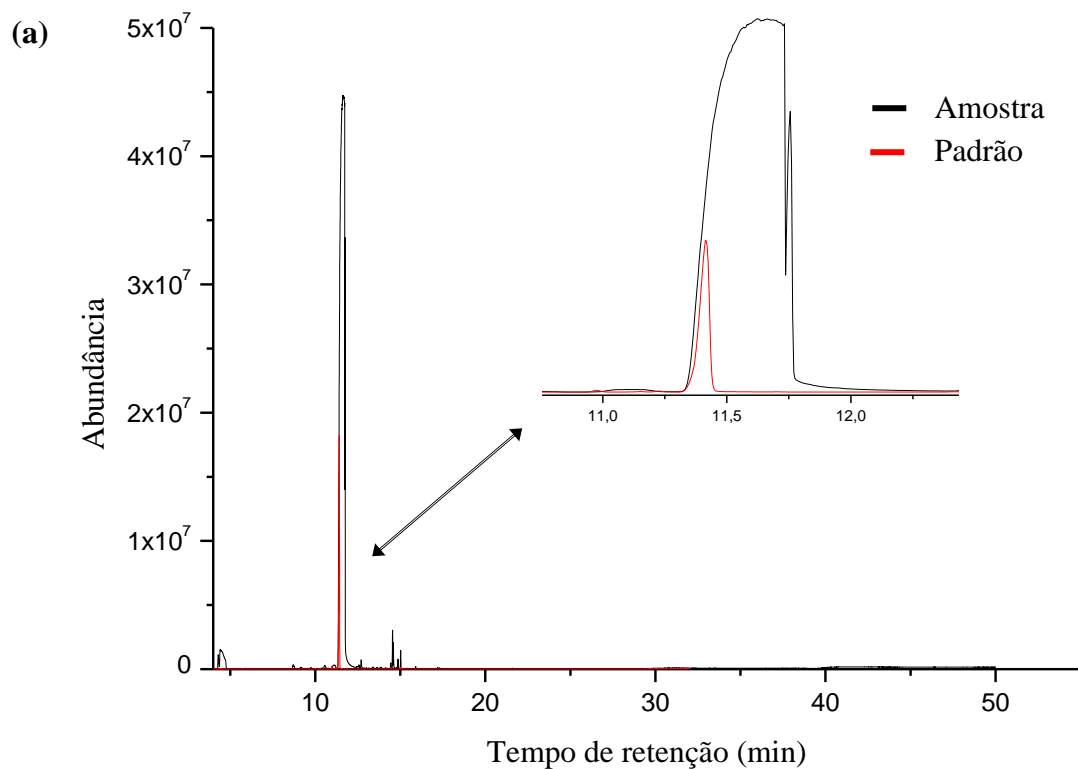
FIGURA 4.1 - Cromatogramas de íons totais (CIT) obtidos após análise de *HS-SPME* do aroma floral de *A. coriacea* com as fibras (a) PA, (b) PDMS e (c) CAR/PDMS



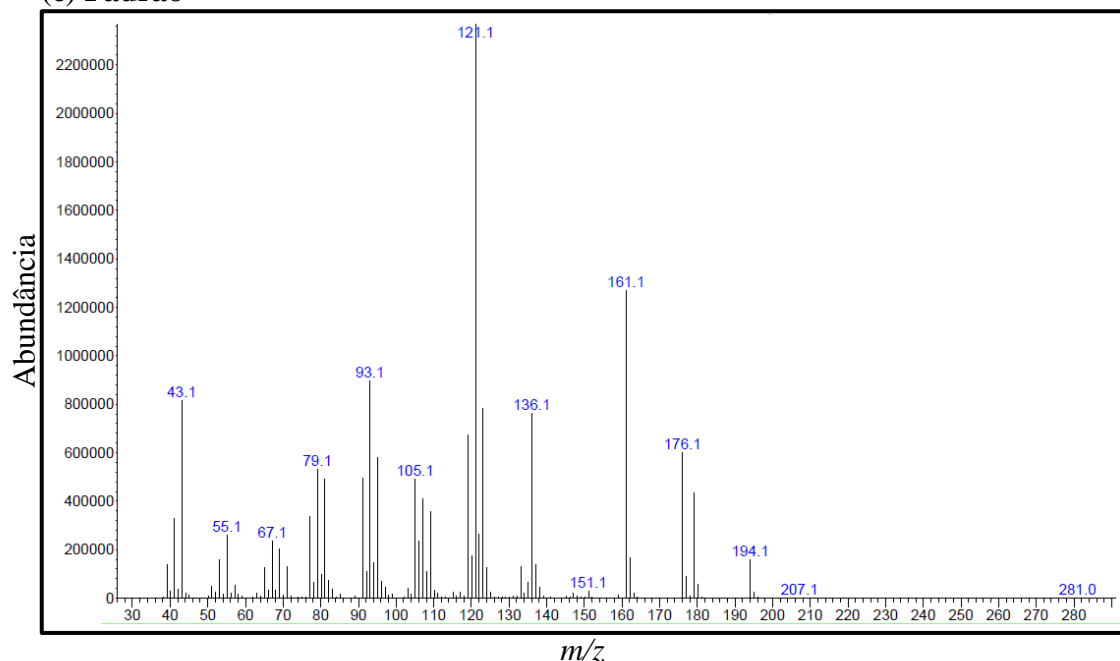


A diidro- β -ionona (**5**) foi a substância majoritária (Figura 4.1, 29) presente no aroma floral de *A. coriacea*, independente do tipo de fibra utilizada. A identificação deste composto foi realizada usando o padrão cedido pela empresa Firmenich (Figura 4.2, p. 31-32).

FIGURA 4.2 - (a) CIT obtido após análise de *HS-SPME* da fibra PA e padrão da diidro- β -ionona; (b) espectro de massas do composto (5) e (c) padrão da diidro- β -ionona



(c) Padrão



Segundo BELSITO et al. (2007), as iononas possuem amplas aplicações, como em ingredientes para fragrâncias, as quais podem ser encontradas em perfumes finos, cosméticos (xampus, sabonetes, creme facial, loção corporal e antitranspirante) e outros produtos de higiene pessoal, bem como em produtos não-cosméticos, por exemplo, produtos de limpeza (detergentes). Estes compostos também foram avaliados e aprovados para uso como ingredientes de sabor nos alimentos. No estatuto do Conselho Europeu, a diidro- β -ionona está listada como uma substância para o uso em produtos alimentícios.

A forte fragrância exalada pelas flores de *A. coriacea* atrai os besouros escaravelhos Dynastinae (principalmente os *Cyclocephala*) para o interior da flor, em busca de abrigo, alimento e oportunidade de acasalamento (Figura 4.3, p. 33). Essa interação planta-polinizador é primordial para o equilíbrio das espécies, já que os besouros carregam o pólen através do seu corpo e ao visitar outra flor polinizam a mesma (GOTTSBERBER, 1989).

Possivelmente, a diidro- β -ionona por ser o principal constituinte do odor floral pode estar relacionada à atração de besouros, principalmente da família Dynastinae, ou o conjunto de todos os compostos detectados, mas para afirmar tal ocorrência é necessário um estudo específico entre inseto e aroma floral.

FIGURA 4.3 - Flor de *A. coriacea* e besouros da família Dynastinae

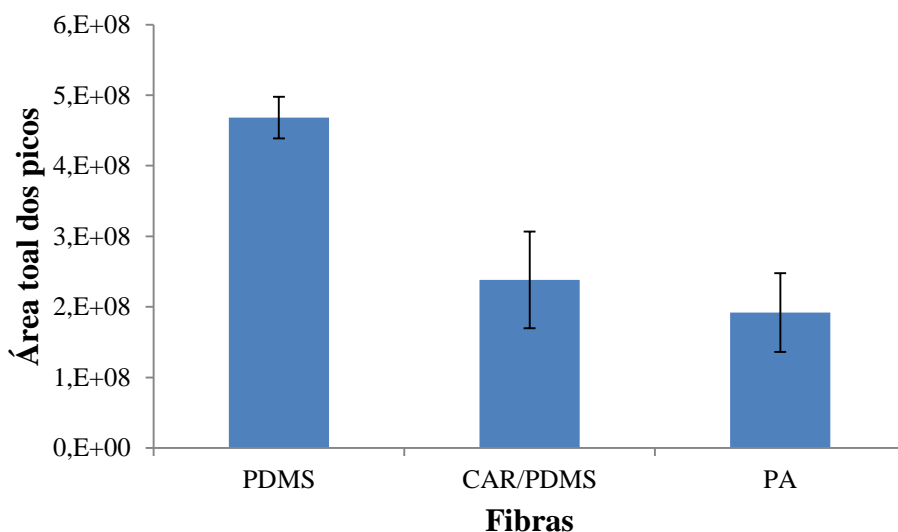


Fonte: IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012

4.1.2 - *HS-SPME* das Folhas (*in vitro*)

A investigação de cada matriz (água, animal, folha, flor, etc.) precisa ser analisada de forma individual, em razão de apresentar resultados diferentes diante dos compostos-alvos. Ao comparar o Gráfico 4.2 (p. 34) que versa sobre a somatória das áreas totais dos compostos extraídos das folhas com o Gráfico 4.1 (p. 27) referente à somatória das áreas totais dos picos das flores, observou-se um comportamento diferente entre os revestimentos. Assim, a seleção da fibra se torna um dos principais fatores para a análise de COVs em partes vegetais diferentes ou até mesmo de outros materiais.

GRÁFICO 4.2 - Efeito do revestimento das fibras de *HS-SPME* dos COVs das folhas de *A. coriacea*



A caracterização dos constituintes extraídos das folhas de *A. coriacea* foi realizada pela subtração de compostos detectados no branco. Portanto, foram identificados 29, 30 e 22 compostos (Tabela 4.2, p. 35-37) a partir das fibras PDMS, CAR/PDMS e PA, respectivamente.

Por meio das fibras PDMS e CAR/PDMS foram possíveis extrair o maior número de compostos, com maior capacidade retenção (Gráfico 4.2). Tal fato pode ser justificado pelas características químicas dos COVs, uma vez que a maioria pertence à classe dos sesquiterpenos, os quais apresentaram afinidade por ambas as fibras (apolar e semi-polar). Contudo, entre as fibras PDMS e CAR/PDMS a eficiência em termos de número de compostos identificados foi semelhante, visto que ambas as fases poliméricas são compostas por polidimetilsiloxano.

TABELA 4.2 - Identificação dos COVs das folhas de *A. coriacea* usando os revestimentos: PA, PDMS e CAR/PDMS

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras			Identificação			
			PA	PDMS	CAR/PDMS	IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
1	2,19	hexanal	-	-	x	*	*	x	*
2	2,51	3-(Z)-hexenol	x	-	x	825	*	x	*
3	2,57	3-metil-pent-4-en-1-ol	x	-	x	829	*	x	*
4	4,38	R-limoneno	-	-	x	1020	1029	x	x
5	9,54	elixeno	x	x	-	1269	*	x	*
6	9,70	δ-elemeno	x	x	x	1275	*	x	*
7	9,82	α-ylangeno	-	x	x	1279	*	x	*
8	10,14	isoledeno	-	x	x	1289	*	x	*
9	10,21	ciclosativeno	-	-	x	1292	*	x	*
10	10,29	α-copaeno	x	x	x	1294	*	x	*
11	10,44	β-bourboneno	-	x	x	1299	*	x	*
12	10,52	β-elemeno	x	x	-	1402	*	x	*
13	10,65	longifoleno	-	x	x	1406	1407	x	*
14	10,92	α-gurjuneno	x	x	x	1415	1409	x	*
15	11,08	(E)-cariofileno	x	x	x	1420	1419	x	x
16	11,13	n.i.	-	x	-	1421	*	*	*
17	11,25	β-copaeno	x	x	x	1425	1432	x	*

TABELA 4.2 - Identificação dos COVs das folhas de *A. coriacea* usando os revestimentos: PA, PDMS e CAR/PDMS (continuação)

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras			Identificação			
			PA	PDMS	CAR/PDMS	IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
18	11,38	selina-3,7(11)-dieno	x	x	x	1430	*	x	*
19	11,47	aromadendreno	-	x	x	1432	1441	x	*
20	11,56	γ-muuroleno	x	x	-	1434	*	x	*
21	11,77	α-humuleno	x	x	x	1441	*	x	x
22	11,93	aloaromadendreno	x	x	x	1445	*	x	*
23	12,20	<i>cis</i> -cadina-1(6),4-dieno	x	-	x	1453	1463	x	*
24	12,34	germacreno D	x	-	x	1457	*	x	*
25	12,42	β-cubebeno	-	x	-	1459	*	x	*
26	12,56	longifoleno	-	x	x	1463	*	x	*
27	12,76	γ-elemeneno	x	x	x	1468	*	x	*
28	13,05	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	x	x	x	1476	1476	x	*
29	13,20	δ-cadineno	x	x	x	1480	*	x	*
30	13,34	<i>cis</i> -cadina-1,4-dieno	-	x	x	1484	*	x	*
31	13,41	α-amorfeno	-	x	x	1486	1484	x	*
32	13,49	α-calacoreno	-	-	x	1488	*	x	*
33	13,71	α-selineno	-	x	x	1494	1498	x	*
34	13,79	palustrol	x	x	-	1496	*	x	*

TABELA 4.2 - Identificação dos COVs das folhas de *A. coriacea* usando os revestimentos: PA, PDMS e CAR/PDMS (conclusão)

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras			Identificação			
			PA	PDMS	CAR/PDMS	IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
35	13,88	espatulenol	x	x	x	1498	*	x	*
36	14,03	viridiflorol	x	x	x	1603	*	x	*
37	14,15	ledol	x	x	-	1609	1602	x	*
Total de compostos identificados			22	29	30				

(x) detectado/identificado; (-) não detectado; (n.i./*) não identificado; ¹ tempo de retenção (min); ² Índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ³ Índice de Kovats da literatura (ADAMS, 2007); ⁴ Espectrometria de massa (biblioteca *NIST EPA/NIH* disponível no equipamento); ⁵ Padrões comerciais da Sigma-Aldrich.

A fibra PDMS apresentou maior capacidade de retenção dos COVs (Gráfico 4.2, p. 34) e conseqüentemente maior abundância dos mesmos em relação às demais (Figura 4.4a, b, e c, p. 39-40), em razão da afinidade entre os constituintes e o revestimento.

Contudo, o revestimento CAR/PDMS apresentou o maior número de compostos identificados, uma vez que o uso de fibras mistas viabiliza a maior seletividade, sensibilidade e capacidade de retenção de componentes mais voláteis, como pode ser observado para os constituintes (1), (2), (3) e (4), com tempo de retenção entre 2,19 e 4,38 min. A maioria dos COVs extraídos eluiu em uma faixa de tempo de retenção específica, porque os mesmos pertencem à classe dos sesquiterpenos, ou seja, possuem estruturas químicas semelhantes. No entanto, apresentam certas diferenças tais como estereoquímica e número de ligações duplas, o que acarreta em interações diferentes, e conseqüentemente pontos de ebulição distintos.

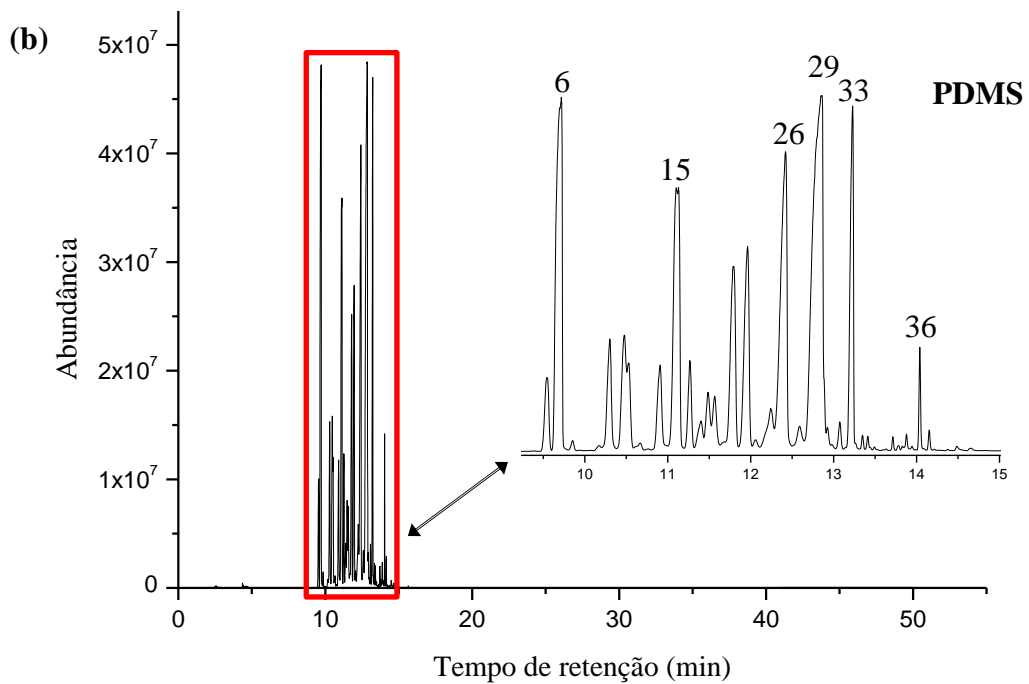
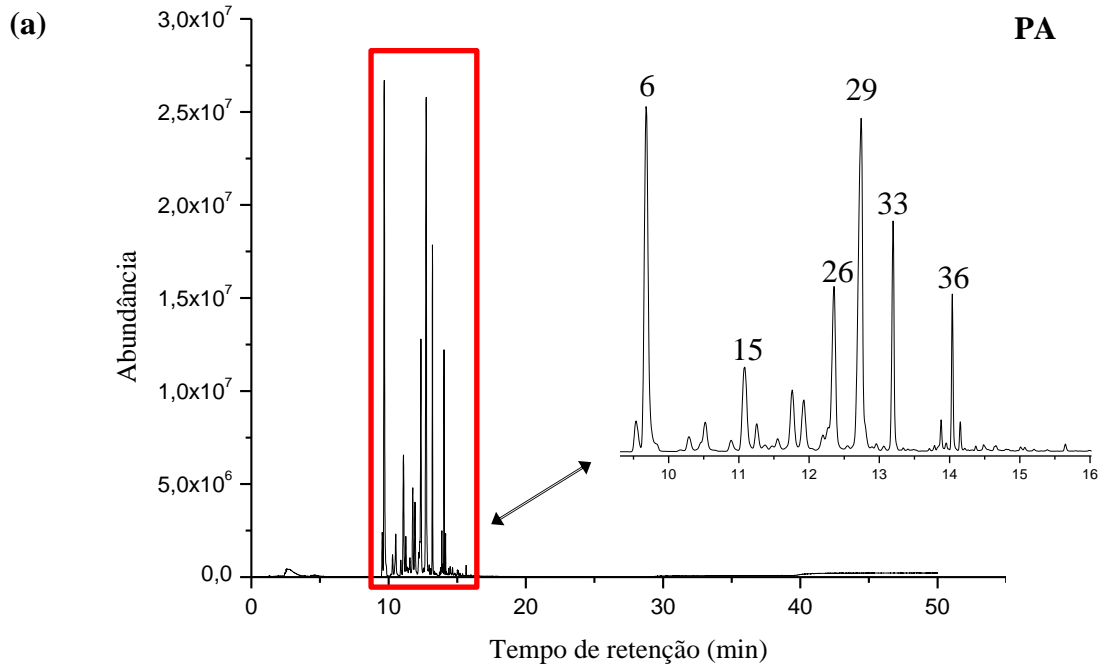
Com base no estudo supramencionado e considerando que há na literatura apenas um estudo sobre óleo essencial das folhas de *A. coriacea* utilizando a técnica de hidrodestilação, foi de suma importância propor outro método de identificação dos constituintes químicos, como a análise por *SPME*, para efeito de comparação entre os mesmos. Vale ressaltar que métodos que atendam aos princípios da Química Verde são primordiais e neste quesito a *SPME* é desejável, por não requerer tratamento prévio da amostra, além de ser livre de solvente, evitando a geração de resíduos.

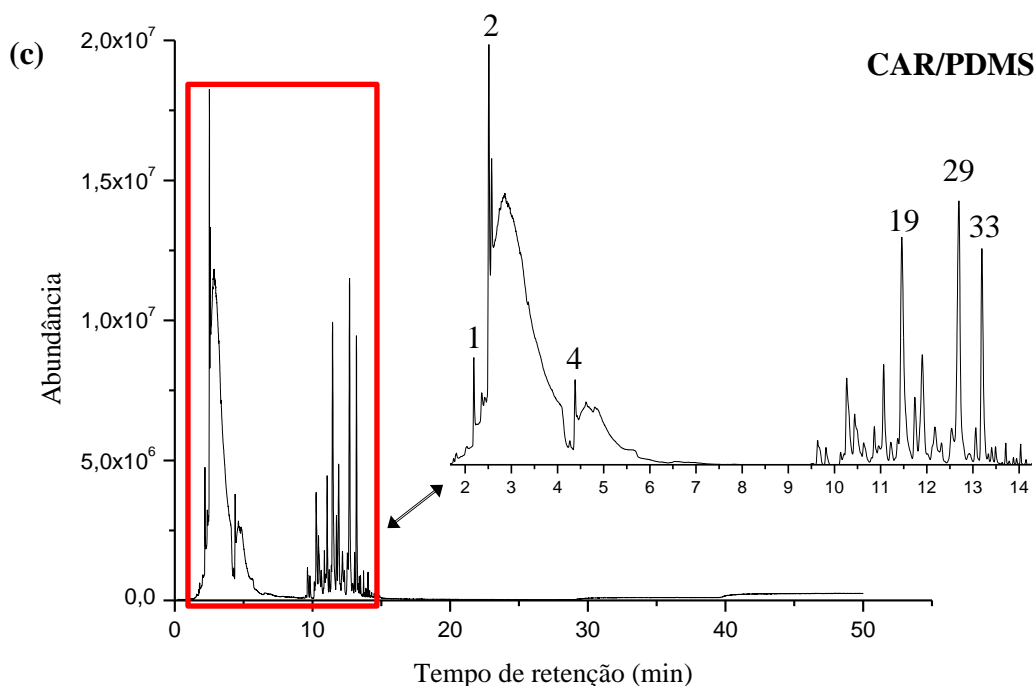
Entretanto, é importante que a técnica seja eficiente e neste sentido os dados deste estudo foram comparados com aqueles presentes na literatura que versam sobre a utilização da hidrodestilação como método de extração do óleo essencial das folhas de *A. coriacea*. O resultado em termos de classes de COVs extraídos entre as técnicas *SPME* e hidrodestilação mostrou-se condizente, pois em ambos os métodos de extração os compostos voláteis majoritários foram os sesquiterpenos, visto que ao utilizar a hidrodestilação constatou 76,7% sesquiterpenos, 20,0% monoterpenos e 3,3% de outros compostos (SIQUEIRA et al., 2011).

No entanto, vale ressaltar que embora tenha sido feita a comparação, as folhas foram coletadas em Águas de Santa Bárbara - São Paulo, na Estação Ecológica (Reserva Natural) do Instituto Florestal de São Paulo, enquanto que a espécie de estudo deste trabalho está localizada na cidade de Catalão - Goiás; desta forma, diversos fatores podem influenciar no conteúdo dos seus metabólitos secundários, como por exemplo,

sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, nutrientes, indução por estímulos mecânicos, ritmo circadiano, etc (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

FIGURA 4.4 - CIT obtido após análise de *HS-SPME* com as fibras (a) PA, (b) PDMS e (c) CAR/PDMS





4.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DAS FLORES DE *X. aromatica*

Os resultados descritos aqui foram obtidos através das extrações *in vivo* e *in vitro* por *HS-SPME*, em consequência do maior número de COVs identificados do aroma floral de *X. aromatica*. O tempo de extração, temperatura de extração e tempo de equilíbrio são variáveis que influenciam a pressão de vapor e o equilíbrio dos constituintes voláteis entre o *headspace* e o revestimento da fibra (PELLATI et al., 2005), por isso os mesmos foram selecionados e otimizados, no entanto, o tempo de equilíbrio de 15 min se manteve inalterado neste estudo.

A otimização dos experimentos avaliou o efeito do tempo de extração e fibra simultaneamente, mantendo as outras variáveis constantes. Além disso, uma vez que a seleção da fibra de *SPME* mais adequada depende dos compostos-alvo (BICCHI, DRIGO, RUBIOLO, 2000), utilizou-se fibras com polaridades diferentes, visando à extração do maior número de compostos.

4.2.1 - Extração *in vivo* dos COVs das Flores de *X. aromatica*

O tempo de extração é uma variável que interfere na transferência de massa dos analitos entre as fases do filme polimérico, fase gasosa e matriz do sistema no modo *headspace*. Portanto, o tempo ideal de extração é atingido quando ocorre o

equilíbrio entres tais fases (ZHANG et al., 2007; FERREIRA, PERESTRELO, CÂMARA, 2009). Diante disso, realizou-se os experimentos *in vivo* com as exposições das fibras CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PA e PDMS por 15, 30, 45, 60 e 120 min e aplicou-se a análise quimiométrica com a finalidade de selecionar o intervalo de tempo ideal para a máxima extração de COVs.

4.2.1.1 - Avaliação quimiométrica das quatro fibras empregadas no estudo do tempo de extração *in vivo*

A etapa de pré-processamento dos dados é fundamental para o sucesso da análise multivariada, uma vez que elimina informações não relevantes, do ponto de vista químico, e torna a matriz de dados melhor condicionada para a análise (SOUZA, POPPI, 2012).

Na ACP dos experimentos *in vivo* foram utilizados os cromatogramas médios de cada experimento (três réplicas reais para cada combinação de fibra e tempo de exposição avaliado) para a construção da matriz de dados X ($n \times m$), onde $n = 20$ corresponde ao número de experimentos e m corresponde aos 12.441 sinais obtidos pelo detector do espectrômetro de massas, os quais foram adquiridos ao longo dos 60 min de cada análise no equipamento, conforme ilustrado na Figura 4.5.

FIGURA 4.5 - Representação da matriz de dados utilizada nas análises de ACP para os experimentos *in vivo*

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

Onde:

n = número de experimentos.

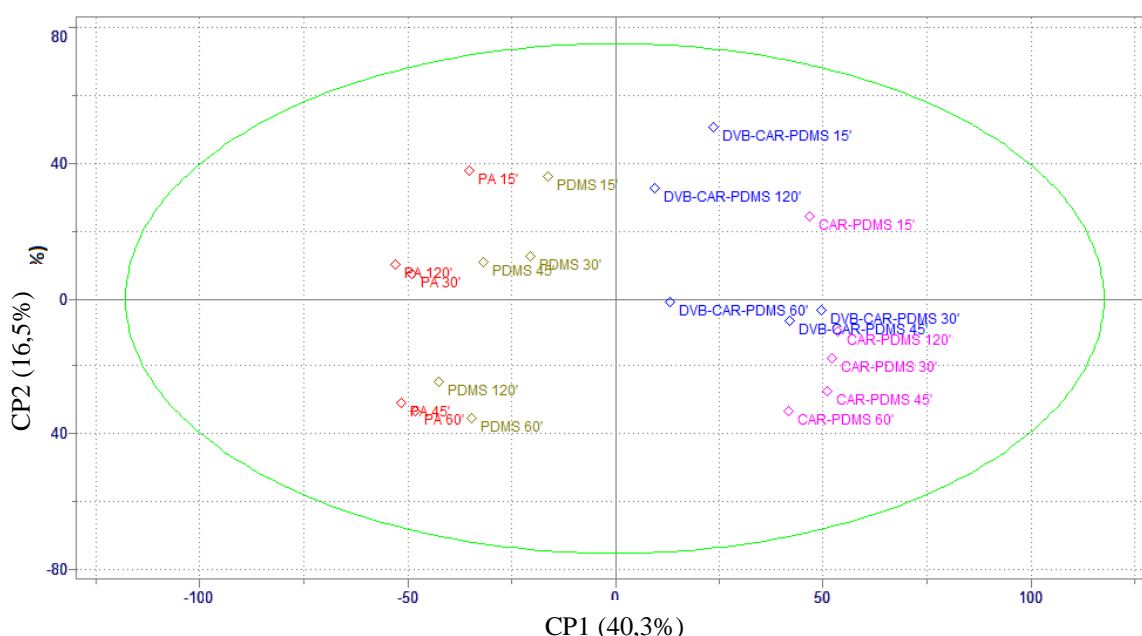
m = resposta do detector para cada tempo de retenção (variáveis independentes).

Os dados obtidos através dos experimentos foram normalizados, ou seja, o valor de cada variável foi dividido pela soma dos valores de todas as variáveis e centrados na média, isto é, calculou-se a média das intensidades de cada resposta - sinal

de cada tempo de eluição - neste caso, as variáveis de todos os cromatogramas utilizados e subtraiu-se cada uma das intensidades deste valor médio. Desta maneira, cada variável passou a ter média zero e então a ACP foi realizada.

O Gráfico 4.3 apresenta os *scores* resultantes da ACP realizada na matriz supracitada, em que foi possível observar a segregação para os *scores* de cada fibra ao longo do eixo da Componente Principal (CP) 1, enquanto que ao longo do eixo da CP2 observou-se as diferenças nos perfis dos compostos extraídos com uma mesma fibra em relação ao tempo de extração empregado.

GRÁFICO 4.3 - *Scores* dos experimentos *in vivo* com exposição das fibras CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PA e PDMS por 15, 30, 45, 60 e 120 min



': minutos

A quimiometria oferece na mesma análise informações relativas ao comportamento das fibras em diferentes tempos de exposição. Nota-se que no gráfico 4.3, os *scores* da fibra PA para exposições de 45 e 60 min agruparam-se e separaram-se das exposições a 30 e 120 min, os quais também desmembraram-se da exposição a 15 min. Este padrão pode ser observado também para as demais fibras.

Neste contexto, ainda é possível observar que para as fibras PA, PDMS e CAR/PDMS os tempos de 15 e 60 min estão ao extremo, enquanto os demais estão compreendidos nesse intervalo. Assim, o emprego de tempo de 15 e 60 min torna

possível o englobamento da maior diversidade de compostos, até mesmo aqueles constituintes que foram seletivos para uma determinada fibra. A fibra DVB/CAR/PDMS apresentou um comportamento diferente das demais, porém esta divergência não possui grande relevância, já que os tempos de 30, 45 e 60 min estão próximos ao longo da CP1, o que significa que não há grandes desigualdades em termos de compostos para estas condições utilizadas.

Diante disso, a maior parte dos compostos extraídos em todas as fibras utilizadas foram identificados no tempo de extração de 60 min, porque o tempo de 15 min não foi suficiente para obtenção de todos os COVs, já que alguns apresentaram baixas intensidades, dificultando a identificação.

Portanto, o tempo de extração dos COVs das flores de *X. aromatica* de 60 min apresentou-se promissor em relação aos demais, sem a necessidade de um tempo maior, pois quando realizou-se os experimentos empregando 120 min houve perda do número de constituintes voláteis extraídos, resultado de uma dessorção parcial dos compostos que apresentaram menores interações com os diferentes tipos de filmes que recobrem estas fibras (ZHANG et al., 2007; FERREIRA, PERESTRELO, CÂMARA, 2009).

4.2.1.2 - Seleção da fibra de *SPME*

Para situações em que a caracterização química da fração volátil de uma espécie, em termos do número máximo de compostos que podem ser extraídos, é o principal objetivo de uma investigação, a seleção de uma fibra deve ser em função da seletividade que cada revestimento pode promover.

Assim, a seleção da fibra no presente estudo foi feita com base na extração de 37, 32, 31 e 33 constituintes voláteis para CAR/PDMS, PDMS, PA e DVB/CAR/PDMS, respectivamente, no tempo de extração de 60 min (Tabela 4.3, p. 44-47), sendo que os constituintes analisados e identificados nos brancos foram subtraídos na identificação.

TABELA 4.3 - Identificação dos compostos voláteis das flores de *X. aromatica* usando diferentes revestimentos

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras				Identificação			
			PA	PDMS	CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
1	9,36	(Z)-β-ocimeno	-	-	x	x	1030	1037	x	*
2	12,04	1,3-ciclohexadieno, 1,3,5,5-tetrametil	-	-	x	x	1071	*	x	*
3	12,46	neo- <i>allo</i> -ocimeno	-	-	x	x	1077	*	x	*
4	17,65	indol	x	-	x	x	1255	*	x	*
5	19,37	α-cubebeno	x	x	x	x	1279	*	x	*
6	20,05	α-ylangeno	-	-	x	-	1289	*	x	*
7	20,21	α-copaeno	x	x	x	x	1291	*	x	*
8	20,50	β-bourboneno	x	x	x	x	1294	*	x	*
9	20,67	β-cubebeno	-	x	x	x	1297	*	x	*
10	20,72	β-elemeno	x	-	x	-	1297	*	x	*
11	21,59	(E)-cariofileno	x	x	x	x	1412	*	x	x
12	21,89	β-cedreno	x	x	x	x	1417	1420	x	*
13	22,38	longifoleno	x	x	-	-	1426	*	x	*
14	22,43	<i>cis</i> -muuro-la-3,5-dieno	-	x	x	x	1427	*	x	*
15	22,56	β-copaeno	x	x	x	x	1430	1432	x	*
16	22,66	α-humuleno	x	x	x	x	1431	*	x	x

TABELA 4.3 - Identificação dos compostos voláteis das flores de *X. aromatica* usando diferentes revestimentos (continuação)

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras				Identificação			
			PA	PDMS	CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
17	22,89	β-gurjuneno	x	x	x	x	1435	1433	x	*
18	22,96	epi-biciclosesquifelandreno	-	x	-	x	1437	*	x	*
19	23,12	aromadendreno	-	-	x	-	1439	1441	x	*
20	23,28	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	x	x	x	x	1442	*	x	*
21	23,39	γ-muuroleno	x	x	x	x	1444	*	x	*
22	23,50	sibireno	x	x	x	x	1446	*	x	*
23	23,84	<i>trans</i> -muurolo-3,5-dieno	x	x	x	x	1451	1453	x	*
24	23,93	γ-elemeno	x	-	x	x	1453	*	x	*
25	24,03	n.i.	-	x	-	-	1455	*	*	*
26	24,08	α-muuroleno	x	x	x	x	1455	*	x	*
27	24,34	(<i>E,E</i>)-α-farneseno	-	x	x	-	1460	*	x	*
28	24,50	γ-cadineno	-	-	x	-	1462	*	x	*
29	24,58	<i>cis</i> -cadina-1(6),4-dieno	-	-	-	x	1463	1463	x	*
30	24,62	epi-cubebol	x	x	-	-	1464	*	x	*
31	24,81	β-cadineno	x	x	x	x	1467	*	x	*
32	24,87	<i>cis</i> -β-guaieno	x	x	-	x	1468	*	x	*

TABELA 4.3 - Identificação dos compostos voláteis das flores de *X. aromatica* usando diferentes revestimentos (continuação)

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras				Identificação			
			PA	PDMS	CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
33	25,06	<i>cis</i> -cadina-1,4-dieno	x	x	x	x	1471	*	x	*
34	25,20	α -cadineno	-	x	x	x	1473	*	x	*
35	25,37	α -calacoreno	x	x	x	x	1476	*	x	*
36	26,24	α -acorenol	x	-	-	-	1489	*	x	*
37	26,32	amorfa-4,7(11)-dieno	x	x	x	x	1491	*	x	*
38	26,60	gleenol	x	-	x	-	1495	*	x	*
39	26,64	cadina-1(10),6,8-trieno	-	-	x	-	1495	*	x	*
40	27,29	β -oplopenona	x	-	-	x	1607	1607	x	*
41	27,66	α -corocaleno	-	-	x	-	1614	*	x	*
42	27,82	cubedol	x	x	x	x	1617	*	x	*
43	27,98	epóxido de <i>allo</i> -aromadendreno	x	-	-	-	1620	*	x	*
44	28,08	n.i.	x	x	-	x	1622	*	*	*
45	28,19	epi- α -cadinol	x	x	x	x	1624	*	x	*
46	28,57	α -cadinol	-	-	x	-	1632	*	x	*
47	29,13	cadaleno	-	-	x	-	1642	*	x	*
48	29,46	óxido de ledeno (II)	x	x	-	x	1648	*	x	*

TABELA 4.3 - Identificação dos compostos voláteis das flores de *X. aromatica* usando diferentes revestimentos

(conclusão)

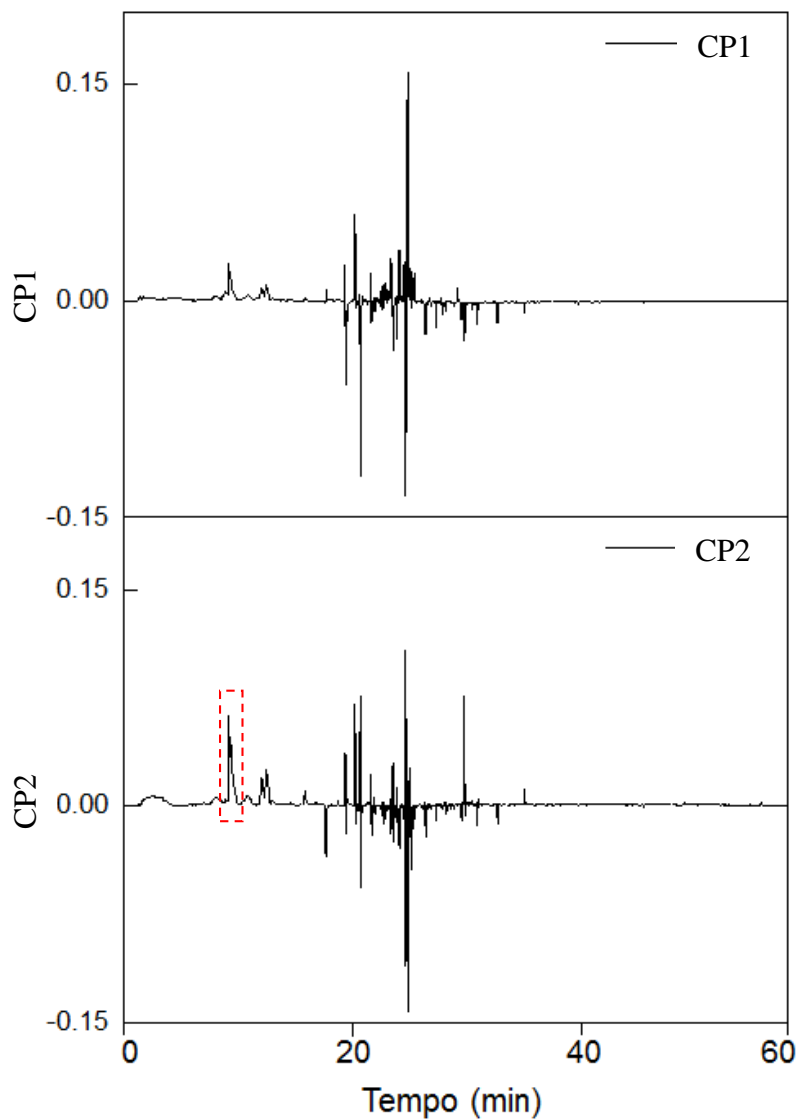
n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras				Identificação			
			PA	PDMS	CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS	IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
49	29,58	epi- α -muurolol	-	x	-	-	1651	*	x	*
50	29,72	pentadecan-2-ona	x	x	x	x	1653	*	x	x
51	30,86	n.i.	x	x	-	x	1674	*	*	*
52	31,75	n.i.	-	-	-	x	1689	*	*	*
53	32,63	n.i.	x	-	-	-	1805	*	*	*
54	34,98	heptadecan-2-ona	x	x	-	x	1853	*	x	*
55	39,64	<i>n</i> -heneicosano	-	x	-	-	2051	*	x	*
Total de compostos identificados			31	32	37	33				

(x) detectado/identificado; (-) não detectado; (n.i./*) não identificado; ¹ tempo de retenção (min); ² Índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série dos *n*-alcanos; ³ Índice de Kovats da literatura (ADAMS, 2007); ⁴ Espectrometria de massa (biblioteca *NIST EPA/NIH* disponível no equipamento); ⁵ Padrões comerciais da Sigma-Aldrich.

4.2.1.3 - Avaliação quimiométrica entre seleção da fibra e tempo de extração

Através dos *loadings* de CP1 e CP2 apresentados no Gráfico 4.4 observou-se as variáveis fibra e tempo de extração mais associados à determinados compostos e, conseqüentemente, tempo de eluição. A contextualização deste fato pode ser realizada tomando como exemplo o valor dos *loadings* para o intervalo de tempo de 9,15 a 9,86 min, destacado no gráfico de *loading* para a CP2.

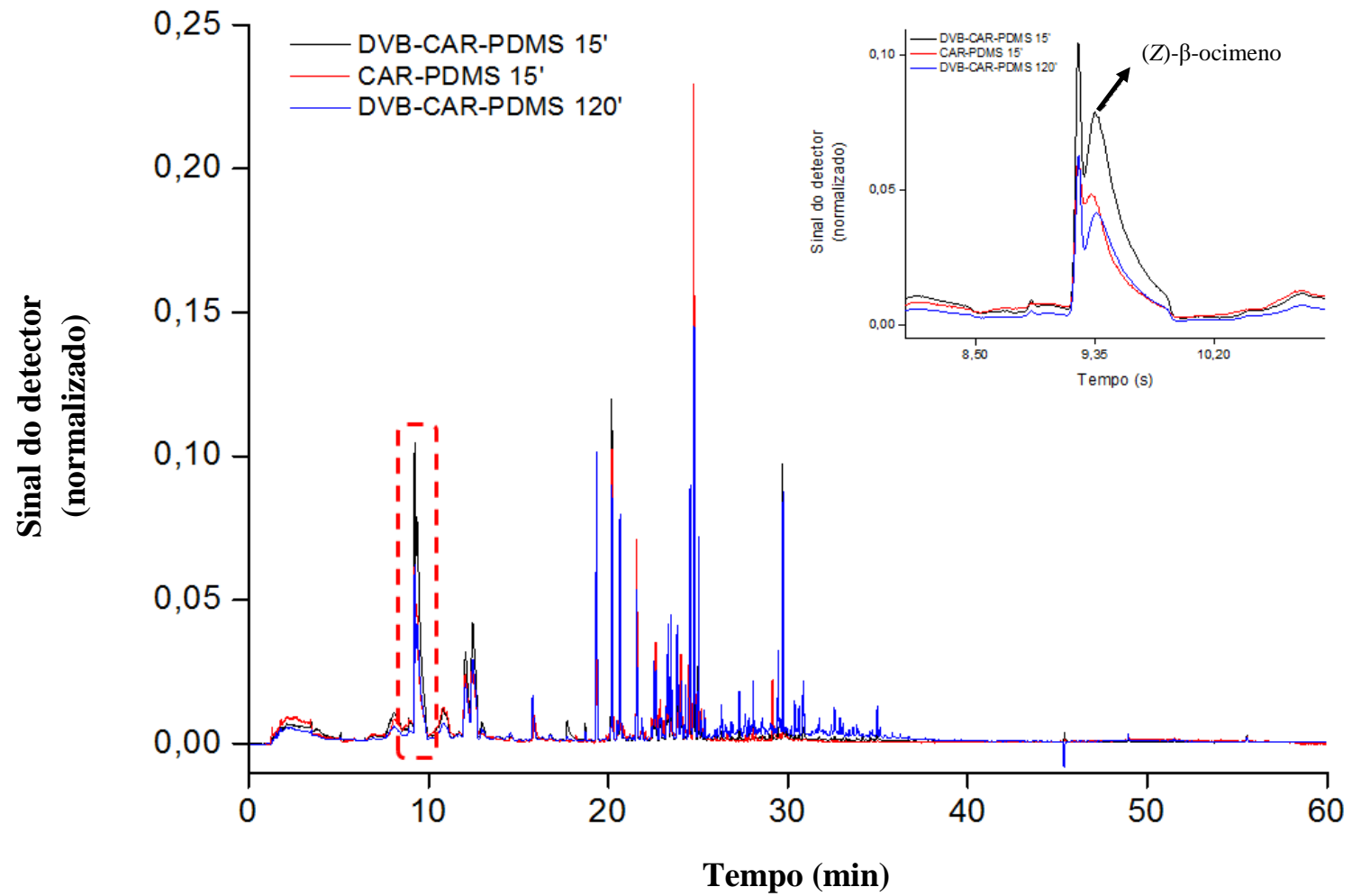
GRÁFICO 4.4 - *Loadings* dos experimentos *in vivo* com tempo de exposição das fibras CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PA e PDMS por 15, 30, 45, 60 e 120 min



Como para ambas as CPs neste intervalo, os valores de *loadings* são positivos, a primeira informação obtida é que as fibras com *scores* (Gráfico 4.3, p.42) no primeiro quadrante são as que estão mais associadas com o composto eluído neste intervalo de tempo, como o monoterpeneo (*Z*)- β -ocimeno (**1**), t_R : 9,36 min. Portanto, o respectivo valor de *loading* para CP2 é aproximadamente 2,5 vezes maior (0,0632/0,0267) que para CP1, dentre os experimentos realizados. Assim, inferiu-se que a fibra DVB/CAR/PDMS exposta por 15 min está mais associada a este composto. Esta análise está exemplificada na Figura 4.6 (p. 50), em que são apresentados os cromatogramas (média de três réplicas reais) obtidos pela exposição da fibra DVB/CAR/PDMS exposta por 15 e 120 min e CAR/PDMS por 15 min, e pode ser estendida para qualquer outro tempo de retenção considerado.

O tempo de extração de 60 min foi selecionado; porém os compostos (**1**), (**2**) e (**3**) não foram extraídos, mas identificados no intervalo de 9,15 a 9,86 min de análise para as extrações nos tempos de 15 e 120 min de exposição das fibras, com a finalidade de identificar o máximo de COVs para ter maior representatividade da fração volátil do aroma floral de *X. aromatica*. Tal fato provavelmente aconteceu porque as flores não estavam no mesmo estado fisiológico, ou seja, a idade e o desenvolvimento da planta podem influenciar na quantidade total de metabólitos secundários, e ainda nas proporções de determinados compostos ou misturas deles (GOBBO-NETO, LOPES, 2007), pois se trata de uma extração *in vivo* em que estágios diferentes do material vegetal foram considerados, e conseqüentemente estes compostos não foram liberados neste dia de análise.

FIGURA 4.6 - Cromatogramas normalizados para as extrações de DVB/CAR/PDMS 15 e 120 min e CAR/PDMS 15min



Por meio da análise quimiométrica dos dados é realizada uma abordagem diferente, em relação àquela que prioriza o número de compostos detectados, como no caso da obtenção de 37 COVs com o emprego da fibra CAR/PDMS. Ao contrário da informação qualitativa, a avaliação quimiométrica proporciona informações sobre a fibra e o tempo de exposição que estão mais associados aos diferentes compostos eluídos. Desta forma, é possível priorizar compostos (ou suas classes) de acordo com o interesse de investigação.

Por esse motivo, selecionaram-se as fibras CAR/PDMS e PA para dar continuidade aos experimentos a serem realizados *in vitro*, de modo que os resultados pudessem ser comparados, pois no gráfico de scores 4.3 (p. 42) as mesmas estão no extremo ao longo da CP2, indicando que tais fibras podem extrair compostos variados. Isso significa que, diante das condições testadas, as fibras apresentaram comportamentos diferenciados, e conseqüentemente, maior seletividade para determinados constituintes. Assim, pode-se extrair o máximo de informação possível do aroma floral, uma vez que a análise quimiométrica mostrou duas fibras como sendo as mais promissoras para se conhecer o maior número de constituintes diferentes entre si.

A partir da análise conjunta dos gráficos de *scores* e *loadings*, os quais explicam, respectivamente, a variância dos dados e o peso de cada variável, inferiu-se que os resultados mais promissores na extração *in vivo* para a análise do perfil volátil das flores de *X. aromatica* foram as fibras CAR/PDMS e PA, com tempo de extração de 60 min, através dos resultados mais promissores em função do maior número de compostos identificados. Portanto, estas condições foram utilizadas no estudo da extração *in vitro* dos constituintes voláteis do aroma floral, com acréscimo da variável temperatura.

4.2.2 - Extração *in vitro* dos COVs das Flores de *X. aromatica*

As análises de otimização avaliaram as fibras e o tempo de extração concomitantemente durante a extração *in vivo*; entretanto a temperatura é uma variável que foi otimizada através da extração *in vitro*, sendo que *in vivo* o controle da mesma é complexo, ainda que se tenha realizado o controle em todos os dias de análise, com média de 29 °C.

A fim de reproduzir a temperatura de 29 °C de modo que os constituintes extraídos fossem comparados nos modos *in vivo* e *in vitro*, utilizou-se uma estufa. Além

disso, uma temperatura maior (40 °C) foi avaliada para verificar o real efeito dessa variável na extração dos COVs do aroma floral de *X. aromatica*.

4.2.2.1 - Temperatura de extração *in vitro* dos COVs

A temperatura tem um papel relevante na extração dos constituintes voláteis, visto que pode influenciar os coeficientes de distribuição entre a amostra/*headspace* e *headspace*/fibra. Assim sendo, é um parâmetro signficante no controle da taxa de difusão dos analitos de interesse para o revestimento (LI, LEE, SHEN, 2006; ZHANG et al., 2007).

Neste contexto, avaliou-se as temperaturas de 29 e 40 °C durante a extração *in vitro* dos COVs do odor floral de *X. aromatica*, visando avaliar o quanto as mesmas influenciariam no estudo do perfil químico dos constituintes voláteis.

Como resultados desta análise, observou-se que com o aumento da temperatura o número de COVs extraídos reduziu, uma vez que em temperaturas elevadas os coeficientes de distribuição diminuem, e conseqüentemente há menor difusão dos compostos nos revestimentos. Tal fato influencia diretamente na capacidade de retenção dos COVs.

Portanto, a temperatura de 29 °C apresentou os resultados mais expressivos em termos de números de compostos extraídos, em que foi possível identificar 46 e 41 compostos para as fibras PA e CAR/PDMS, respectivamente, enquanto que na temperatura de 40 °C identificou-se 39 constituintes em ambas as fibras.

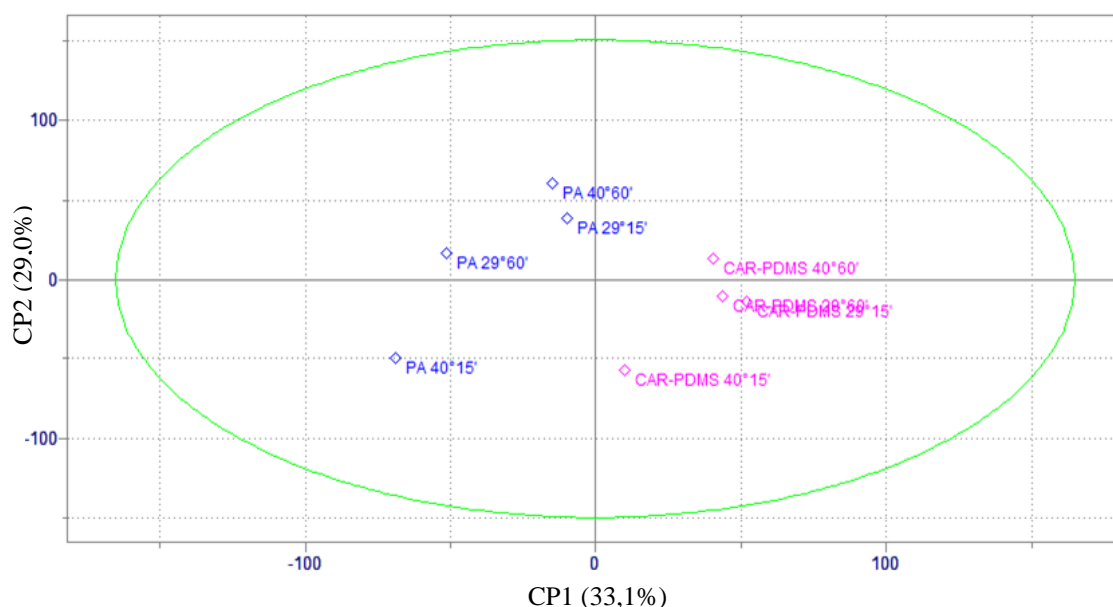
4.2.2.2 - Avaliação quimiométrica das fibras, temperatura de extração e tempo de extração no modo *in vitro*

Com base nos resultados da ACP descritos anteriormente, as fibras PA e CAR/PDMS foram selecionadas para os estudos *in vitro*, em que o fator temperatura de extração passou a ser considerado. Três réplicas reais de cada fibra para as temperaturas de 29 e 40 °C foram realizadas em tempos de 15 e 60 min, perfazendo um total de 24 extrações. A matriz de dados resultante foi constituída pelos oito cromatogramas médios (amostras) x 12.441 sinais adquiridos em 60 min de corrida cromatográfica

(variáveis). Para a execução das análises quimiométricas, os dados foram normalizados e centrados na média.

No gráfico de *scores* (Gráfico 4.5) resultante da ACP, observou-se a segregação das fibras ao longo do eixo da CP1, em consequência das diferentes características das mesmas, principalmente quanto à polaridade (PA - polar; CAR/PDMS - semi-polar). Ao longo do eixo de CP2, são apresentadas as variações no perfil de extração de cada fibra em função das variáveis tempo e temperatura.

GRÁFICO 4.5 - *Scores* dos experimentos *in vitro*: fibras (CAR/PDMS e PA), tempo de exposição (15 e 60 min) e temperatura (29 e 40 °C)



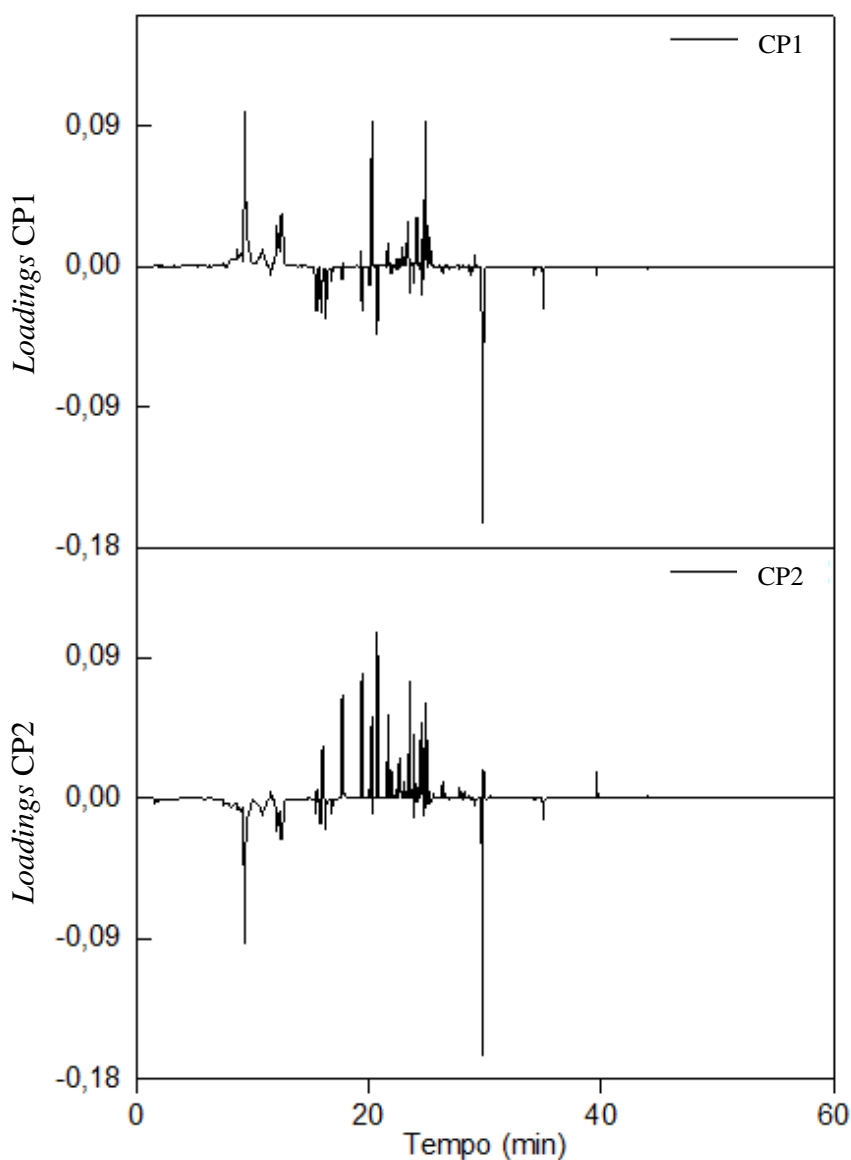
°: temperatura (°C)
' : minutos

Através deste gráfico observou-se que os *scores* da fibra CAR/PDMS estão mais próximos, mostrando que o perfil de adsorção é menos susceptível às variações de tempo/temperatura nos intervalos avaliados do que a fibra PA. Em relação à fibra CAR/PDMS, a maior variação no perfil dos compostos adsorvidos ocorreu na condição de extração a 40 °C por 15 min, em que a variável tempo de retenção está mais associada com valores negativos de CP2. Isto discrimina esta condição de extração das demais, apesar de ser a mesma fibra e variável, esta possui valores positivos em CP1. Considerando os *scores* referentes à fibra PA, estes apresentaram uma maior

dispersão, e consequentemente estão mais associados às variáveis com valores negativos de CP1 e positivos para CP2.

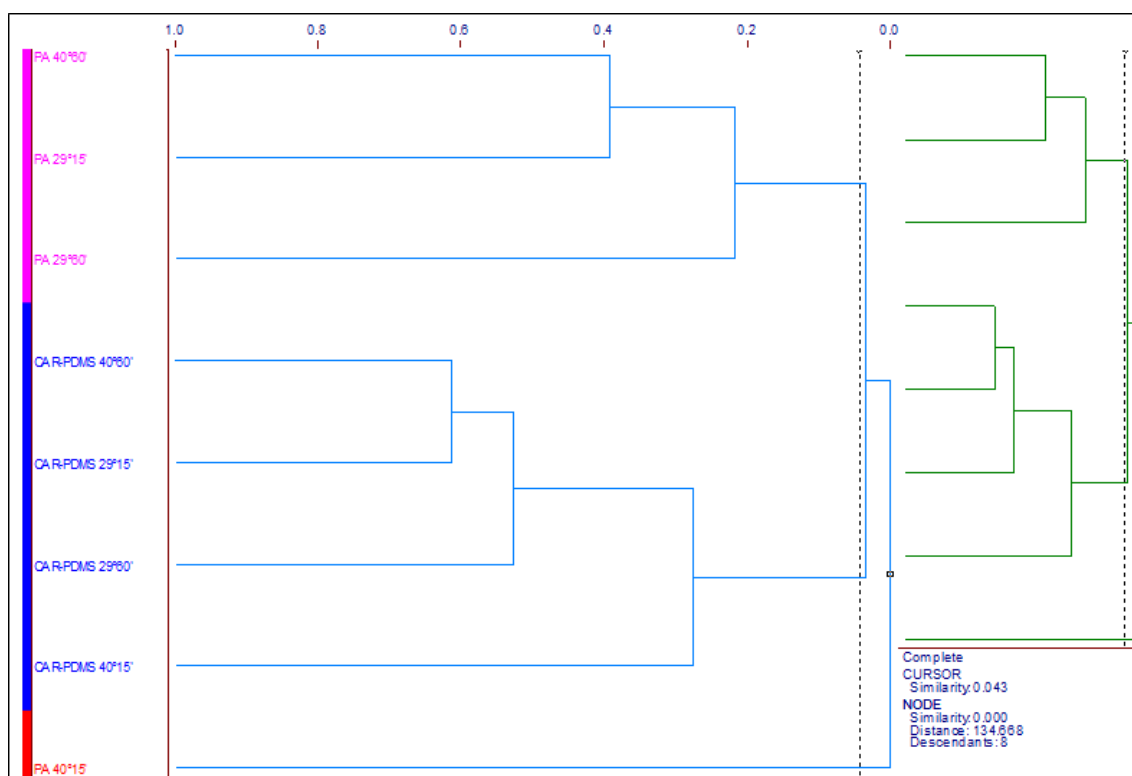
De forma análoga, ao apresentar e contextualizar a ACP *in vivo*, utilizando a triagem das fibras que mais se adequaram para determinar o perfil de voláteis de *X. aromatica*, foi realizado os gráficos de *loadings* resultantes desta ACP *in vitro* (Gráfico 4.6), que em conjunto com os gráficos de *scores* fornecem a condição fibra/temperatura/tempo que podem ser utilizados para maximizar a resposta em termos de maior número de compostos.

GRÁFICO 4.6 - *Loadings* para CP1 e CP2 obtidos a partir da ACP realizada com os dados dos experimentos *in vitro*



Com relação à AHA realizada na mesma matriz de dados, o dendograma resultante (Gráfico 4.7) que classifica as amostras (fibras/tempo/temperatura) em relação às suas semelhanças é concordante com o gráfico de *scores*. Neste gráfico, as amostras mais semelhantes estão agrupadas a partir da extremidade direita. Portanto, as amostras denominadas de PA (40 °C 60 min) e PA (29 °C 15 min) são classificadas como mais semelhantes entre si; em seguida formam um primeiro grupo com a PA (29 °C 60 min), o que é totalmente concordante com a dispersão dos *scores* (Gráfico 4.5, p. 53).

GRÁFICO 4.7 - Dendograma obtido a partir da AHA realizada com os dados dos experimentos *in vitro*



°: temperatura (°C)
': minutos

Da mesma forma, as amostras referentes às fibras CAR/PDMS (40 °C 60 min), (29 °C 15 min) e (29 °C e 60 min) formam um segundo agrupamento, que é unido a CAR/PDMS (40 °C 15 min), assim como na ACP; essa última amostra é a mais distinta para este tipo de fibra. Estes dois grupos por sua vez, não mostram semelhança com PA (40 °C 15 min), conforme os resultados de ACP, por isso esta amostra é única e caracterizada por valores negativos em CP1 e CP2.

4.2.3 - Comparação dos COVs Utilizando *HS-SPME* nos Modos *in vivo* e *in vitro*

A extração dos COVs das flores de *X. aromatica* foi investigada aplicando a técnica *HS-SPME* nos modos *in vivo* e *in vitro*, a fim de comparar o perfil químico através dos mesmos. Ressalta-se que a análise *in vivo* é realizada sem a coleta do material; assim é possível identificar os constituintes voláteis do espécime em seu *habitat* natural, sem que haja modificações por estímulos mecânicos ou outros fatores, além de preservar o material vegetal, mostrando, portanto, a importância desta técnica para a Química Verde. Na extração *in vitro* torna-se necessária a coleta da amostra, e provavelmente alguns constituintes podem sofrer modificações químicas ou físicas e não serem detectados na análise.

Neste contexto, as condições que apresentaram os resultados mais promissores foram: fibras de CAR/PDMS e PA, tempo de extração igual a 60 min e temperatura de extração de 29 °C.

Um total de 41 e 46 constituintes voláteis foram identificados para CAR/PDMS e PA na extração *in vitro*, respectivamente (Tabela 4.4, p. 57-61), sendo que os constituintes analisados e identificados nos brancos foram descontados na identificação. Ao contrário da extração *in vivo*, um número maior de compostos foi determinado para o revestimento de poliacrilato (PA), o qual é considerado polar. Desta forma, compostos como nerol, citronelol, geraniol, neral e geranial, que apresentam certa polaridade, tiveram afinidade por este revestimento.

O número de compostos identificados na extração *in vitro* foi superior a *in vivo*. Tal fato supostamente ocorreu porque os metabólitos secundários são dependentes de vários fatores, tais como: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, idade, radiação ultravioleta, indução mecânica (GOBBO-NETO, LOPES, 2007), entre outros. Em relação ao ritmo circadiano, todas as análises começaram às 9 h, impreterivelmente, a fim de minimizar o efeito deste fator no conteúdo dos COVs. Nas extrações *in vivo* houve a incidência de radiação ultravioleta na matriz de análise, enquanto que *in vitro* as amostras foram mantidas dentro de uma estufa sem nenhum tipo de radiação. Com relação ao fator indução por estímulo mecânico, este possivelmente teve grande importância na produção de um maior número de compostos, visto que as flores sofreram algum tipo de dano superficial nas suas partes ao serem coletadas.

TABELA 4.4 - Identificação dos compostos voláteis das flores de *X. aromatica* extraídos nos modos *in vivo* e *in vitro*

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras				Identificação			
			PA		CAR-PDMS		IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
			<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>				
1	7,46	β-pineno	-	-	-	x	895	*	x	*
2	7,69	mirceno		x			899	*	x	*
3	8,62	<i>R</i> -limoneno	-	-	-	x	1017	*	x	x
4	8,80	silvestreno	-	x	-	-	1020	1030	x	*
5	8,91	δ-2-careno	-	-	-	x	1022	*	x	*
6	9,36	(<i>Z</i>)-β-ocimeno	-	x	x	x	1030	1037	x	*
7	10,81	terpinoleno	-	-	-	x	1054	*	x	*
8	11,53	fenil etil álcool		x	-	x	1064	*	x	*
9	12,04	1,3-ciclohexadieno, 1,3,5,5-tetrametil	-	-	x	x	1071	*	x	*
10	12,46	neo- <i>allo</i> -ocimeno	-	-	x	x	1077	*	x	*
11	15,48	nerol	-	x	-	-	1220	1229	x	*
12	15,79	citronelol	-	x	-	-	1226	1225	x	*
13	16,31	geraniol	-	x	-	-	1234	*	x	*
14	16,49	neral	-	x	-	-	1237	1238	x	*
15	16,77	geranial	-	x	-	-	1241	*	x	*
16	17,65	indol	x	x	x	x	1255	*	x	*

TABELA 4.4 - Identificação dos compostos voláteis das flores de *X. aromatica* extraídos nos modos *in vivo* e *in vitro* (continuação)

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras				Identificação			
			PA		CAR/PDMS		IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
			<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>				
17	19,37	α-cubebeno	x	x	x	x	1279	*	x	*
18	19,83	neril acetato	-	x	-	-	1285	*	x	*
19	19,89	ciclosativeno	-	-	-	-	1286	*	x	*
20	20,05	α-ylangeno		x	x	x	1289	*	x	*
21	20,21	α-copaeno	x	x	x	x	1291	*	x	*
22	20,50	β-bourboneno	x	-	x	-	1294	*	x	*
23	20,67	β-cubebeno	-	-	x	x	1296	*	x	*
24	20,72	β-elemeno	x	x	x	x	1297	*	x	*
25	20,91	<i>cis</i> -tujopseno	-	-	-	x	1300	*	x	*
26	21,59	(<i>E</i>)-cariofileno	x	x	x	x	1412	1419	x	x
27	21,89	β-cedreno	x	x	x	x	1417	1420	x	*
28	22,38	longifoleno	x	x	-	-	1426	*	x	*
29	22,43	<i>cis</i> -muurola-3,5-dieno	-	-	x	x	1427	*	x	*
30	22,56	β-copaeno	x	x	x	x	1430	1432	x	*
31	22,66	α-humuleno	x	x	x	x	1431	*	x	x
32	22,89	β-gurjuneno	x	x	x	x	1435	1433	x	*

TABELA 4.4 - Identificação dos compostos voláteis das flores de *X. aromatica* extraídos nos modos *in vivo* e *in vitro* (continuação)

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras				Identificação			
			PA		CAR/PDMS		IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
			<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>				
33	22,96	epi-biciclosesquifelandreno	-	x	-	-	1436	*	x	*
34	23,12	aromadendreno	-	-	x	x	1439	1441	x	*
35	23,28	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	x	x	x	x	1442	*	x	*
36	23,39	γ-muuroleno	x	x	x	x	1444	*	x	*
37	23,50	sibireno	x	x	x	x	1446	*	x	*
38	23,84	<i>trans</i> -muurolo-3,5-dieno	x	x	x	x	1451	1453	x	*
39	23,91	tridecan-2-ona	-	x	-	-	1453	*	x	x
40	23,93	γ-elemeneno	x	-	x	x	1453	*	x	*
41	24,03	n.i.	-	x	-	-	1455	*	*	*
42	24,08	α-muuroleno	x	x	x	x	1455	*	x	*
43	24,34	(<i>E,E</i>)-α-farneseno	-	x	x	x	1459	*	x	*
44	24,50	γ-cadineno	-	x	x	x	1462	*	x	*
45	24,58	<i>cis</i> -cadina-1(6),4-dieno	-	x	-	-	1463	1463	x	*
46	24,81	β-cadineno	x	x	-	-	1467	*	x	*
47	24,87	<i>cis</i> -β-guaeino	x	-	x	x	1468	*	x	*
48	25,06	<i>cis</i> -cadina-1,4-dieno	x	x	x	x	1471	*	x	*

TABELA 4.4 - Identificação dos compostos voláteis das flores de *X. aromatica* extraídos nos modos *in vivo* e *in vitro* (continuação)

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras				Identificação			
			PA		CAR/PDMS		IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
			<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>				
49	25,20	α-cadineno	-	x	x	x	1473	*	x	*
50	25,37	α-calacoreno	x	x	x	x	1476	*	x	*
51	26,24	α-acorenol	x	-	-	-	1489	*	x	*
52	26,32	amorfa-4,7(11)-dieno	x	x	x	x	1491	*	x	*
53	26,60	gleenol	x	-	-	-	1495	*	x	*
54	26,64	cadina-1(10),6,8-trieno	-	-	x	x	1495	*	x	*
55	26,88	tretadecan-2-ona	-	x	-	-		*	x	*
56	27,29	β-oplopenona	x	x	-	-	1607	1607	x	*
57	27,66	α-corocaleno	-	-	x	-	1614	1623	x	*
58	27,82	cubedol	x	x	x	x	1617	*	x	*
59	27,98	epóxido de <i>allo</i> -aromadendrene	x	-	-	-	1620	*	x	*
60	28,08	n.i.	x	-	-	-	1622	*	*	*
61	28,19	epi-α-cadinol	x	x	x	x	1624	1624	x	*
62	28,57	α-cadinol	-	x	x	x	1631	*	x	*
63	28,69	n.i.	-	x	-	-	1634	*	*	*
64	28,96	1,5-dodecadieno	-	x	-	-	1639	*	x	*

TABELA 4.4 - Identificação dos compostos voláteis das flores de *X. aromatica* extraídos nos modos *in vivo* e *in vitro* (conclusão)

n°	t _R ¹ (min)	Compostos	Fibras				Identificação			
			PA		CAR/PDMS		IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴	Padrão comercial ⁵
			<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>				
65	29,13	cadaleno	-	-	x	x	1642	*	x	*
66	29,46	óxido de ledeno (II)	x	-	-	-	1648	*	x	*
67	29,72	pentadecan-2-ona	x	x	x	x	1654	*	x	x
68	30,86	n.i.	x	-	-	-	1674	*	*	*
69	32,63	n.i.	x	-	-	-	1805	*	*	*
70	34,15	(9Z)-octadeca-9,17-dienal	-	x	-	-	1837	*	x	*
71	34,98	heptadecan-2-ona	x	x	-	-	1854	*	x	*
72	39,64	<i>n</i> -heneicosano	-	x	-	-	2051	*	x	*
Total de compostos identificados por fibra			31	46	37	41				

(x) detectado/identificado; (-) não detectado; (n.i./*) não identificado; ¹ tempo de retenção (min); ² Índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série dos *n*-alcanos; ³ Índice de Kovats da literatura (ADAMS, 2007); ⁴ Espectrometria de massa (biblioteca *NIST EPA/NIH* disponível no equipamento); ⁵ Padrões comerciais da Sigma-Aldrich.

Assim, por meio dos estudos *in vivo* e *in vitro* das flores de *X. aromatica* realizados via *HS-SPME* constatou-se diferença no perfil dos constituintes em função do modo de extração utilizado. Além disso, a seleção do revestimento polimérico foi um fator importante, pois determinados compostos são específicos para certas fibras, mostrando a seletividade existente entre constituinte químico e fibra.

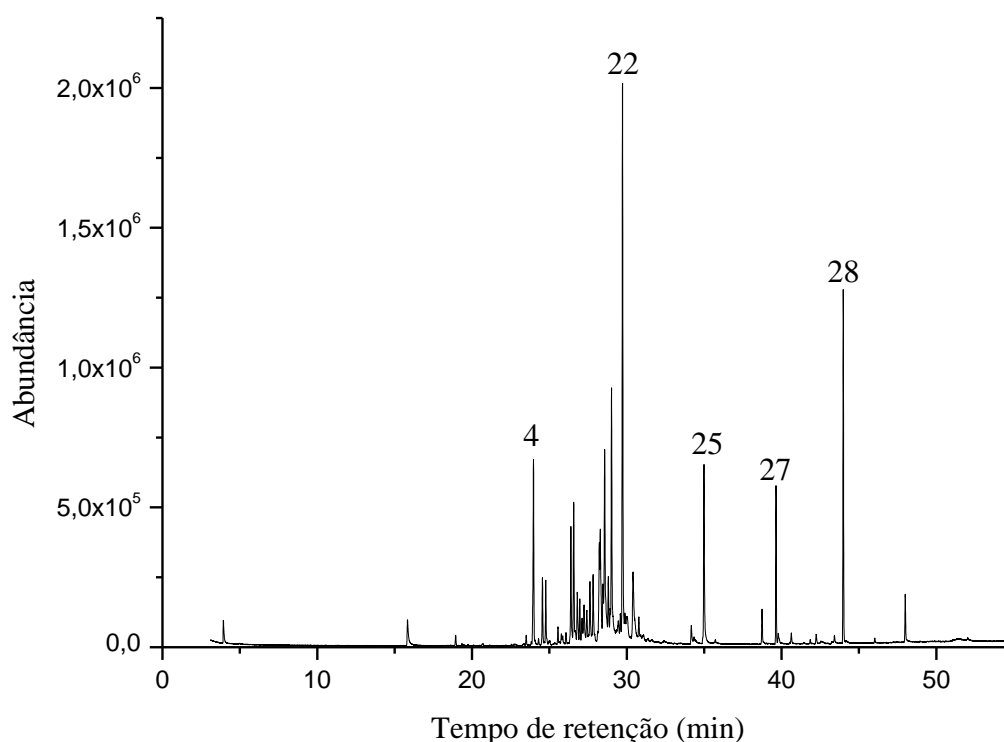
Diante disso, conclui-se que é de suma importância a definição do foco de estudo de COVs, pois uma fração volátil pode ser modificada e ter a sua aplicabilidade comprometida, dependendo da abordagem de extração e caracterização.

No contexto supracitado, considerando, por exemplo, que a investigação seja voltada ao estudo de COVS na relação planta-polinizadores ou então no uso destes compostos como notas para a produção de um cosmético/perfume, a extração no modo *in vivo* será a maneira mais viável de representar o perfil químico dos mesmos, de forma a não alterar sua constituição.

4.2.4 - Obtenção e Caracterização Química do Óleo Essencial de *X. aromatica*

O óleo essencial das flores de *X. aromatica* foi obtido por hidrodestilação, através do aparelho tipo Clevenger, e apresentou-se incolor, com rendimento de 0,02% (m/m). A caracterização química foi realizada por CG-EM e o cromatograma, ilustrado na Figura 4.7 (p. 63), apresenta os principais compostos identificados.

FIGURA 4.7 - CIT obtido após análise do óleo essencial via CG-EM



Um total de 28 compostos foi identificado, em que os sesquiterpenos/oides representaram 62,06% do total. Os sesquiterpenos principais foram os γ -elemeno (9,74%), viridifloreno (3,13%) e β -vetispireno (3,00%), enquanto os sesquiterpenoides foram os α -cadinol (7,76%), epóxido de alloaromadendreno (7,23%) e muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol (4,40%). O composto majoritário deste óleo essencial foi a pentadecan-2-ona (16,38%). As cetonas, os hidrocarbonetos, os diterpenos e monoterpenoides representaram 13,80%, 10,34%, 6,90% e 3,45%, nesta ordem, do total do óleo essencial (Tabela 4.5).

TABELA 4.5 - Composição química (%) do óleo essencial das flores de *X. aromatica*

Nº	t_R^1 (min)	Compostos	%	Identificação		
				IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴
1	15,81	citronelol	1,51	1226	1225	x
2	18,93	elixeno	0,76	*	*	*
3	23,49	sibireno	1,33	1445	*	x
4	23,97	γ -elemeno	9,74	1453	*	x

TABELA 4.5 - Composição química (%) do óleo essencial das flores de *X. aromatica* (conclusão)

Nº	t _R ¹ (min)	Compostos	%	Identificação		
				IK _{cal} ²	IK _{lit} ³	EM ⁴
5	24,54	<i>cis</i> -cadina-1(6),4-dieno	2,40	1463	1463	x
6	24,76	β-cadineno	2,90	1466	*	x
7	26,38	β-vetispireno	3,00	1491	1493	x
8	26,56	viridifloreno	3,13	1494	1496	x
9	26,79	<i>trans</i> -β-guaieno	1,93	1498	1502	x
10	26,96	guaiol	1,36	1600	1600	x
11	27,10	n.i.	0,90	1603	*	x
12	27,23	β-vatireno	1,70	1605	*	x
13	27,41	isolongifolan-7-α-ol	1,14	1609	1619	x
14	27,61	zierona	2,32	1613	*	x
15	27,82	cubedol	2,52	1617	*	x
16	28,22	epi-α-cadinol	3,44	1625	*	x
17	28,28	muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol	4,40	1626	1631	x
18	28,46	γ-eudesmol	1,68	1630	1632	x
19	28,56	α-cadinol	7,76	1631	*	x
20	28,80	óxido de ledeno II	1,88	*	*	*
21	29,01	epóxido de <i>allo</i> -aromadendreno	7,23	*	*	*
22	29,72	pentadecan-2-ona ⁵	16,38	1653	*	x
23	30,38	geranil-α-terpineno	4,46	1665	*	x
24	30,78	mustacona	0,60	1672	1677	x
25	34,98	heptadecan-2-ona	5,83	1854	*	x
26	38,73	biformeno	0,77	2031	*	x
27	39,63	<i>n</i> -heneicosano	2,92	2051	*	x
28	43,98	hexacosano	6,17	2251	*	x
29	47,99	heptacosano	1,10	2450	*	x

(x) identificado; (n.i./*) não identificado; ¹ tempo de retenção (min); ² Índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série dos *n*-alcanos; ³ Índice de Kovats da literatura (ADAMS, 2007); ⁴ Espectrometria de massa (biblioteca *NIST EPA/NIH* disponível no equipamento); ⁵ Identificado por comparação com padrão comercial da Sigma-Aldrich.

Ao considerar todos os estudos apresentados anteriormente, ressalta-se que o emprego de métodos de extração diferentes entre si, como *HS-SPME* e hidrodestilação, teve por finalidade a caracterização dos COVs de *X. aromatica* atrelada a comparação de qual seria a técnica mais viável para a obtenção de um perfil químico mais completo. No entanto, não foi possível observar relações diretas entre as mesmas que tornasse possível a seleção de uma em detrimento da outra, uma vez que as extrações *in vivo* e *in vitro* por *HS-SPME* apresentaram um maior número de compostos identificados em relação à hidrodestilação, mas tem-se de considerar alguns fatores como: perda de analitos durante o pré-tratamento da matriz, em razão da volatilidade dos constituintes; e modo de extração diferente, visto que por *SPME* se extrai constituintes mais voláteis, enquanto pela hidrodestilação é possível extrair compostos menos voláteis, por empregar temperatura elevada. Assim, ambas as técnicas podem ser usadas, de forma a se complementarem, não sendo possível definir quais seria a técnica mais recomendada para o estudo do perfil químico de COVs.

5 - CONCLUSÃO

Os compostos voláteis das flores e folhas de *A. coriacea* foram caracterizados pela primeira vez através da análise por *HS-SPME*; por meio da associação destes dados com aqueles presentes na literatura sobre os COVs das folhas obtidos por hidrodestilação, observou-se que os sesquiterpenos foram os compostos majoritários, independente da técnica utilizada, mesmo considerando questões relacionadas à sazonalidade.

De maneira geral, as técnicas de extração utilizadas foram úteis para obter e caracterizar os compostos voláteis das flores de *X. aromatica*. No entanto, houve variações quali e quantitativa de compostos entre as técnicas utilizadas, o que é esperado devido ao processo de extração ser diferente. Com isso, foi possível observar que dependendo do objetivo da pesquisa ou do que se procura na fração volátil, faz-se necessária a utilização da técnica que dê os resultados mais promissores para a investigação realizada.

A investigação por *HS-SPME* nos modos *in vivo* e *in vitro* se mostraram condizentes por extrair os mesmo compostos; contudo pela extração *in vitro* obteve-se maior número de constituintes, pois a planta sofreu estresse por determinados fatores e estes podem ter influenciado na composição dos metabólitos secundários.

A Quimiometria corroborou com a análise dos dados, posto que através desta ferramenta obteve-se informações relevantes de dados químicos multivariados, e assim otimizou-se algumas condições em razão de maior número de compostos a serem obtidos.

Portanto, o estudo de *A. coriacea* e *X. aromatica* contribuiu para o conhecimento químico dos COVs destas espécies, visto que a partir destas investigações os mesmos podem ser aplicados em várias áreas industriais, como perfumaria, cosmético, alimentos, produtos de uso doméstico, dentre outros.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4^aed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 804p.
- ANDRADE, E.H.A.; SILVA, A.C.M.; CARREIRA, L.M.M.; OLIVEIRA, J. & MAIA, J.G.S. “Essential oil composition from leaf, fruit and flower of *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.” *J. Essent.Oil Bear. Pl.*, 7: 151, **2004**.
- AUGUSTO, F.; LOPES, A.L. & ZINI, C.A. “Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances”. *Trend.Anal. Chem.*, 22: 160, **2003**.
- AUGUSTO, F. & VALENTE, A.L.P. “Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples”. *Trend.Anal. Chem.*, 21: 428, **2002**.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. & IDAOMAR, M. “Biological effects of essential oils”. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 446, **2008**.
- BAPTISTELLA, L.H.B.; IMAMURA, P.M.; DE MELO, L.V. & CASTELLO, C. “Preparação do (+)- α -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental”. *Quim. Nova*, 32: 1069, **2009**.
- BELSITO, D.; BICKERS, D.; BRUZE, M.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J.M.; ROGERS, A.E.; SAURAT, J.H.; SIPES, I.G. & TAGAMI, H. “A toxicologic and dermatologic assessment of ionones when used as fragrance ingredients”. *Food Chem. Toxicol.*, 45: 130, **2007**.
- BICCHI, C.; DRIGO, S. & RUBIOLO, P. “Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants”. *J. Chromatogr., A*, 892: 469, **2000**.
- BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; & REZENDE, C.M. “Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas”. *Quim. Nova*, 32: 588, **2009**.
- BRO, R. & SMILDE, A.K. “Principal component analysis”. *Anal. Methods*. 6: 2812, **2014**.

BROKLA, M.; FAUCONNIER, M.L.; BENINI, C.; LOGNAY, G.; DU JARDIN, P. & FOCANT, J. "Improvement of ylang-ylang essential oil characterization by GC×GC-TOFMS". *Molecules*, 18: 1783, **2013**.

BUCHBAUER, G.; JÄGER, W.; GRUBER, A. & DIETRICH, H. "R-(+)- and S-(-)-Carvone: influence of chirality on locomotion activity in mice". *Flavour Fragr. J.*, 20: 686, **2005**.

CÁCERES, L.A.; MCDOWELL, T.W.; SCOTT, I.M. HANNOUFA, A.; MCGARVEY, B.D.; TIAN, L.; YENUNG, K.K.-C. & SUMARAH, M.W. "In vivo extraction of volatile organic compounds (VOCs) from micro-tom tomato flowers with multiple solid phase microextraction (SPME) fibers". *Can. J. Chem.*, 93: 8, **2015**.

CEVA-ANTUNES, P.M.N.; BIZZO, H.R.; SILVA, A.S.; CARVALHO, C.P.S.; ANTUNES, O.A.C. "Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME)". *LWT*, 39: 436, **2006**.

DAMASCENO, F.C. Microextração em Fase Sólida no Modo Headspace Aplicada ao Estudo de Substâncias Voláteis de Plantas Infestadas por Galhas Foliarens Entomógenas. Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Química - UFRGS, 2007. Dissertação de mestrado, 124 p.

FERREIRA, E.C.; RODRIGUES, S.H.B.G.; FERREIRA, M.M.C.; NÓBREGA, J.A. & NOGUEIRA, A.R.A. "Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva". *Eclat. Quim.*, 27: 1, **2002**.

FERREIRA, L.; PERESTRELO, R. & CÂMARA, J.S. "Comparative analysis of the volatile fraction from *Annona cherimola* Mill. cultivars by solid-phase microextraction and gas chromatography–quadrupole mass spectrometry detection". *Talanta*, 77: 1087, **2009**.

FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; CHARLES, B.; FOURNIAT, J.; LEBOEUF, M. & CAVÉ, A. "Chemical and biological studies of *Xylopia aromatica* stem bark and leaf oils". *Planta Med.*, 60: 283, **1994**.

FOURNIER, G.; LEBOEUF, M. & CAVÉ, A. "Annonaceae essential oils: a review". *J. Essent. Oil Res.*, 11, 131, **1999**.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N.P. "Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários". *Quim. Nova*, 30: 374, **2007**.

GOODRICH, K.R. "Floral scent in Annonaceae". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 169: 262, **2012**.

GOTTSBERGER, G. "Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona* spp. (*Annonaceae*) in Brazil". *Plant Syst. Evol.*, 167: 165, **1989**.

GOTTSBERGER, G. "Pollination and evolution in neotropical Annonaceae". *Plant Spec. Biol.*, 14: 143, **1999**.

HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. & RAHARISOLOLALAO, A. "Alcaloides des annonacees. Xxx.' Alcaloides de *Xylopia buxifolia* et de *Xylopia danguyella*. *J. Nat. Prod.*, 44: 551, **1981**.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.I.; CANHOS, D. A. C.; ALVES, D. A. & SARAIVA, A. M. Polinizadores do Brasil - Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. Edusp, São Paulo, 2012. 488p.

ITO, M.; MURAKAMI, K. & YOSHINO, M. “Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation”. *FoodChem. Toxicol.*, 43: 461, **2005**.

JACQUES, A.C. Amora-preta (*Rubusfruticosus*): Compostos Bioativos e Voláteis. Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPEL, 2012. Tese de doutorado, 98 p.

JANG, T.Y.; PARK, C.; KIM, K.; HEO, M. & KIM, Y.H. “Benzaldehyde suppresses murine allergic asthma and rhinitis”. *Int. Immunopharmacol.*, 22: 444, **2014**.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G. & NGASSOUM, M.B. “Essential oil compounds of the *Annonamuricata* fresh fruit pulp from Cameroon”. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3719, **1998**.

JURGENS, A.; WEBBER, A.C. & GOTTSBERGER, G. “Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips”. *Phytochemistry*, 55: 551, **2000**.

KJELDAHL, K. & BRO. R. “Some common misunderstandings in chemometrics”. *J. Chemometrics*, 24: 558, **2010**.

KUBOTA, T. Contribuição à Química dos Compostos Voláteis dos Frutos do Nordeste: *Hancornia speciosa* Gomes. São Cristovão, Núcleo de Pós-Graduação em Química - UFS, 2007. Dissertação de mestrado, 143 p.

LAGO, J.H.G.; JÚNIOR, P.A.; MORENO, P.R.H.; LIMBERGER, R.P.; APEL, M.A. & HENRIQUES, A.T. “Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopia aromatica* (Annonaceae)”. *Biochem. Systemat. Ecol.*, 31: 669, **2003**.

LAVINE, B. & WORKMAN-JÚNIOR, J.J. “Chemometrics”. *Anal. Chem.*, 76: 3365, **2004**.

LI, Z.; LEE, M. & SHEN, D. “Analysis of volatile compounds emitted from fresh *Syringa oblata* flowers in different florescence by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry”. *Anal. Chim. Acta*, 576: 43, **2006**.

LIU, Q.; SUN, G.; WANG, S.; LIN, Q.; ZHANG, J. & LI, X. “Analysis of the variation in scent components of *Hosta* flowers by HS-SPME and GC–MS”. *Sci. Hortic*, 175: 57, **2014**.

LORD, H. & PAWLISZYN, J. “Evolution of solid-phase microextraction technology”. *J. Chromatogr. A*, 885: 153, **2000**.

MACEDO, M. & FERREIRA, A.R. “Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso”. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 14: 40, **2004**.

- MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, A.C.M.; OLIVEIRA, J.; CARREIRA, L.M.M. & ARAÚJO, J.S. "Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopi*a species". *Flavour Fragr. J.*, 20: 474, **2005**.
- MARONI, B.C.; DI STASI, L.C. & MACHADO, S.R. Plantas medicinais do cerrado de Botucatu. UNESP, Botucatu, 2006. 36-37p.
- MITIĆ-ĆULAFIĆ, D.; ŽEGURA, B.; NIKOLIĆ, B.; B. J. VUKOVIĆ-GAČIĆ, B.; KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. & FILIPIĆ, M. "Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against *t*-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells". *Food and Chem. Toxicol.*, 47: 260, **2009**.
- MOHAMMADI, M.; NEZAMABADI, M.; BERNS, R.S.; TAPLIN, L.A. & CARLSON, C.F. "Spectral imaging target development based on hierarchical cluster analysis". *Col. Imag. Confer.*, 12: 59, **2004**.
- ÓLEOS ESSENCIAIS, 2015. Isolados naturais - <<http://www.oleosessenciais.org/>>. Acesso em: 28 janeiro 2015.
- PARK, S.J.; HONG, C.R. & CHOI, S.J. "Citral degradation in micellar structures formed with polyoxyethylene-type surfactants". *Food Chem.*, 170: 443, **2015**.
- PAWLISZYN, J. Applications of Solid Phase Microextraction. IN: MANI, V. Properties of commercial SPME coatings. The Royal Society of Chemistry, 1999. 57-72p.
- PAWLISZYN, J. "Theory of solid-phase microextraction". *J. Chromatogr. Sci.*, 38: 270, **2000**.
- PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; YOSHIZAKI, F.; BERTELLI, D. & ROSSI, M.C. "Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile compounds of *Evodia* species fruits". *J. Chromatogr. A.*, 1087:265, **2005**.
- PEREIRA FILHO, E.R. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. EDUFSCar, São Carlos, 2015. 436p.
- PINO, J.A.; BELLO, A.; URQUIOLA, A.; GARCIA, S. & ROSADO, A. "Leaf oil of *Xylopi*a *aromatica* (Lam.) Mart. from Cuba". *J. Essent. Oil Res.*, 12: 751, **2000**.
- RAGUSO, R. A.; "Wake up and smell the roses: the ecology and evolution". *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 39: 549, **2008**.
- SARPIETRO, M.G.; DI SOTTO, A.; ACCOLLA, M.L. & CASTELLI, F. "Interaction of β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide with phospholipid bilayers: Differential scanning calorimetry study". *Thermochim. Acta*, 600: 28, **2015**.
- SILVA, D. D.; CHIERICE, G.O.; GALHIANE, M.S.; CHAAR, J.S. & MOUCHREK-FILHO, V.E. "Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* korstermans utilizando uma nova coluna capilar POLYH4-MD em cromatografia gasosa". *Quim. Nova*, 26: 461, **2003**.
- SILVA, J.B. & ROCHA, A.B. "Oleorresina do fruto de *Xylopi*a *aromatica* (LAMARCK) MARTIUS". *Rev. Cien. Farm.*, 3: 33, **1981**.

SILVA, U.F.; BORBAC, E.L.; SEMIR, J. & MARSAIOLI, A.J. “A simple solid injection device for the analyses of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) volatiles”. *Phytochemistry*, 50: 31, **1999**.

SIQUEIRA, C.A.T.; OLIANI, J.; SARTORATTO, A.; QUEIROGA, C.L.; MORENO, P.R.H.; REIMÃO, J.Q.; TEMPONE, A.G. & FISCHER, D.C.H. “Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and *in vitro* antiprotozoal activity”. *Braz. J. Pharmacog.*, 21: 33, **2011**.

SOUZA, A.M.; & POPPI, R.J.; “Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I”. *Quim. Nova*, 1: 223, **2012**.

SOUZA, F.V.M.; DA ROCHA, M.B.; DE SOUZA, D.P. & MARÇAL, R.M. “(-)-Carvone: antispasmodic effect and mode of action”. *Fitoterapia*, 85: 20, **2013**.

SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.P.C. & LOPES, N.P. Farmacognosia coletânea científica. UFOP, Ouro Preto, 2012. 372p.

SPIETELUN, A.; MARCINKOWSKI, Ł.; GUARDIA, M. & NAMIEŚNIK, J. “Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry”. *J. Chromatogr. A*, 1321: 13, **2013**.

STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E. & MARTINEZ, J.R. “Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography”. *J. Chromatogr. A*, 1025: 105, **2004**.

TERRA DA GENTE, 2011. *Xylopia aromatica* <<http://redeglobo.globo.com/sp/eptv/terra-da-gente/platb/flora/pimenta-de-macaco-xylopia-aromatica/>> Acesso em: 03 fevereiro 2015.

WOLD, S.; ESBENSEN, K. & GELADI, P. “Principal Component Analysis”. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 2: 37, **1987**.

ZHANG, C.; QI, M.; SHAO, Q.; ZHOU, S. & FU, R. “Analysis of the volatile compounds in *Ligusticum chuanxiong* Hort. using HS-SPME-GC-MS”. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44: 464, **2007**.

ZHAO, H.; XIE, Y.; YANG, Q.; CAO, Y.; TU, H.; CAO, W. & WANG, S. “Pharmacokinetic study of cinnamaldehyde in rats by GC-MS after oral and intravenous administration”. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 89: 150, **2014**.

ZHU, F.; XU, J.; KE, Y.; HUANG, S.; ZENG, F. LUAN, T. & OUYANG, G. “Applications of *in vivo* and *in vitro* solid-phase microextraction techniques in plant analysis: A review”. *Anal. Chim. Acta*, 794: 1, **2013**.

CAPÍTULO 02

ESTUDO QUÍMICO DO CAULE E DAS

FOLHAS DE *Annona coriacea* Mart.

(Annonaceae)

RESUMO

CAPÍTULO 02: ESTUDO QUÍMICO DO CAULE E DAS FOLHAS DE *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) - O presente trabalho teve como objetivo principal a realização do estudo químico dos extratos etanólicos do caule e das folhas de *Annona coriacea*, na perspectiva de isolar os metabólitos secundários através de técnicas cromatográficas e elucidar por meio de RMN uni e bidimensional. Desta forma, estes extratos foram fracionados, por meio de técnicas cromatográficas, levando ao isolamento de duas substâncias, o ácido vanílico e o alcaloide liriodenina. Portanto, o estudo de *A. coriacea* contribuiu para o conhecimento químico desta espécie, visto que este é o primeiro relato desses metabólitos secundários para a espécie em estudo.

Palavras-chave: *Annona coriacea*; metabólitos secundários; alcaloide

ABSTRACT

CHAPTER 02: CHEMICAL STUDY OF THE STEM AND LEAVES OF *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) - The present work aimed to main carrying out the chemical study of the ethanol extract of the stem and leaves of *Annona coriacea* in the perspective to isolate the secondary metabolites through chromatographic techniques and elucidate by one- and two-dimensional NMR. This way, these extracts were fractionated by chromatographic techniques, leading to the isolation of two substances, vanillic acid and alkaloid liriodenine. Therefore, the study of *A. coriacea* contributed to the chemical knowledge of this specie, since this is the first report of these secondary metabolites for the specie under study.

Keywords: *Annona coriacea*; secondary metabolites; alkaloid

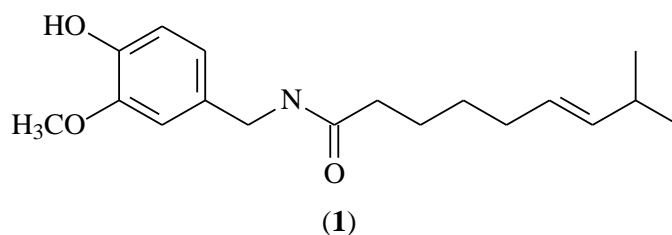
1 - INTRODUÇÃO

1.1 - PRODUTOS NATURAIS

A contribuição dos produtos naturais (PNs) para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos é incontestável, pois os mesmos foram a principal fonte de matéria-prima ao longo do século passado como resultado direto da diversidade química (MISHRA, TIWARI, 2011; SOUZA, MELLO, LOPES, 2012). Na década de 1990, cerca de 80% dos novos fármacos introduzidos na terapêutica eram de origem natural ou análogos sintéticos obtidos a partir de protótipos naturais, tais como Taxol[®] (antitumoral), ciclosporina (imunossupressor), artemisinina (antimalárico) e avermectina (antiparasitário) (SOUZA, MELLO, LOPES, 2012).

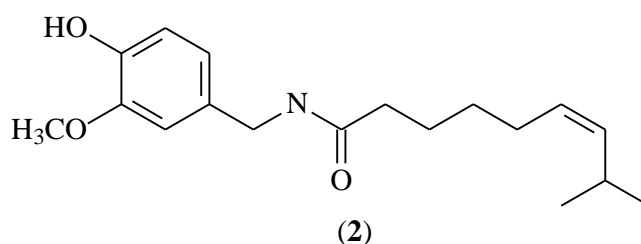
Um total de 25 medicamentos foi aprovado para comercialização a partir de janeiro de 2008 em todo o mundo, sendo que cinco destes são classificados como PNs, dez como semissintéticos de PNs e dez como medicamentos derivados de PNs, por exemplo, a capsaicina (**1**) (Figura 1.1) comumente encontrado em plantas do gênero *Capsicum* (Solanaceae), o qual foi lançada em 2009 como Qutenza[®] nos Estados Unidos pela indústria NeurogesX, contendo adesivos transdérmicos para tratar dores em determinadas regiões (BUTLER, ROBERTSON, COOPER, 2014).

FIGURA 1.1 - Estrutura química de capsaicina



A zucapsaicina (**2**) (Figura 1.2, p. 71), derivada do PN capsaicina (**1**), foi desenvolvida pela indústria farmacêutica Winston e aprovada no Canadá em julho de 2010, como Zuacta[®], para o tratamento de dores graves em adultos com osteoartrite no joelho (BUTLER, ROBERTSON, COOPER, 2014).

FIGURA 1.2 - Estrutura química de zucapsaicina



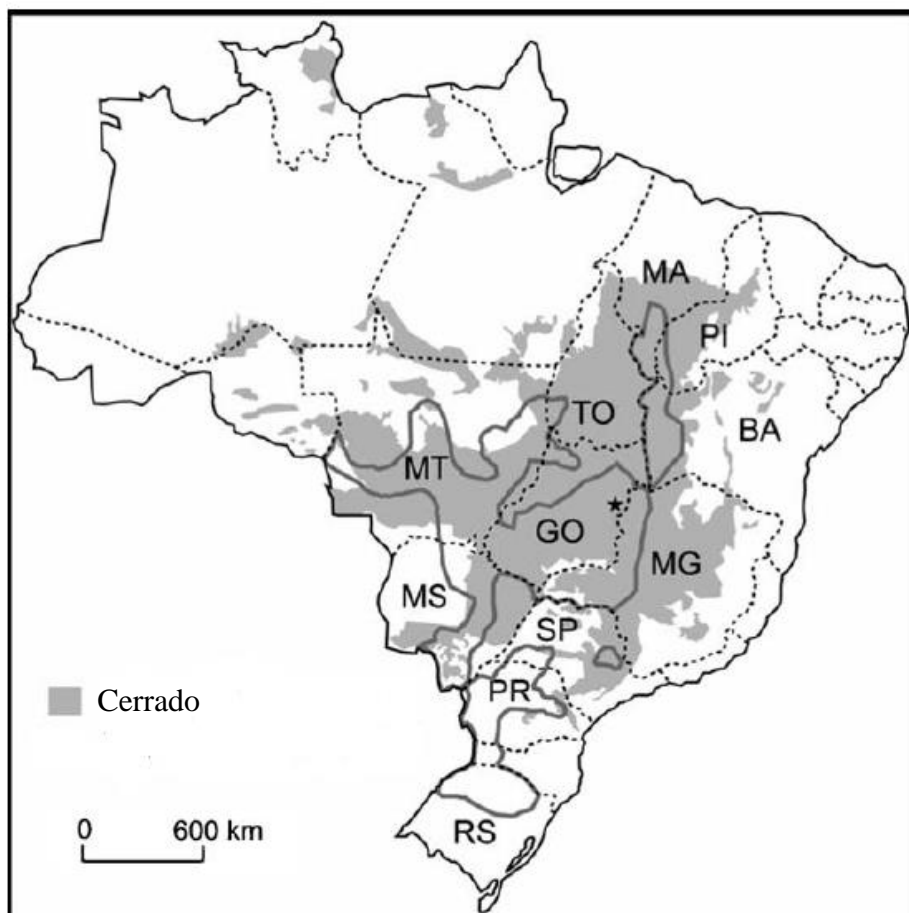
Os PNs oriundos de plantas são considerados fontes inesgotáveis de moléculas bioativas para a inovação farmacêutica, por causa de suas características singulares, incluindo diversidade estrutural e mecanismos de ação específicos. Por esse motivo, o Brasil como um dos maiores detentores da biodiversidade vegetal, em particular o Cerrado, torna-se muito promissor para identificação de plantas com potencial terapêutico e econômico. Desta forma, o estudo químico-biológico desta flora se faz necessário para a descoberta de novos medicamentos (SOUZA, MELLO, LOPES, 2012).

1.2 - O CERRADO

O Cerrado originalmente ocupava uma área de cerca de dois milhões de km², sendo o segundo maior domínio no Brasil; isto representava 23% em extensão territorial (RATTER, RIBEIRO, BRIDGEWATER, 1997). Ocupava a totalidade do Distrito Federal, mais da metade dos estados de Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Tocantins, Bahia Paraná e Piauí, além de porções em outros estados (BATLLE-BAYER, BATJES, BINDRABAN, 2010) (Figura 1.3, p. 72).

No entanto, até 2005, 55% da área original do Cerrado foi transformada em pastagens, culturas anuais (agricultura), áreas urbanas, dentre outros (KLINK, MACHADO, 2005); nos dias atuais esse valor provavelmente aumentou, posto que o Cerrado possui a menor porcentagem de áreas sobre proteção integral (MMA, 2015).

FIGURA 1.3 - O Cerrado brasileiro e suas regiões



Fonte: Modificado de BRANNSTROM, FILIPPI, 2008¹ *apud* BATTLE-BAYER, BATJES, BINDRABAN, 2010

Do ponto de vista da diversidade biológica, o Cerrado possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo, com nível elevado de endemismo, abrigoando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas (KLINK, MACHADO, 2005; MMA, 2015). Por isso, é considerado um dos 35 *hotspots* mundiais prioritários para preservação da biodiversidade. Entende-se por *hotspots* áreas que concentram um grande número de espécies e endemismo; além disso, outro fator é a perda de 70% ou mais da vegetação primária (GORENFLO et al., 2012; MYERS et al., 2000; SOUZA, MELO, LOPES, 2012).

A biodiversidade, definida como a variedade e a variabilidade existente entre os organismos vivos do planeta, está presente no Cerrado especialmente por espécies vegetais, sendo reconhecida como uma importante fonte de riqueza e potencial

¹ BRANNSTROM, C. & FILIPPI, A.M. “Remote classification of Cerrado (Savanna) and agricultural land covers in northeastern Brazil”. *Geocarto Int.* 23: 109, 2008

etnofarmacológico e químico para a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos (SOUZA, MELO, LOPES, 2012).

1.3 - A FAMÍLIA Annonaceae

Há relatos de inúmeras espécies desta família que são usadas na medicina popular para diversos fins, além da ampla diversidade de compostos químicos, tais como: acetogeninas, alcaloides, aminoácidos, carboidratos, carotenoides, esteroides, flavonoides, lignanas, lipídeos, óleos essenciais, proteínas, saponinas, taninos, terpenos/oides e vitaminas (LEBOEUF et al., 1982; ALALI, LIU, MCLAUGHLIN, 1999).

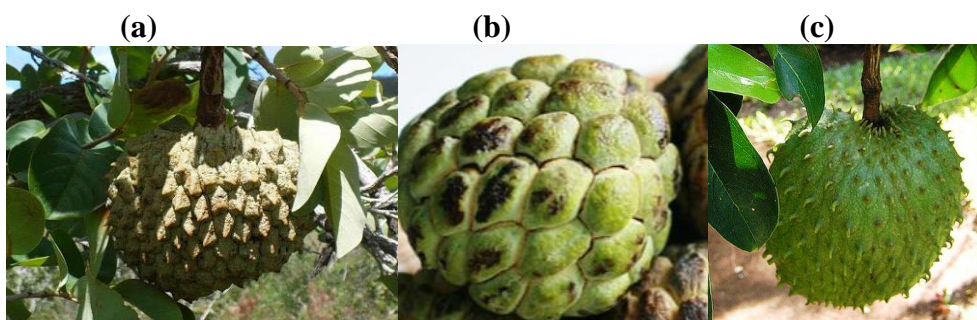
A Annonaceae é uma família com distribuição predominantemente tropical, que inclui aproximadamente 130 gêneros e 2200 espécies. No Brasil, ocorrem 33 gêneros e cerca de 250 espécies (LEBOEUF et al., 1982; SOUZA, LORENZI, 2008). Economicamente, o gênero *Annona* é o mais importante da família Annonaceae devido aos seus frutos comestíveis, propriedades medicinais, além de suas espécies serem usadas para o tratamento de várias doenças na medicina tradicional (SANTOS, SANT'ANA, 2001; VENDRAMIN et al., 2013

1.4 - O GÊNERO *Annona*

O nome do gênero *Annona*, descrito por Carl Linnaeus, deriva de *Anon*, nome popular da planta no Haiti que significa colheita do ano. Este gênero inclui aproximadamente 140 espécies tropicais, sendo várias nativas. Algumas são conhecidas popularmente por araticum (*A. crassiflora*), fruta-do-conde (*A. squamosa*), graviola (*A. muricata*) (Figura 1.4, p. 74), dentre outras.

O principal valor econômico das espécies deste gênero se dá pelo fornecimento de frutos comestíveis, os quais são amplamente consumidos, especialmente na produção de sucos, sorvetes e geleias (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002).

FIGURA 1.4 - Frutos de **(a)** *A. crassiflora*, **(b)** *A. squamosa* e **(c)** *A. muricata*



Fonte: **(a)** CARPOTECA, 2015; **(b)** REMÉDIO CASEIRO, 2015; **(c)** ETSY, 2015

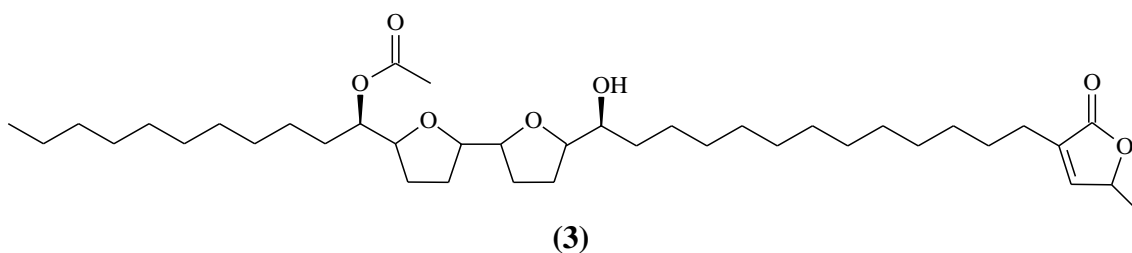
A flora do Brasil é rica em plantas da família Annonaceae, e muitos extratos de *Annona* mostraram propriedades biológicas, tais como anti-inflamatória, antitumoral, inseticida, antiparasitária e antibiótica (MESQUITA et al., 2007).

Por meio de estudos químicos das espécies do gênero *Annona* encontrou-se uma variedade de compostos químicos, pertencentes à diferentes classes de metabólitos secundários, tais como: acetogeninas (ALVES et al., 2014; QUEIROZ et al., 1999), alcaloides (COSTA et al., 2006), diterpenos/oides (MATSUMOTO et al., 2014), esteroides (DUTRA et al., 2014), flavonoides (VEGA et al., 2007), monoterpenos/oides (LEBOEUF et al., 1982; SIQUEIRA, 2010) e sesquiterpenos/oides (DUTRA et al., 2014).

1.4.1 - Acetogeninas

As acetogeninas constituem uma classe de PNs isolada exclusivamente de espécies pertencentes à família Annonaceae (BERMEJO et al., 2005). Com a descoberta de uvaricina (**3**) (Figura 1.5, p. 75), primeira acetogenina isolada em 1982 a partir do extrato etanólico das raízes de *Uvaria acuminata*, conjuntamente com a sua atividade antileucêmica *in vivo* expressiva, revigorou ainda mais o interesse por esta família. Antes de 1982, a maior parte das investigações era voltada aos alcaloides isoquinolínicos desta família (ALALI, LIU, MCLAUGHLIN, 1999).

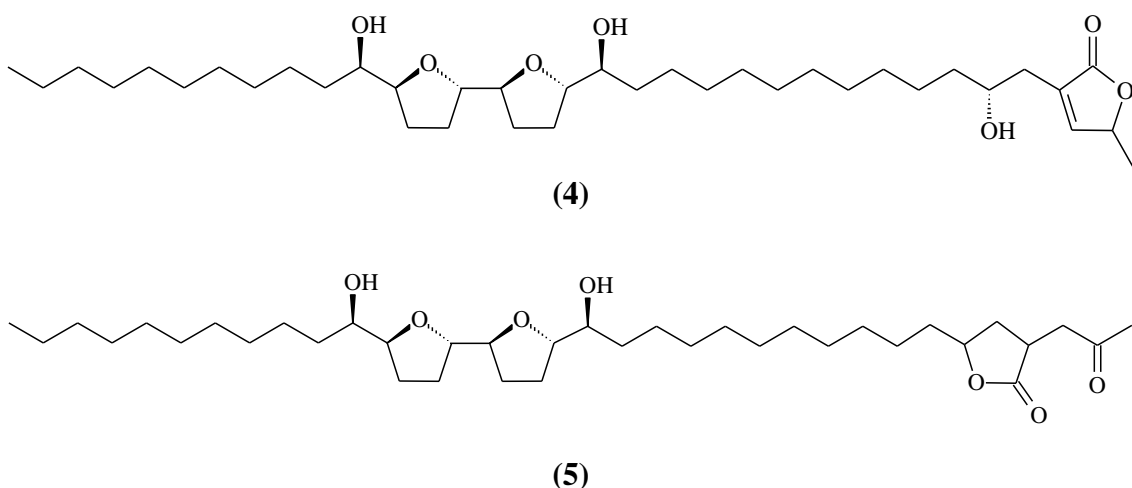
FIGURA 1.5 - Estrutura química de uvaricina



A bulatacina (**4**) (Figura 1.6), isolada a partir de plantas da família Annonaceae, e seu análogo bulatacinona (**5**) mostraram potencial *in vivo* como agentes antitumorais, com base em testes realizados em células leucêmicas L1210 e carcinoma do ovário A2780.

Além disso, estes compostos têm um potencial relevante como inseticidas; a toxicidade, nos casos em estudo, supostamente decorre da forte inibição do transporte de elétrons mitocondrial, com ação específica no complexo I (AHAMMADSAHIB et al., 1993). No entanto, a ausência de um modelo estrutural completo do sítio de ligação do inibidor do complexo I dificulta a previsão do potencial para novas moléculas de acetogeninas (CHEN, CHEN, LI, 2011).

FIGURA 1.6 - Estruturas químicas da bulatacina (**4**) e bulatacinona (**5**)



As acetogeninas são moléculas que têm atraído muita atenção, devido às diversas atividades biológicas relatadas, por exemplo, anti-helmíntica *in vivo*,

antioxidante, antiparasitária, antitumoral, antimicrobiana, citotóxica, imunossupressora e pesticida.

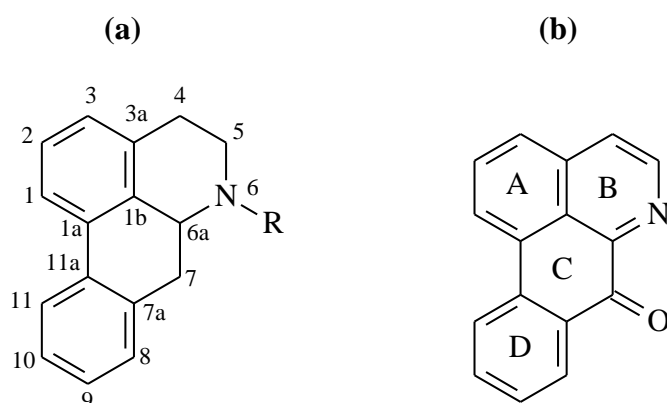
Neste contexto, as acetogeninas tornam-se uma fonte promissora para modelos biológicos, principalmente para agentes antitumorais e pesticidas (ALALI, LIU, MCLAUGHLIN, 1999; BERMEJO et al., 2005; LIMA, PIMENTA, BOAVENTURA, 2010).

1.4.2 - Alcaloides

Os alcaloides são metabólitos secundários abundantes em plantas e representam uma das classes mais amplas de compostos com várias propriedades farmacológicas. A classe dos aporfínicos (ou aporfinoídes), derivados do núcleo isoquinolínico, caracteriza-se por apresentar esqueleto aporfínico (Figura 1.7a) e um de seus subgrupos, o oxoaporfínico (Figura 1.7b), possui esqueleto totalmente aromático e com presença de grupo carbonílico em C-7.

São largamente encontrados em um grande número de famílias, tais como Annonaceae, Lauraceae, Monimiaceae, Menispermaceae, Hernandiaceae e Ranunculaceae (STÉVIGNY, BAILLY, QUETIN-LECLERCQ, 2005; SILVA et al., 2007).

FIGURA 1.7 - Estruturas básicas dos esqueletos de alcaloides: **(a)** aporfínicos e **(b)** oxoaporfínicos

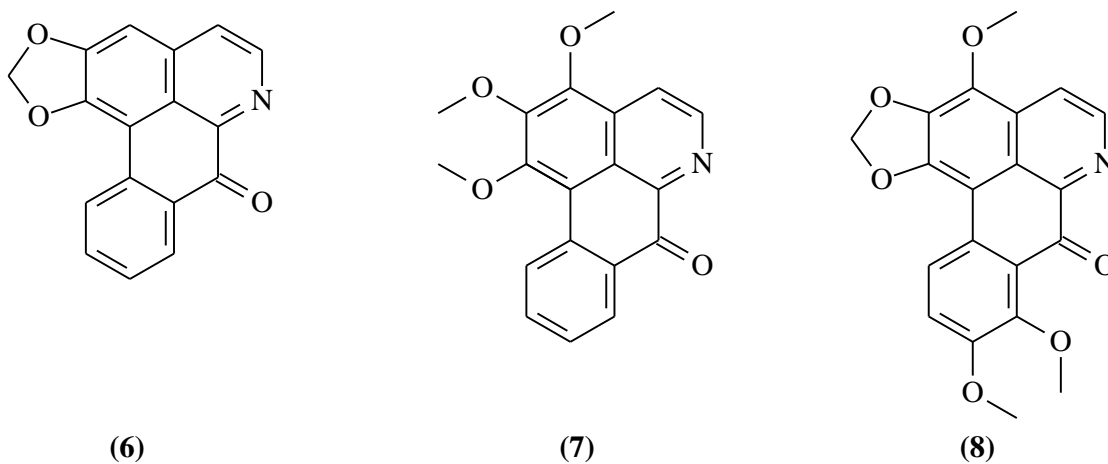


A relação estrutura-atividade dos alcaloides aporfínicos normalmente envolve o padrão de substituição, principalmente os oxoaporfínicos, pois a planaridade da molécula em relação aos demais é notória, visto que mesma acontece em função da

presença da carbonila em C-7, a qual favorece a extensão da conjugação no sistema aporfínico.

O efeito citotóxico dos alcaloides lirioidenina (6) e *O*-metilmoscatolina (7) foram avaliados em células Hep₂ (carcinoma de laringe) e foram obtidos valores de CI₅₀ de 44,3 e 12,4 μM, respectivamente (SILVA et al., 2007). A kuafumina (8), um alcaloide oxoaporfínico isolado de *Fissistigma glaucescens* (Annonaceae), demonstrou citotoxicidade *in vitro* expressiva frente à células KB (carcinoma de epidermoide) (CI₅₀ de 0,5 μM) (Figura 1.8) (STÉVIGNY, BAILLY, QUETIN-LECLERCQ, 2005).

FIGURA 1.8 - Estruturas químicas de (6) lirioidenina, (7) *O*-metilmoscatolina e (8) kuafumina



Um número muito grande de alcaloides aporfínicos isolados ou obtidos por síntese total apresentaram atividade contra linhagens de células tumorais *in vitro* e há indicações de atividades anti-câncer *in vivo*. Porém, com a falta de conhecimento consistente do mecanismo de ação destes compostos há dificuldade no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de câncer. Além desta atividade, estes alcaloides também apresentam propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes (STÉVIGNY, BAILLY, QUETIN-LECLERCQ, 2005; SILVA et al., 2007; COSTA et al., 2010).

1.5 - *Annona coriacea* Mart.

A *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae), popularmente conhecida como araticum, araticum-liso, araticum-do-campo e marolo (Figura 1.9, p. 78), tem ocorrência

no Cerrado da Bahia até São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul (LORENZI, 2002). A literatura etnofarmacológica registra várias propriedades medicinais de suas folhas como medicação, tais como carminativa, estomáquica, anti-reumática e anti-helmíntica por via oral e, externamente, em compressas e bochechos, no tratamento de estomatite, nevralgias e cefaleias, bem como, na forma de cataplasma em furúnculos e úlceras para induzir a supuração (LORENZI, MATOS, 2008).

As folhas são aplicadas sobre ferimentos e úlceras, para evitar o ataque de insetos e suas larvas. As sementes trituradas são tóxicas e consideradas como um meio eficiente para eliminação de piolhos e outros exoparasitas, devendo-se evitar seu contato com os olhos pelo risco de causar cegueira. Suas raízes são consideradas purgativas, porém raramente são utilizadas (LORENZI, MATOS, 2008).

FIGURA 1.9 - Espécie de *A. coriacea*, com sua flor, situada nas dependências da UFG/RC



Fonte: Elaborada pelo autor

Do ponto de vista químico, existem alguns estudos da espécie *A. coriacea*, os quais estão descritos nas Tabelas 1.1, 1.2 e 1.3 (p. 79 - 86).

TABELA 1.1 - Diterpenoides isolados de *A. coriacea*

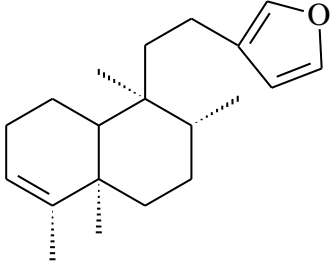
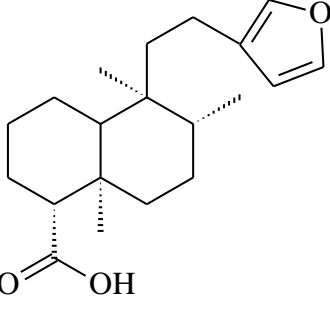
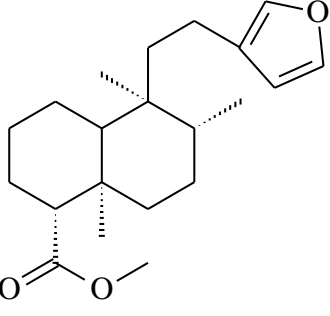
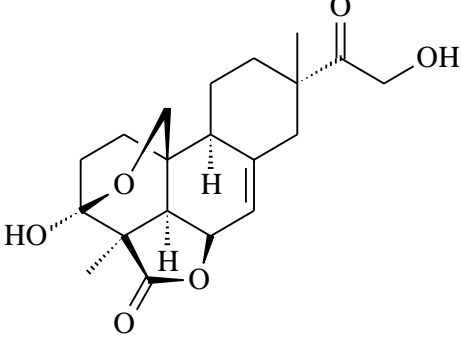
Diterpenoides	Parte do Vegetal	Referência
 <p>(9)</p>	bulbo	FERRARI, PELIZZONI, FERRARI, 1971
 <p>(10)</p>		
 <p>(11)</p>		
 <p>(12)</p>		MUSSINI et al., 1973

TABELA 1.2 - Acetogeninas isoladas de *A.coriacea*

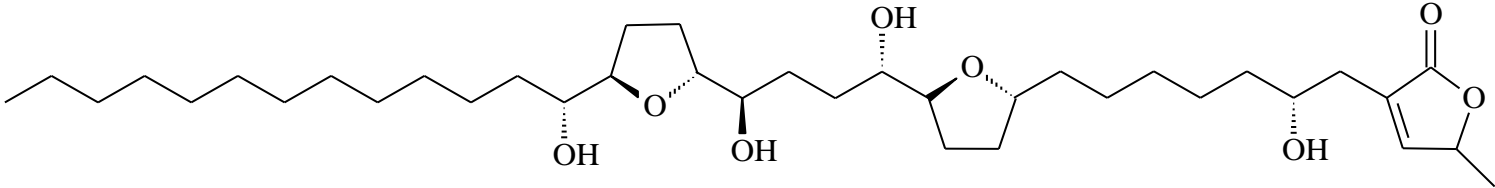
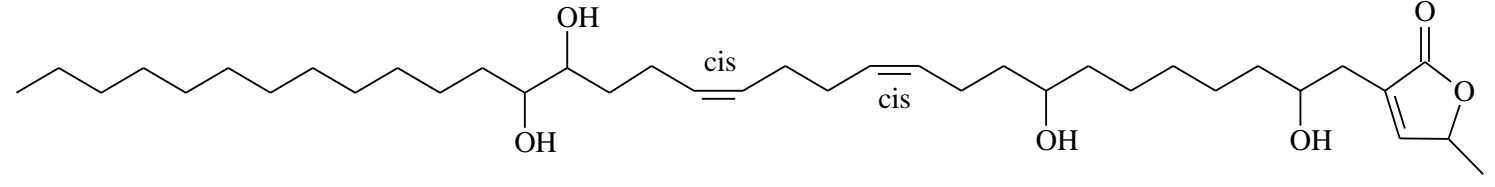
Acetogeninas	Parte do Vegetal	Referência
 <p style="text-align: center;">(13) gigantecina</p>	sementes	YU et al., 1994
 <p style="text-align: center;">(14) coriadienina</p>	raiz	SILVA et al., 1996

TABELA 1.2 - Acetogeninas isoladas de *A. coriacea*

(continuação)

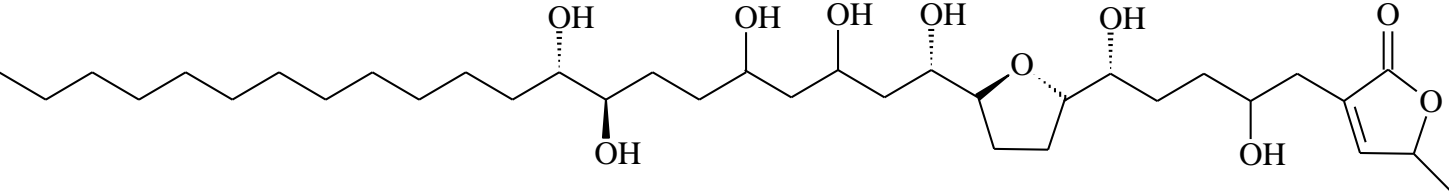
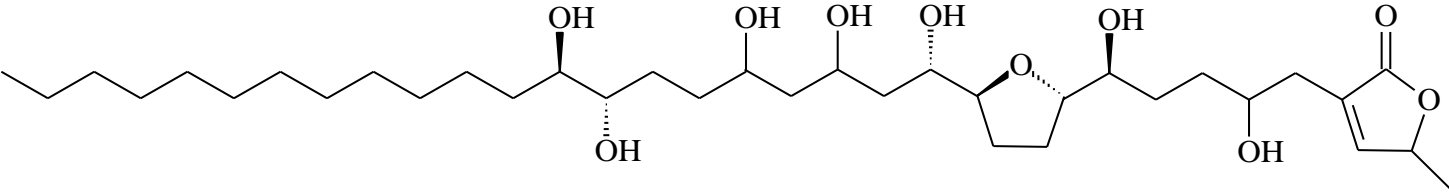
Acetogeninas	Parte do Vegetal	Referência
 <p>(15) coriaheptocina A</p>	raiz	et al., 1997
 <p>(16) coriaheptocina B</p>		

TABELA 1.2 - Acetogeninas isoladas de *A. coriacea*

(continuação)

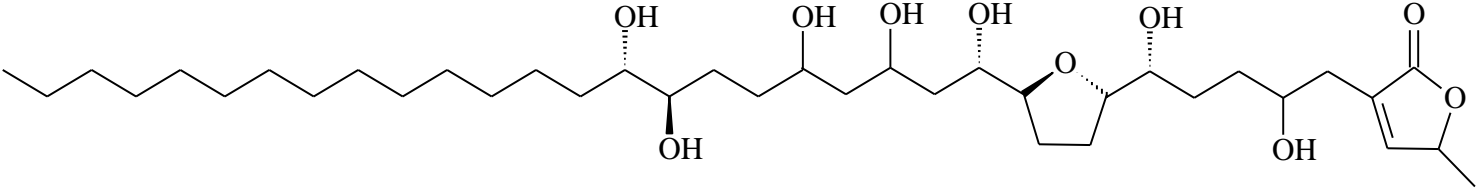
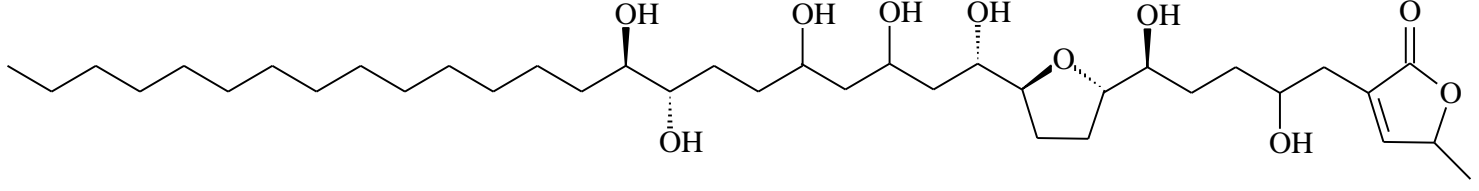
Acetogeninas	Parte do Vegetal	Referência
 <p>(17) annoheptocina A</p>	raiz	SILVA et al., 1998
 <p>(18) annoheptocina B</p>		

TABELA 1.2 - Acetogeninas isoladas de *A. coriacea*

(continuação)

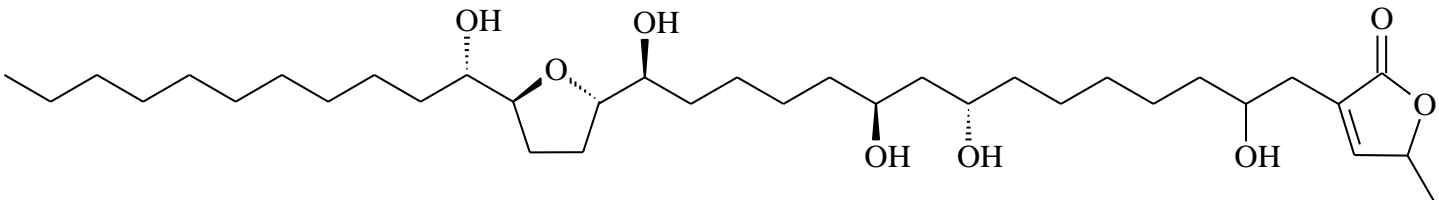
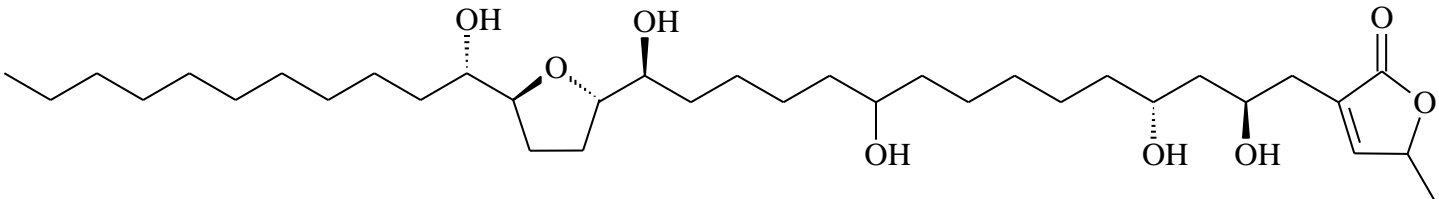
Acetogeninas	Parte do Vegetal	Referência
 <p style="text-align: center;">(19) coriapentocina A</p>	semente	ALVES et al., 2014
 <p style="text-align: center;">(20) coriapentocina B</p>		

TABELA 1.2 - Acetogeninas isoladas de *A. coriacea*

(conclusão)

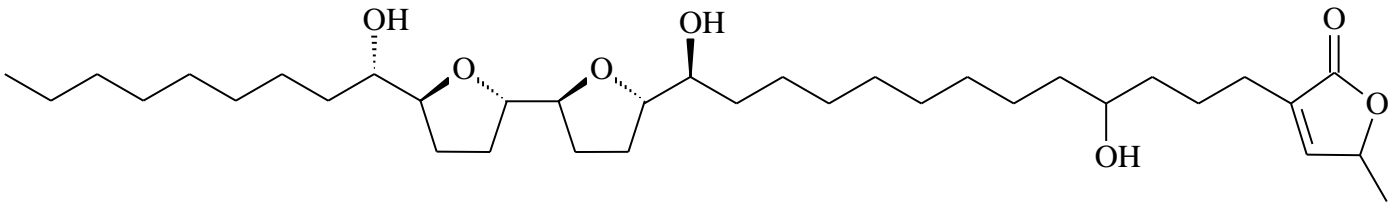
Acetogeninas	Parte do Vegetal	Referência
 <p style="text-align: center;">(21) bulacina</p>	semente	ALVES et al., 2014

TABELA 1.3 - Alcaloides identificados de *A. coriacea*

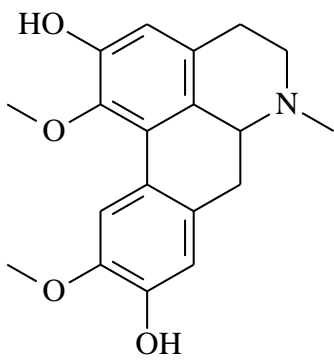
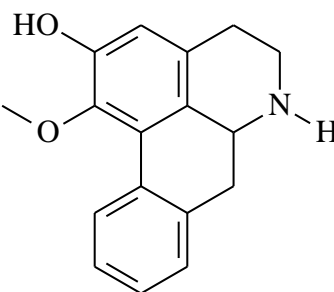
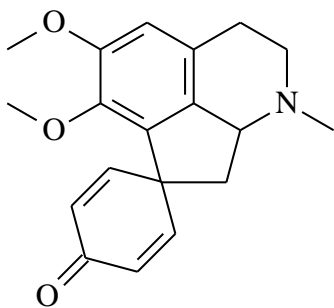
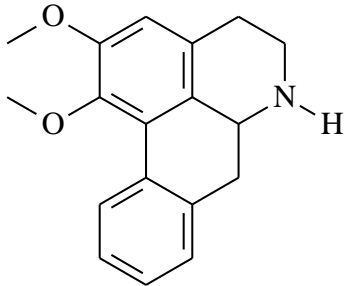
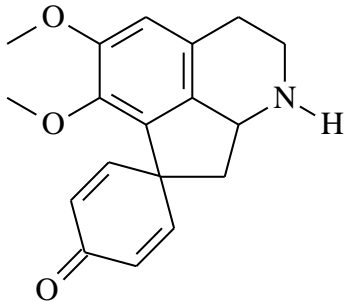
Alcaloides	Parte do Vegetal	Referência
 <p>(22) boldina</p>		
 <p>(23) asimilobina</p>	caule	SIQUEIRA, 2010
 <p>(24) pronuciferina</p>		

TABELA 1.3 - Alcaloides identificados de *A.coriacea*

(conclusão)

Alcaloides	Parte do Vegetal	Referência
 <p>(25) nornuciferina</p>	folha	SIQUEIRA, 2010
 <p>(26) estefarina</p>		

De acordo com o descrito anteriormente, a caracterização química de *A. coriacea* se faz importante, visando ampliar o conhecimento das classes de metabólitos secundários produzidos pela mesma.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar o estudo químico dos extratos etanólicos do caule e das folhas de *A. coriacea*, na perspectiva de isolar e identificar os metabólitos secundários.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Fracionar os extratos etanólicos do caule e das folhas de *A. coriacea*, por meio de técnicas cromatográficas;
- Elucidar estruturalmente as substâncias isoladas, utilizando-se técnicas de RMN uni e bidimensional.

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 - Fases Estacionárias

Cromatografia em Pressão Atmosférica (CPA):

- Sílica gel 60 (70-230 *mesh*), denominada sílica comum, marca Macharey-Nagel;
- Sílica gel 60 (230-400 *mesh*), denominada sílica do tipo *flash*, marca Macharey-Nagel;
- *Sephadex* LH-20, marcas Sigma-Aldrich e Amershan Pharmacia Biotech®;
- Cartucho de *SPE* (*SiliaPrep*TM C₁₈, 500 mg/6 mL), marca SiliCycle® Inc.

Cromatografia em Camada Delgada (CCD):

- Sílica gel 60 com F₂₄₅ ($\Phi = 0,2$ mm), em folhas de alumínio, marcas Whatman e Fluka.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

- C₁₈ Luna (100 Å e 10 μ m) 15 x 0,46 cm;
- C₁₈ Luna (100 Å e 10 μ m) 25 x 0,7 cm.

3.1.2 - Solventes

Eluentes para cromatografia:

- Hexano, acetato de etila, diclorometano, acetona e metanol grau P.A., marcas Química Araguaya, Panreac e Synth[®];
- Água deionizada, ácido acético, metanol e acetonitrila grau HPLC, marca Panreac e J. T. Baker;
- Clorofórmio e metanol deuterados, marcas (Sigma-Aldrich e Merck), utilizados para a obtenção dos espectros de RMN.

3.1.3 - Reveladores:

- Solução ácida de vanilina, preparada a partir da dissolução de 3,0 g de vanilina em solução contendo 135 mL de H₂O destilada, 135 mL de MeOH e 5 mL de H₂SO₄ (concentrado);
- Solução de *Dragendorff* preparada a partir de 1 mL de solução estoque do reagente com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água destilada.

3.1.4 - Equipamentos

- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz no comprimento de onda de 254 e 365 nm, marca Spectroline[®], modelo CM-10.
- Balança analítica: OHAUS AR2140
- Banho de ultra-som, marca Branson 2510E - MTH.
- Estufa de secagem, marca Nova Ética.
- Evaporador rotativo, marca FISATOM, modelo 801, com banho de aquecimento IKA HB 05.06 CN e bomba de vácuo da marca Vacuubrand, modelo ME-1C.

- Liofilizador, marca Labconco, modelo *FreeZone* 4.5 L.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência: sistema analítico, marca Agilent, modelo 1260 *Infinity*, bomba quaternária, com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor manual e software *EZChromEdition*.
- Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear, sendo um da marca Bruker, modelo AVANCE III, 14,1 Tesla (600 MHz para frequência de ^1H), cujos experimentos foram realizados sob colaboração do Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP; e o outro da marca Bruker, modelo Avance III, 11,75 Tesla (500 MHz para frequência de ^1H), cujos experimentos foram realizados sob colaboração com o Prof. Dr. Luciano Morais Lião do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Goiânia - GO.

3.2 - METODOLOGIA DO ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DO CAULE E DAS FOLHAS DE *A. coriacea*

3.2.1 - Coleta do Material Vegetal

O caule e as folhas de *A. coriacea* foram coletados em 2013, nas dependências da Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão (UFG/RC), município de Catalão - GO. Os dados e as coordenadas da coleta (GPS: S18°09'16.4"; W47°55'43.2") foram armazenados. Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Helder Nagai Consolaro (Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia - UFG/RC), o qual realizou a identificação do material vegetal e a catalogação do mesmo. Os espécimes testemunhos foram depositados no Laboratório Integrado de Zoologia, Ecologia e Botânica (LIZEB) na UFG/RC, sob número 47919.

3.2.2 - Obtenção dos Extratos

As partes vegetais (caule e folhas) de *A. coriacea* foram secas separadamente em estufa de circulação a 45°C, moídas e submetidas à maceração com

etanol, em repouso e à temperatura ambiente, para extração de metabólitos secundários. O período de extração perpassou-se vinte e um dias, efetuando-se a troca do solvente a cada sete dias. Após a filtração, foi realizada a evaporação do solvente em evaporador rotativo, a baixa pressão, obtendo-se o extrato etanólico para cada parte vegetal. As massas das partes vegetais e dos extratos obtidos estão descritas na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 - Massa obtida do material vegetal e extrato

Parte vegetal	Código do extrato	Material seco (g)	Extrato etanólico (g)	Rendimento (%)
Folhas	EEF ^a	619,1	57,5	9,2
Caule	EEC ^b	956,1	6,7	0,7

^aEEF - Extrato etanólico das folhas

^bEEC - Extrato etanólico do caule

3.2.3 - Extração Líquido-Líquido de EEF e EEC

Os extratos EEF e EEC foram solubilizados em uma mistura composta por metanol e água (400 mL, 3:7 v/v) e submetidos à extração líquido-líquido (ELL) com hexano (300 mL) e acetato de etila (300 mL), repetindo o processo por três vezes. Os solventes foram evaporados em evaporador rotativo de baixa pressão, obtendo-se as frações hexano (H), acetato de etila (A) e hidroalcoólica (W). Na Tabela 3.2 são apresentadas as massas das frações.

TABELA 3.2 - Massa obtida para as frações dos diferentes extratos

Parte vegetal	Fração	Código	Massa (g)
Folha	Hexano	FHF ^a	12,3
	acetato de etila	FAF ^b	20,5
	hidroalcoólica	FWF ^c	5,0
Caule	hexano	FHC ^d	0,01
	acetato de etila	FAC ^e	0,6
	hidroalcoólica	FWC ^f	1,2

^aFHF - Fração hexano das folhas

^bFAF - Fração acetato de etila das folhas

^cFWF - Fração hidroalcoólica das folhas

^dFHC - Fração hexano do caule

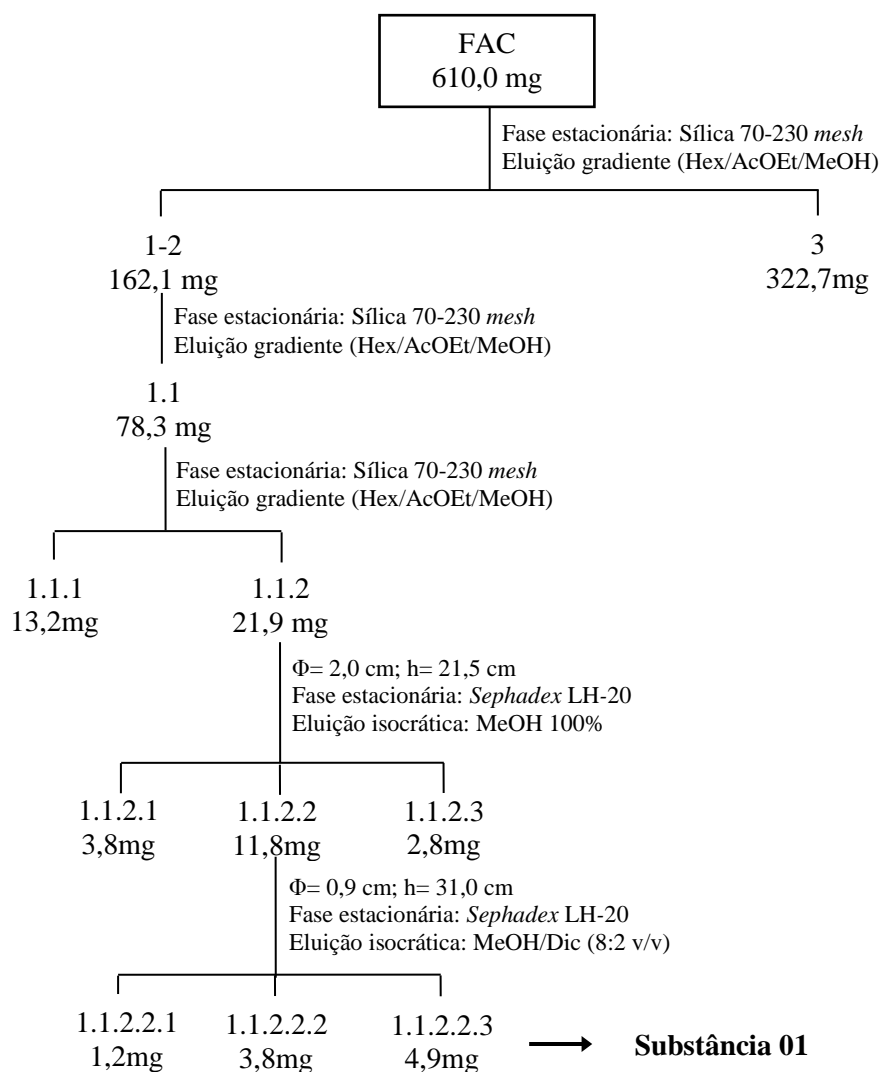
^eFAC - Fração acetato de etila do caule

^fFWC - Fração hidroalcoólica do caule

3.2.4 - Fracionamento Cromatográfico da Fração Acetato de Etila do Caule (FAC) de *A. coriacea*

A FAC (610,0 mg) foi fracionada utilizando cromatografia em pressão atmosférica (CPA) e sistema de eluição gradiente (Hex/AcOEt/MeOH), sendo as frações oriundas deste fracionamento submetidas à CCD e agrupadas de acordo com as similaridades químicas (Figura 3.1). A partir deste procedimento isolou-se a substância ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) (**Substância 01**).

FIGURA 3.1 - Fluxograma do fracionamento da FAC



3.2.5 - Fracionamento Cromatográfico da Fração Acetato de Etila das Folhas (FAF) de *A. coriacea*

A fração FAF (20,46 g) foi submetida à CPA, utilizando sílica gel (70-230 *mesh*) como fase estacionária e modo gradiente de eluição (Hex/AcOEt/MeOH). Após o fracionamento, as amostras foram analisadas por CCD utilizando três diferentes sistemas de solventes: a) Hex/AcOEt (6:4 v/v); b) AcOEt (100%) e c) AcOEt/MeOH (1:1 v/v) e reveladas com solução ácida de vanilina. De acordo com as características apresentadas por meio de CCD, a fração cinco foi submetida à cromatografia por exclusão (CE), empregando como fase estacionária *Sephadex* LH-20 e modo isocrático de eluição, empregando MeOH. Posteriormente, foi realizado experimento de RMN de ^1H da fração 5.4, em que se observou sinais referentes à classe dos alcaloides.

Desta forma, a fração 5.4 foi pré-purificada empregando-se o seguinte procedimento: o preparo da amostra para injeção no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) foi realizado através de um cartucho de *SPE*, com fase estacionária C_{18} , originando a fração 5.4.1. Para a análise via CLAE, 1,0 mg de amostra foi solubilizada em 1 mL de MeOH e injetada no *loop* de 50 μL . Utilizou-se uma coluna de C_{18} Luna (100 Å e 10 μm - $\Phi = 0,46$ cm; h =15,0 cm), com gradiente de eluição de acordo com a Tabela 3.3, e detector DAD na região de 264 e 365 nm. O procedimento cromatográfico com gradiente exploratório foi adaptado daquele adotado por CHEN, ZUO, DENG (2001).

TABELA 3.3 - Eluição gradiente empregado no modo analítico

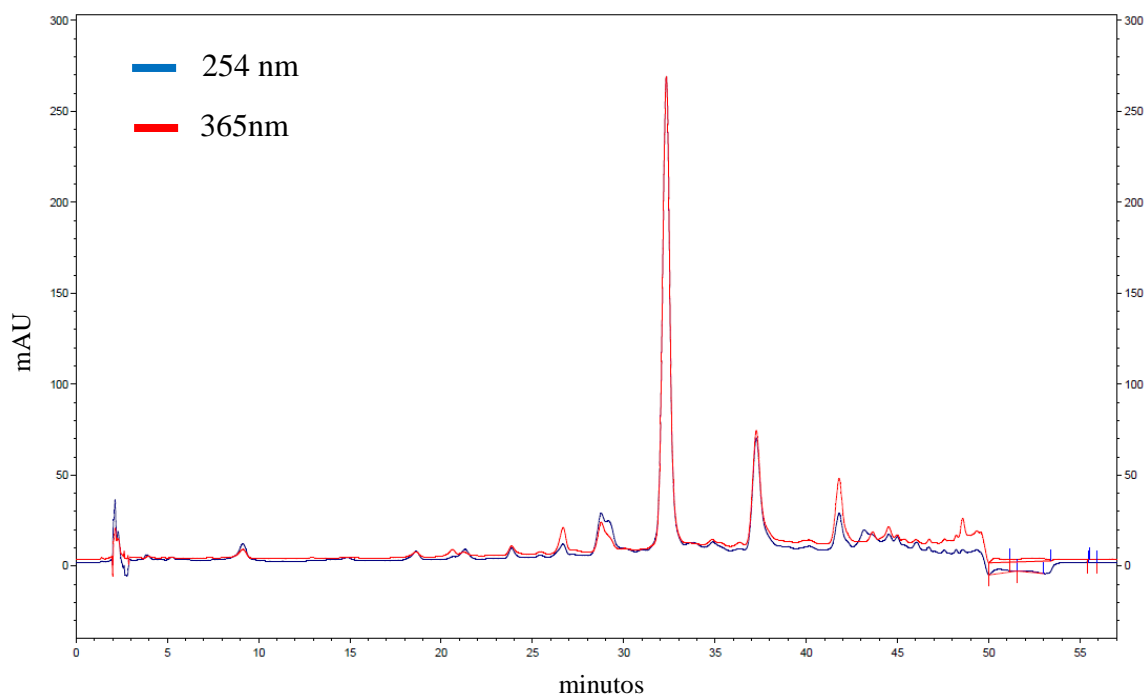
tempo (min)	A ¹ [%]	B ² [%]	vazão (mL/min)
0	100	0	0,90
10	90	10	1,00
25	60	40	1,00
40	30	70	0,90
47	0	100	0,90
50	100	0	0,90
55	100	0	0,90

¹solvente A: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (97:3 v/v); ²solvente B: CH_3OH

Fonte: Modificado de CHEN, ZUO, DENG, 2001

O cromatograma obtido da análise está ilustrado na Figura 3.2, em que se observou a presença de um pico majoritário e outros picos com menor intensidade.

FIGURA 3.2 - Cromatograma da fração 5.4.1 obtido por CLAE no modo analítico



Condições analíticas: Eluição gradiente descrita na Tabela 3.3, p. 91; C_{18} Luna (100 Å e 10 μm - h: 15,0 cm x Φ : 0,46 cm); volume de injeção e *loop*: 50 μL .

Com o propósito de realizar a separação do composto majoritário da fração 5.4.1, usou-se a coluna semi-preparativa C_{18} Luna (100 Å e 10 μm - $\Phi = 0,70$ cm; h = 25,0 cm) com gradiente de eluição apresentado na Tabela 3.4 (p. 94) e detecção em 254 e 365 nm. Uma alíquota de 4,0 mg de amostra foi solubilizada em 300 μL de metanol e injetada no *loop* de 200 μL . O cromatograma obtido da análise é mostrado na Figura 3.3, p. 94.

A partir do procedimento apresentado, isolou-se a substância liriodenina (**Substância 02**), correspondente ao pico com tempo de retenção de 33,5 min (Figura 3.4, p. 95).

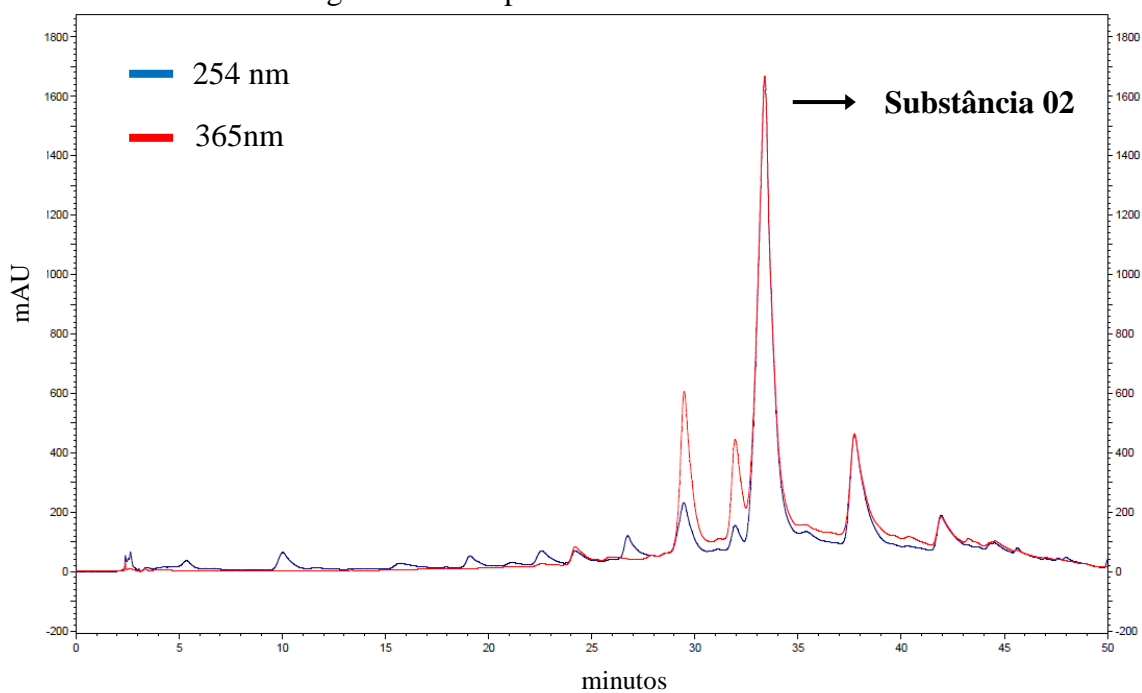
TABELA 3.4 - Eluição gradiente empregada no modo analítico

tempo (min)	A ¹ [%]	B ² [%]	vazão (mL/min)
0	100	0	3,60
10	90	10	4,00
25	60	40	4,00
40	30	70	4,90
47	0	100	3,60
50	100	0	3,60
55	100	0	3,60

¹solvente A: H₂O/CH₃COOH (97:3 v/v); ²solvente B: CH₃OH

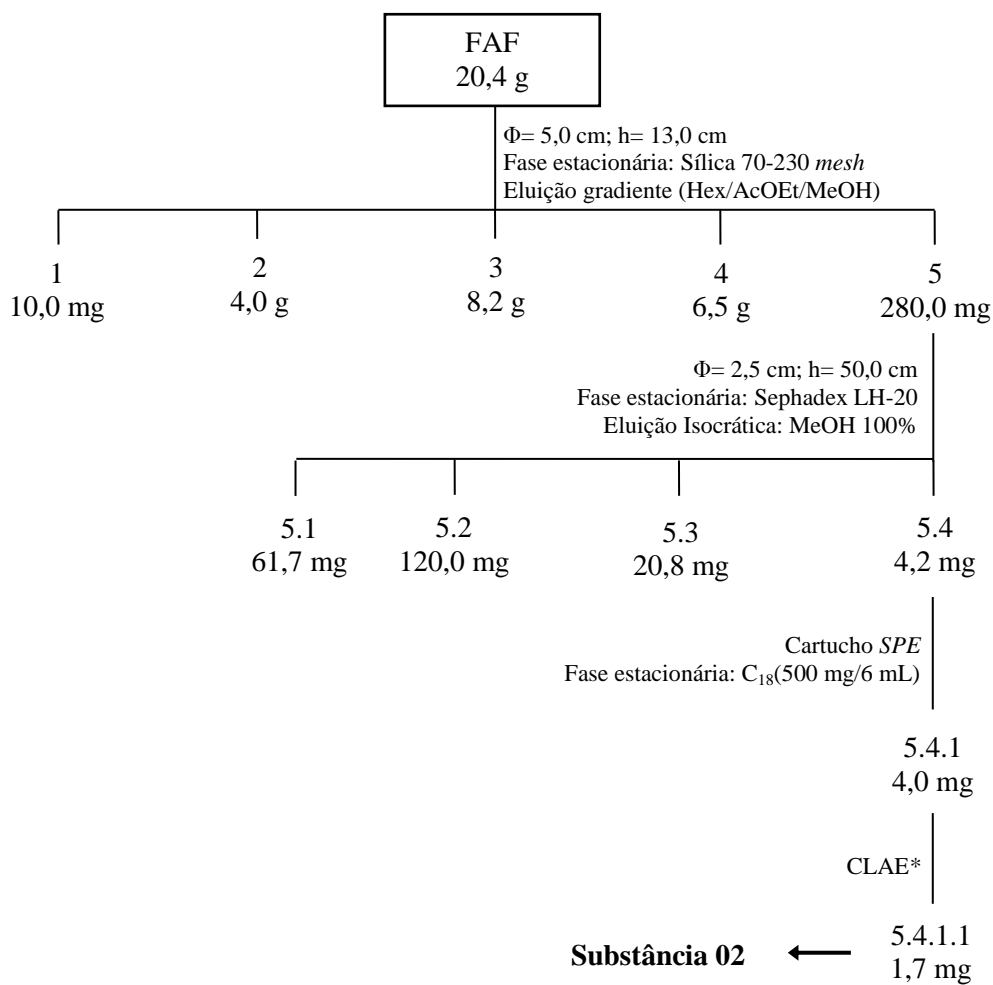
Fonte: Modificado de CHEN, ZUO, DENG, 2001

FIGURA 3.3 - Cromatograma obtido por CLAE no modo analítico



Condições analíticas: Eluição gradiente descrita na Tabela 3.4; C₁₈ Luna (100 Å e 10 µm - h: 25,0 cm x Φ :0,70 cm); volume de injeção: 300 µL e *loop*: 200 µL.

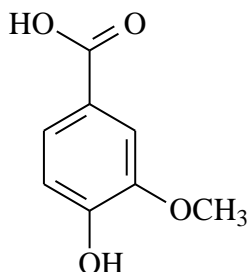
FIGURA 3.4 - Fluxograma do fracionamento da FAF



*Coluna semi-preparativa C₁₈ Luna (100 Å e 10 μm - 25 x 0,7 cm). Loop: 200 μL. Fase móvel: H₂O/CH₃COOH (97:3 v/v) (Solvente A) e CH₃OH (Solvente B).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *A. coriacea*

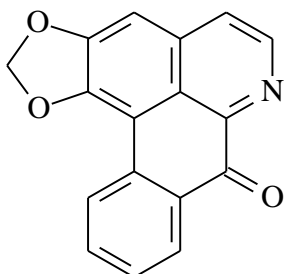


ácido vanílico (01)

Origem: Fração acetato de etila do caule

Isolamento: p. 91

Identificação: p. 96-104



liriodenina (02)

Origem: Fração acetato de etila das folhas

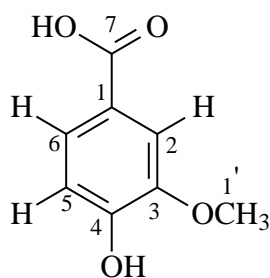
Isolamento: p. 92 e 95

Identificação: p. 105-115

4.2 - IDENTIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *A. coriacea*

4.2.1 - Identificação Estrutural da Substância **01**

A substância **01** foi isolada da fração acetato de etila do caule de *A. coriacea* e teve sua estrutura identificada por meio de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC e comparação com dados da literatura (CHANG et al., 2009). Os dados espectroscópicos são apresentados na Tabela 4.1 (p. 98). Este é o primeiro relato desta substância para a espécie em estudo.



Substância 01

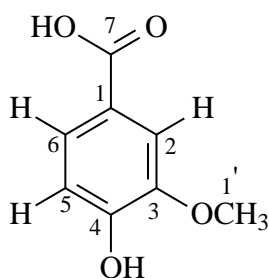
Pela análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.1, p. 99) da substância **01** observou-se três sinais integrando para um hidrogênio cada na região aromática, sendo um dubleto em δ 7,56 (H-2; $J = 1,8$ Hz), um duplo dubleto em δ 7,53 (H-6; $J = 8,2$ e $1,8$ Hz) e um dubleto em δ 6,81 (H-5; $J = 8,2$ Hz), além de um sinal referente a um singlete integrando para três hidrogênios em δ 3,89, o qual foi atribuído à metoxila.

Pelo espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.2, p. 100) observou-se sinais referentes a seis carbonos. No mapa de contorno de HMBC pôde-se observar o sinal do carbono carboxílico C-7 em δ 170,3, que sugere a presença de uma função ácido carboxílico ou éster na molécula.

O experimento de HSQC (Figura 4.3-4.4, p. 101-102) mostrou a correlação a J' do sinal de H-2 em δ 7,56 com o sinal de C-2 em δ 113,9, do sinal em δ 7,53 com o sinal δ 124,9 e do sinal de H-5 em δ 6,81 com o sinal de C-5 em δ 115,6. A metoxila em δ 3,89 (H-1') mostrou correlação com um sinal em δ 56,4 atribuído ao C-1'.

No experimento de HMBC (Figura 4.5-4.6, p. 103-104), o sinal de H-2 (δ 7,56) mostrou correlações com os sinais de C-6 (δ 124,9), C-3 (δ 148,4), C-4 (δ 151,8) e com o sinal do carbono carboxílico em δ 170,3, atribuído ao C-7. O sinal referente a um duplo dubleto (H-6) em δ 7,53 mostrou correlação com o sinal em δ 113,9 (C-2), com o sinal de C-4 (δ 151,8) atribuído ao carbono ligado ao oxigênio da hidroxila e também com o sinal em δ 170,3. A presença de um sinal em δ 6,81 (1H, *d*) mostrou correlações com os sinais em δ 124,9 (C-6), δ 148,4 (C-3) e δ 151,8 (C-4). O sinal da metoxila em δ 3,89 mostrou correlação com o sinal de C-3 (δ 148,4). A comparação destes dados com os da literatura (Tabela 4.1, p. 98) permitiu identificar a estrutura como sendo o ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico ou ácido vanílico.

TABELA 4.1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **01** e comparação com dados da literatura.



H/C	SUBSTÂNCIA 01 (CD ₃ OD, 500/125 MHz)		(CHANG et al., 2009) (CD ₃ OD, 500/125 MHz)	
	δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	-	-	-	124,9
2	7,56 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,8, 1H)	113,9	7,57 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0, 1H)	114,0
3	-	148,4	-	148,5
4	-	151,8	-	152,6
5	6,81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,2, 1H)	115,6	6,82 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0, 1H)	115,7
6	7,53 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2; 1,8, 1H)	124,9	7,54 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 2,0, 1H)	-
7	-	170,3*	-	172,1
1'-OCH ₃	3,89 (<i>s</i> , 3H)	56,4	3,89 (<i>s</i> , 3H)	56,4

(*) valor obtido via experimento de HMBC (500 MHz).

(-) valores não fornecidos.

FIGURA 4.1- Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **01**

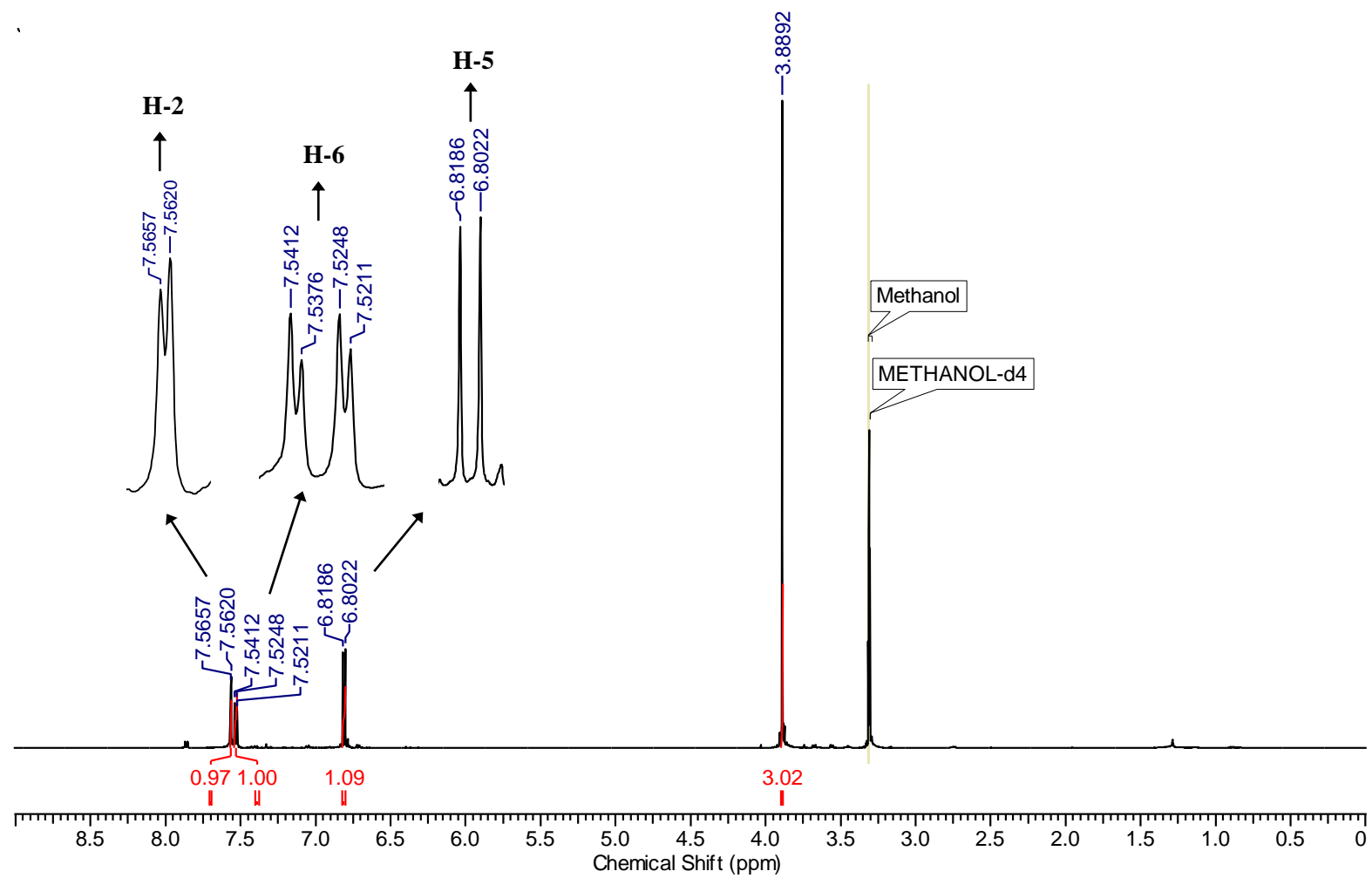


FIGURA 4.2- Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) da substância **01**

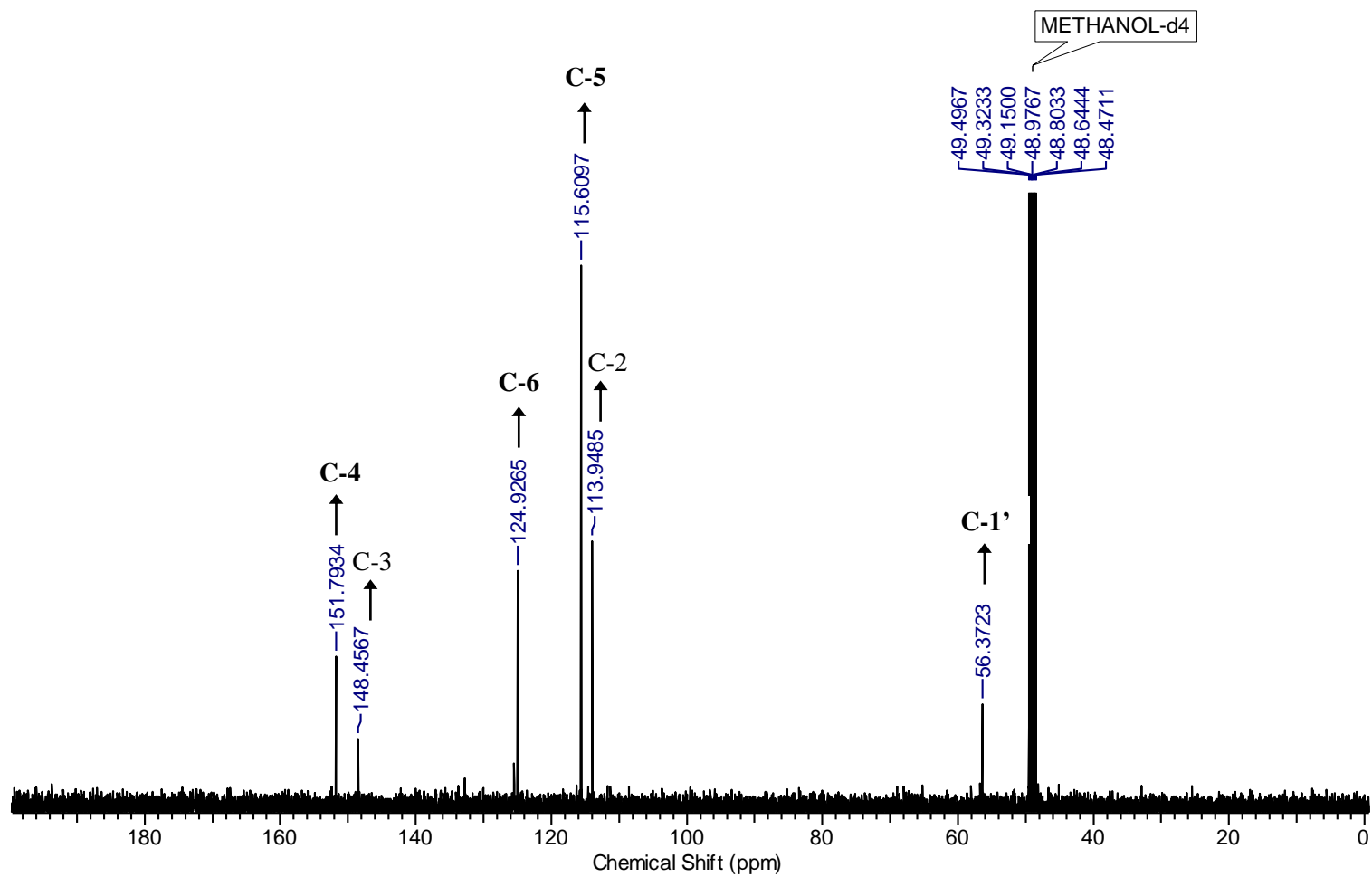


FIGURA 4.3- Mapa de contorno de HSQC da substância **01** (CD₃OD, 500 MHz)

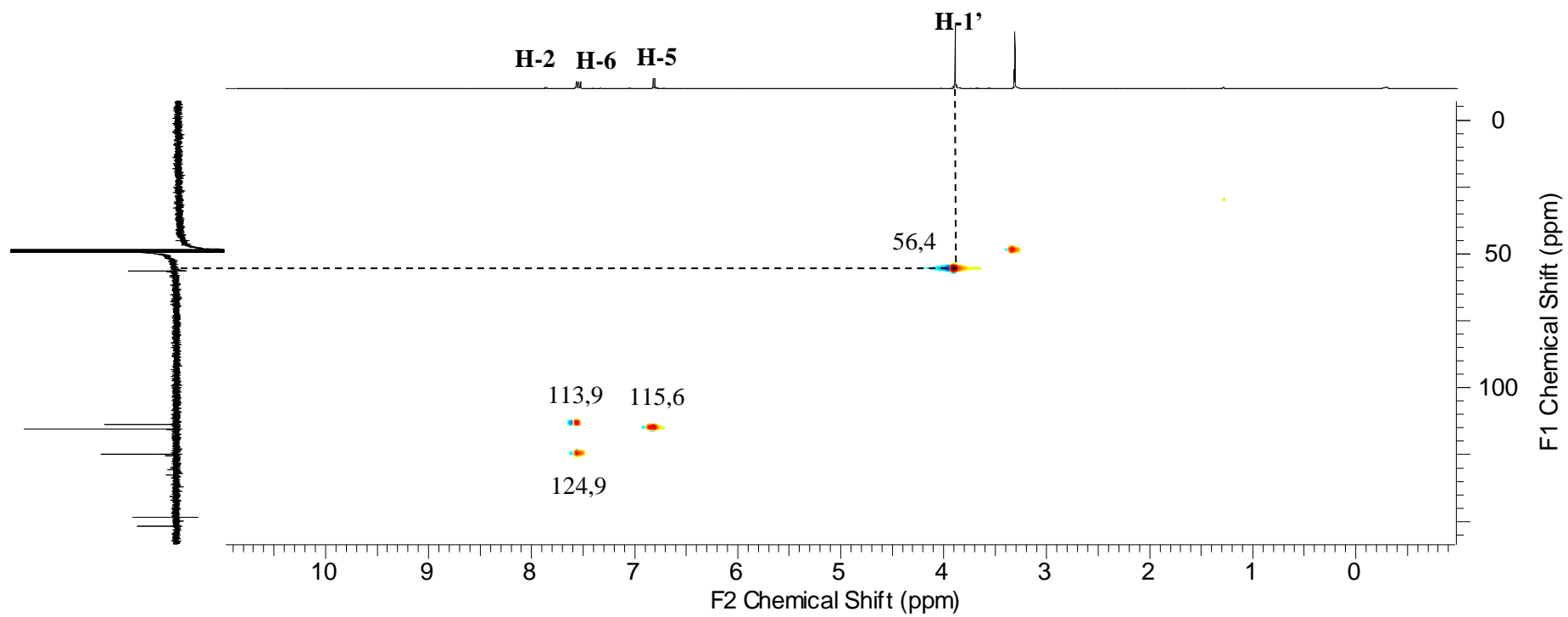


FIGURA 4.4- Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância **01** (CD₃OD, 500 MHz)

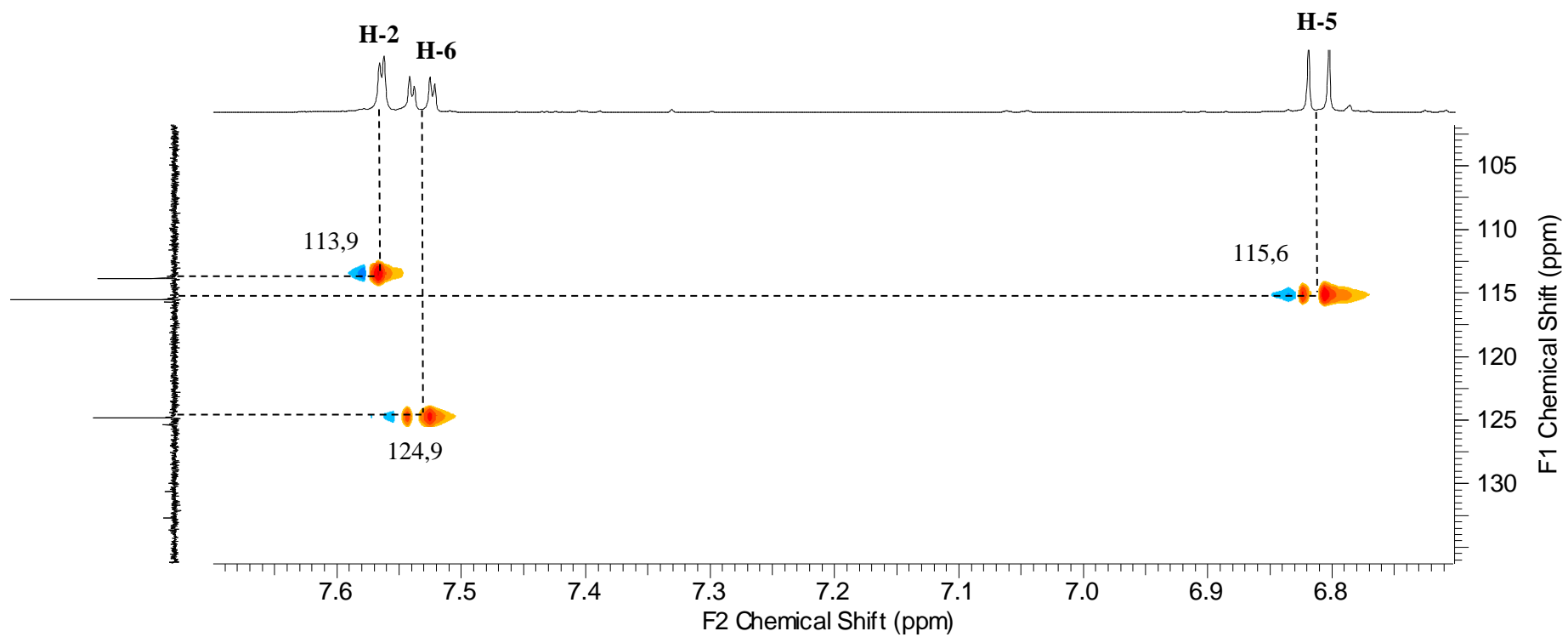


FIGURA 4.5- Mapa de contorno de HMBC da substância **01** (CD₃OD, 500 MHz)

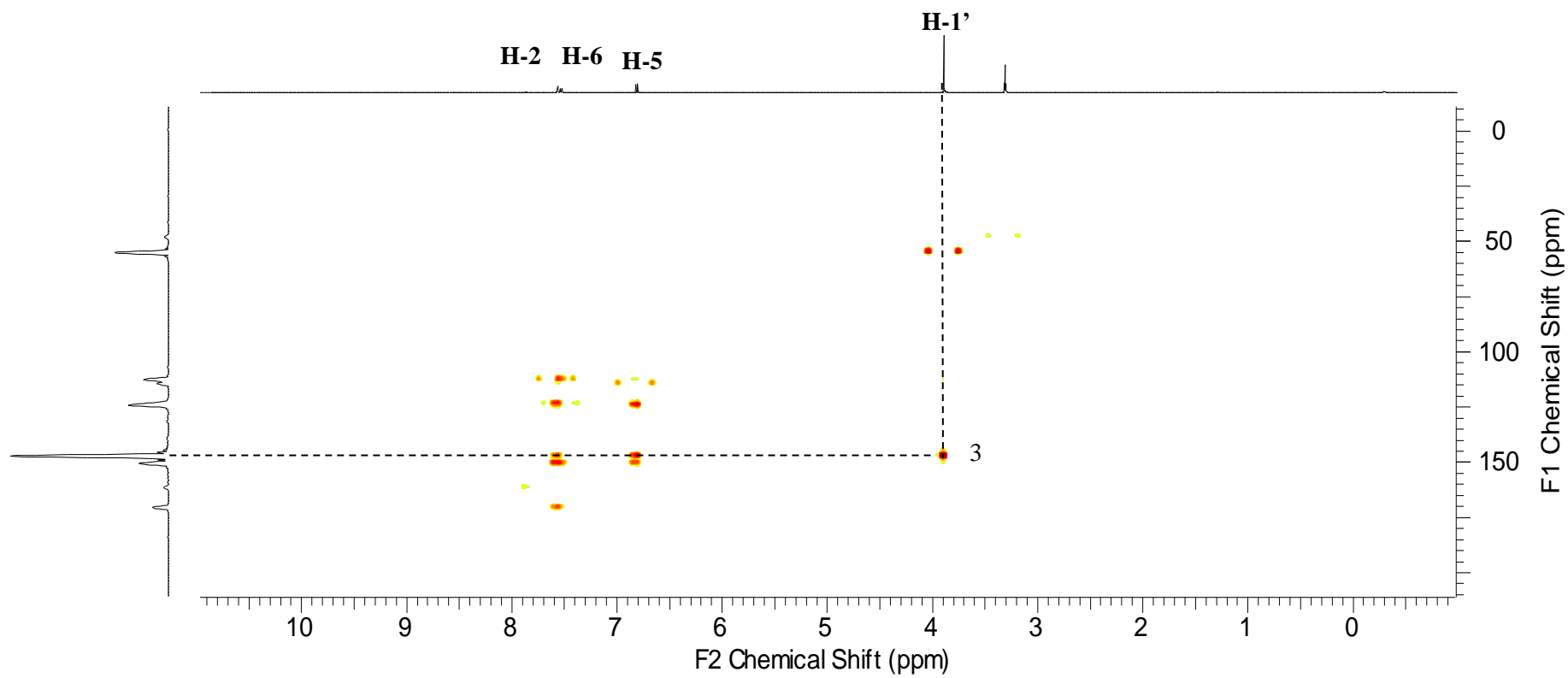
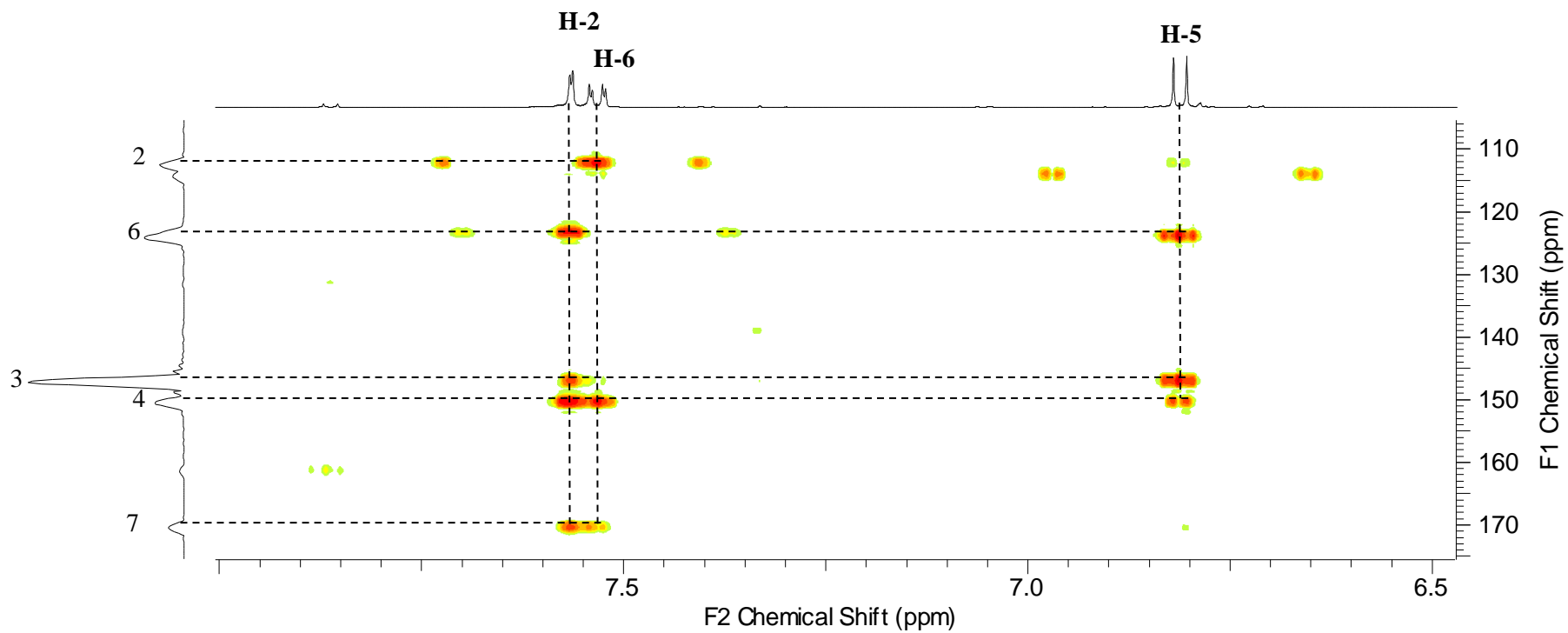
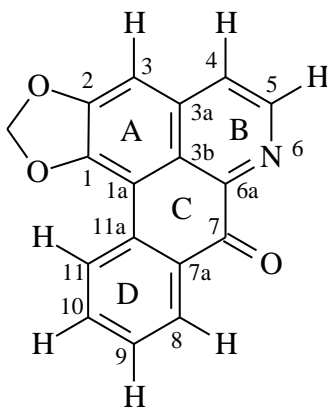


FIGURA 4.6- Expansão do mapa de contorno HMBC da substância **01** (CD₃OD, 500 MHz)



4.2.2 - Identificação Estrutural da Substância **02**

A substância **02** foi isolada da fração acetato de etila do caule de *A. coriacea* e teve sua estrutura identificada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY e comparação com dados da literatura (GUO et al., 2011). Os dados espectroscópicos são apresentados na Tabela 4.2 (p. 106-107). Este é o primeiro relato desta substância na espécie em estudo.



Substância 02

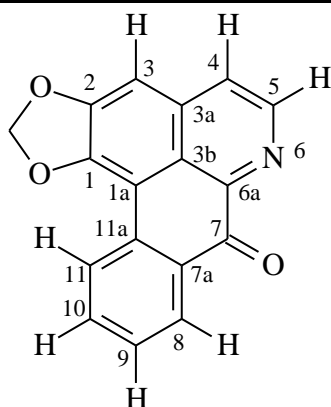
O espectro de RMN de ^1H de **02** (Figura 4.7, p. 108) apresentou sete sinais relativos à hidrogênios aromáticos, sendo quatro em δ 8,69 (1H, *d*, $J= 8,2$ Hz), δ 8,61 (1H, *dd*, $J= 7,8$ Hz), δ 7,77 (1H, *m*) e δ 7,60 (1H, *ddt*, $J= 7,8$ Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-11, H-8, H-10 e H-9, respectivamente, típicos dos hidrogênios aromáticos do anel D não substituído; um singlete em δ 7,23 característico de H-3 do anel A do sistema oxoaporfínico dissustituído, além de dois dubletos em δ 8,91 (H-5, 1H) e δ 7,80 (H-4, 1H) com $J= 5,3$ Hz, constante de acoplamento característica de um sistema piridínico, compatível com o anel B do sistema oxoaporfínico. Além disso, este espectro apresenta um sinal de singlete em δ 6,36 (2H), típico de grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 do anel A.

Através da análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 4.8, p. 109) e HMBC (Figura 4.11-4.12, p. 112-113), atribuiu-se 15 sinais de carbonos aromáticos entre δ 103,3 e δ 151,7, um carbonílico em δ 182,5 (C-7) e um metilenodióxi em δ 102,4 (-OCH₂O-).

As correlações diretas entre ^1H e ^{13}C pelo experimento de HSQC (Figura 4.9-4.10, p. 110-111) e as correlações observadas por HMBC estão compiladas na Tabela 4.3 (p.107).

Pelo espectro de COSY (Figura 4.13-4.14, p. 114-115) pôde-se observar o acoplamento dos sinais de H-9 com dois sinais, sendo um em δ 7,77 (1H, *m*) e outro em δ 8,61 (1H, *dd*), referentes à H-10 e H-8, respectivamente. Outras duas correlações foram observadas, sendo do sinal de H-10 em δ 7,77 com um sinal em δ 8,69 (1H, *d*), atribuído ao H-11, e H-4 em δ 7,80 (1H, *d*) com o sinal de H-5 em δ 8,91 (1H, *d*). A análise dos dados espectroscópicos em comparação com os dados da literatura (Tabela 4.2) confirma a identificação da substância como sendo a liriodenina.

TABELA 4.2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **02** e comparação com dados da literatura.



H/C	SUBSTÂNCIA 02		(GUO et al., 2011)	
	(CDCl ₃ , 600/150 MHz)		(CDCl ₃ , 500/125 MHz)	
	δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	-	147,9*	-	147,9
1a	-	108,2	-	108,4
2	-	151,7*	-	151,8
3	7,23 (<i>s</i> , 1H)	103,3	7,19 (<i>s</i> , 1H)	103,3
3a	-	145,5	-	145,5
3b	-	123,7*	-	123,3
4	7,80 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,3, 1H)	124,3	7,77 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,1, 1H)	124,2
5	8,91(<i>d</i> , <i>J</i> = 5,3, 1H)	145,0	8,89 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,1, 1H)	145,0
6a	-	135,8	-	135,8
7	-	182,5*	-	182,4
7a	-	131,5*	-	131,4
8	8,61 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,8; 1,05, 1H)	128,6	8,58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,8, 1H)	128,6
9	7,60 (<i>ddt</i> , <i>J</i> = 7,8; 0,63, 1H)	128,9	7,57 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,8, 1H)	128,9
10	7,77 (<i>m</i> , 1H)	133,9	7,76 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8,1, 1H)	133,9

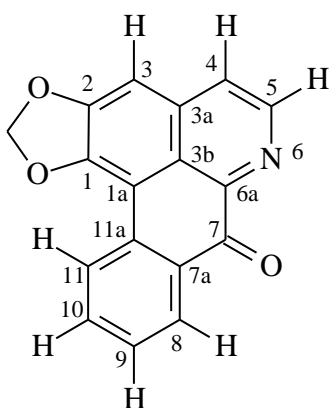
TABELA 4.2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **02** e comparação com dados da literatura (Conclusão)

11	8,69 (<i>d</i> , $J= 8,2$, 1H)	127,4	8,65 (<i>d</i> , $J= 8,1$, 1H)	127,4
11a	-	133,5*	-	132,9
-OCH ₂ O-	6,36 (<i>s</i> , 2H)	102,4	6,37 (<i>s</i> , 2H)	102,4

(*) valores obtidos via experimento de HMBC (150 MHz).

(-) valores não fornecidos.

TABELA 4.3 - Correlações observadas nos experimentos de HSQC e HMBC para substância **02**



SUBSTÂNCIA 02		Correlações observadas		
Posição	(CDCl ₃ , 600/150 MHz)		HSQC	HMBC
	δ_{H} (ppm), J (Hz)	δ_{C} (ppm)		
3	7,23	103,3	C-3	C-1, C-2, C-4
4	7,80	124,3	C-4	C-3, C-3a, C-3b
5	8,91	145,0	C-5	C-3a, C-4, C-6a
8	8,61	128,6	C-8	C-10
9	7,60	128,9	C-9	C-7a, C-8
10	7,77	133,9	C-10	C-9, C-11a
11	8,69	127,4	C-11	C-1a, C-7a, C-11a
-OCH ₂ O-	6,36	102,4	-OCH ₂ O-	C-1, C-2

FIGURA 4.7 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz,) da substância **02**

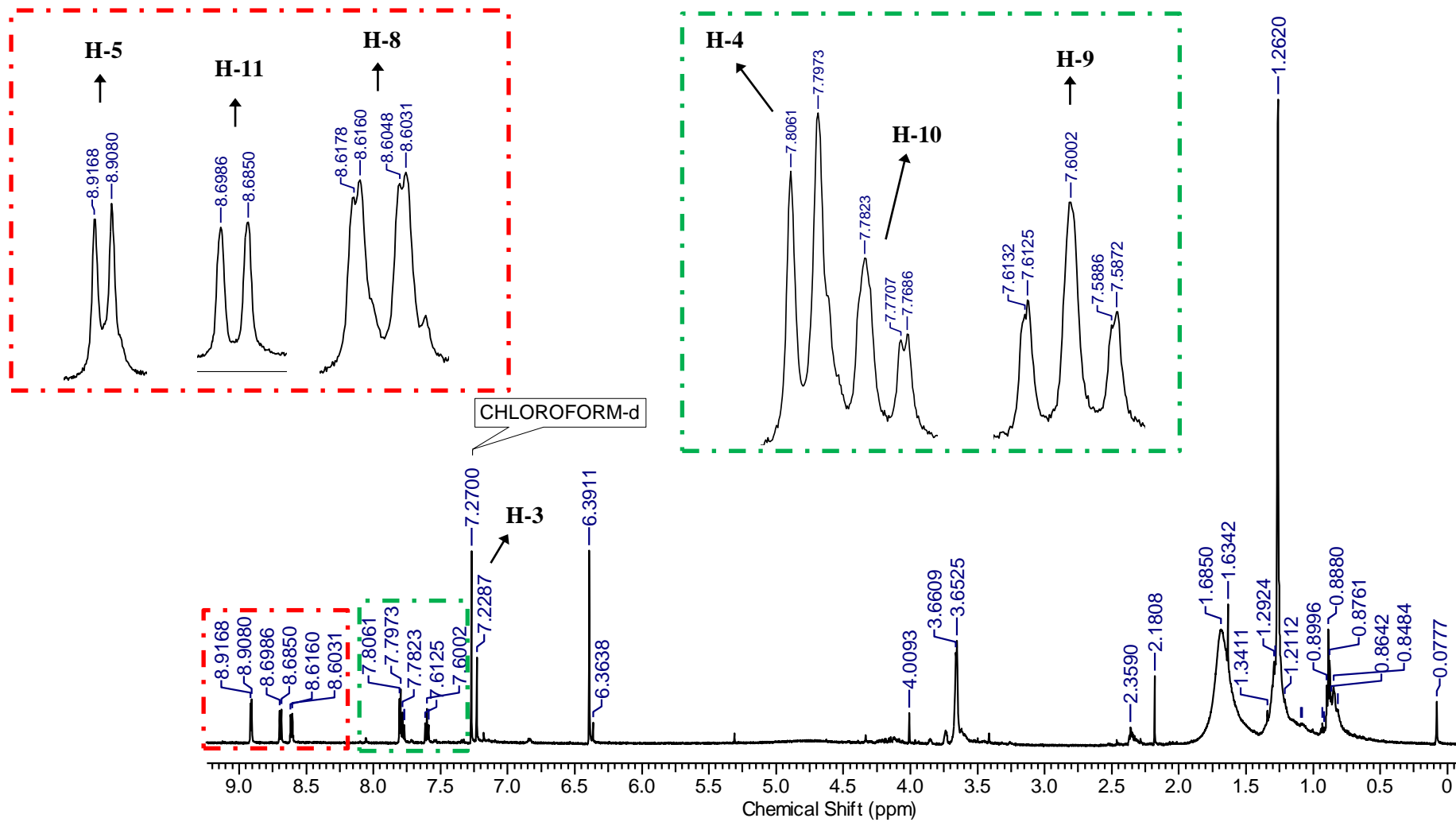


FIGURA 4.8 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) da substância **02**

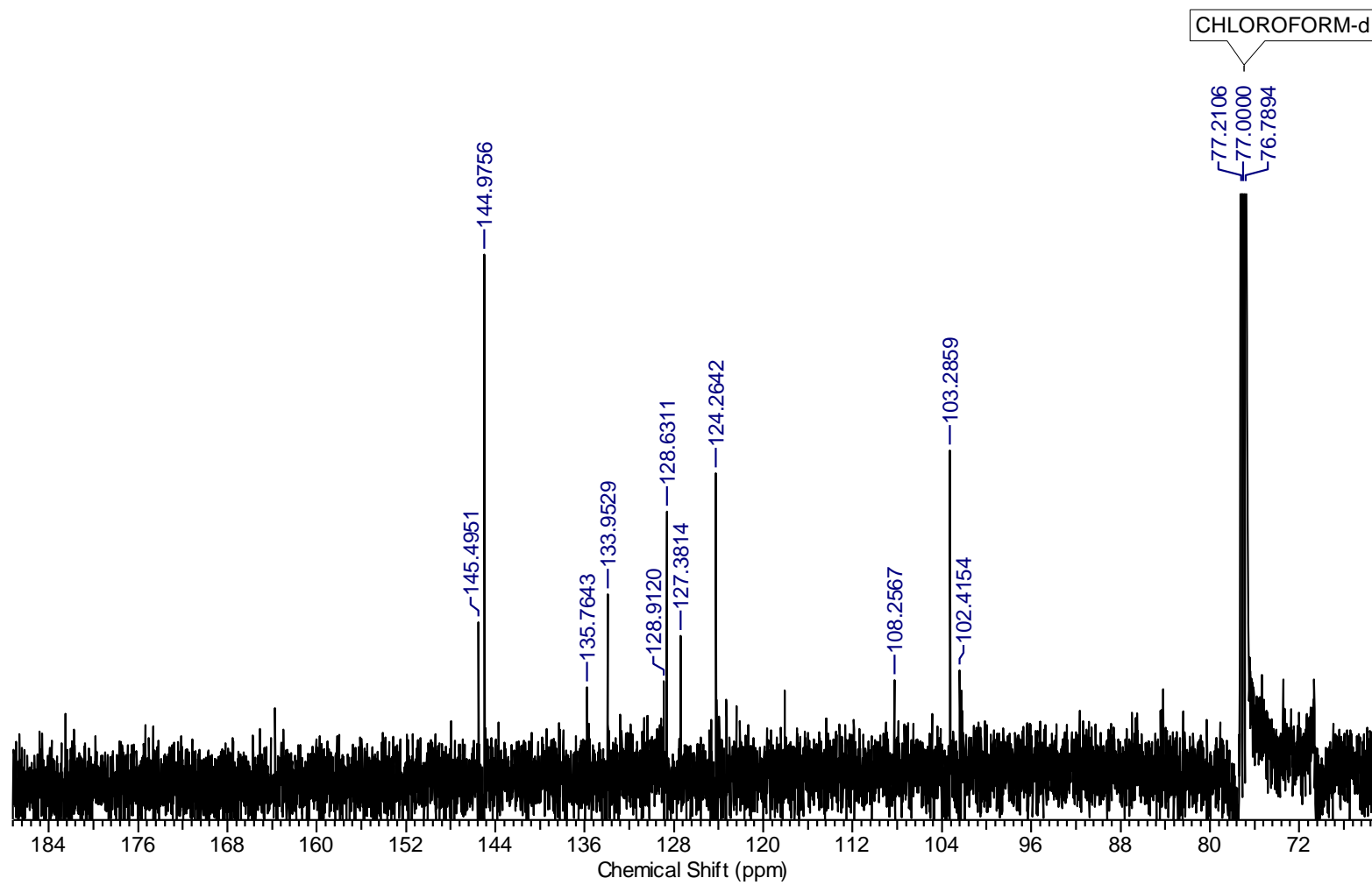


FIGURA 4.9 - Mapa de contorno de HSQC da substância **02** (CDCl₃, 600 MHz)

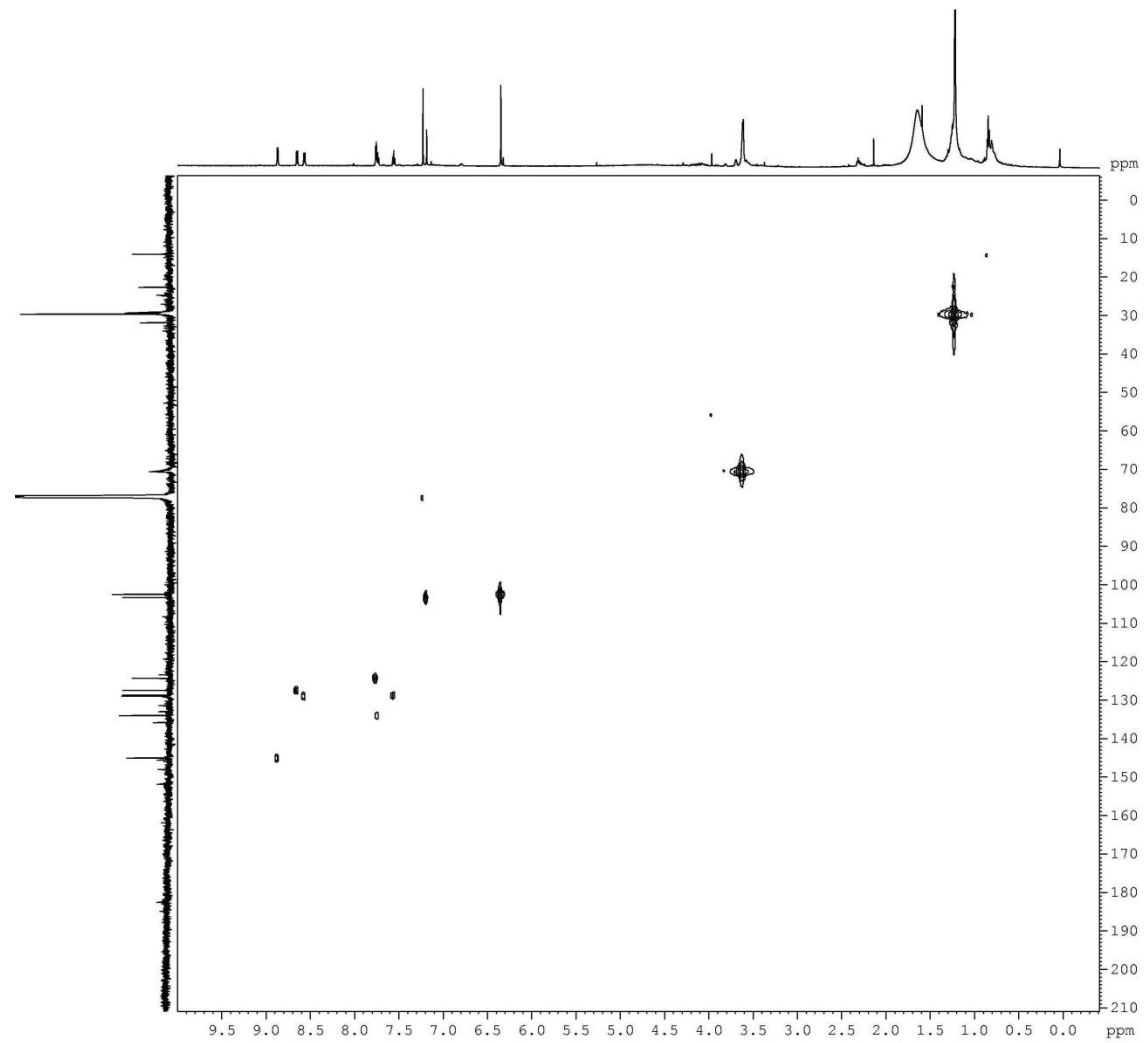


FIGURA 4.10 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância **02** (CDCl₃, 600 MHz)

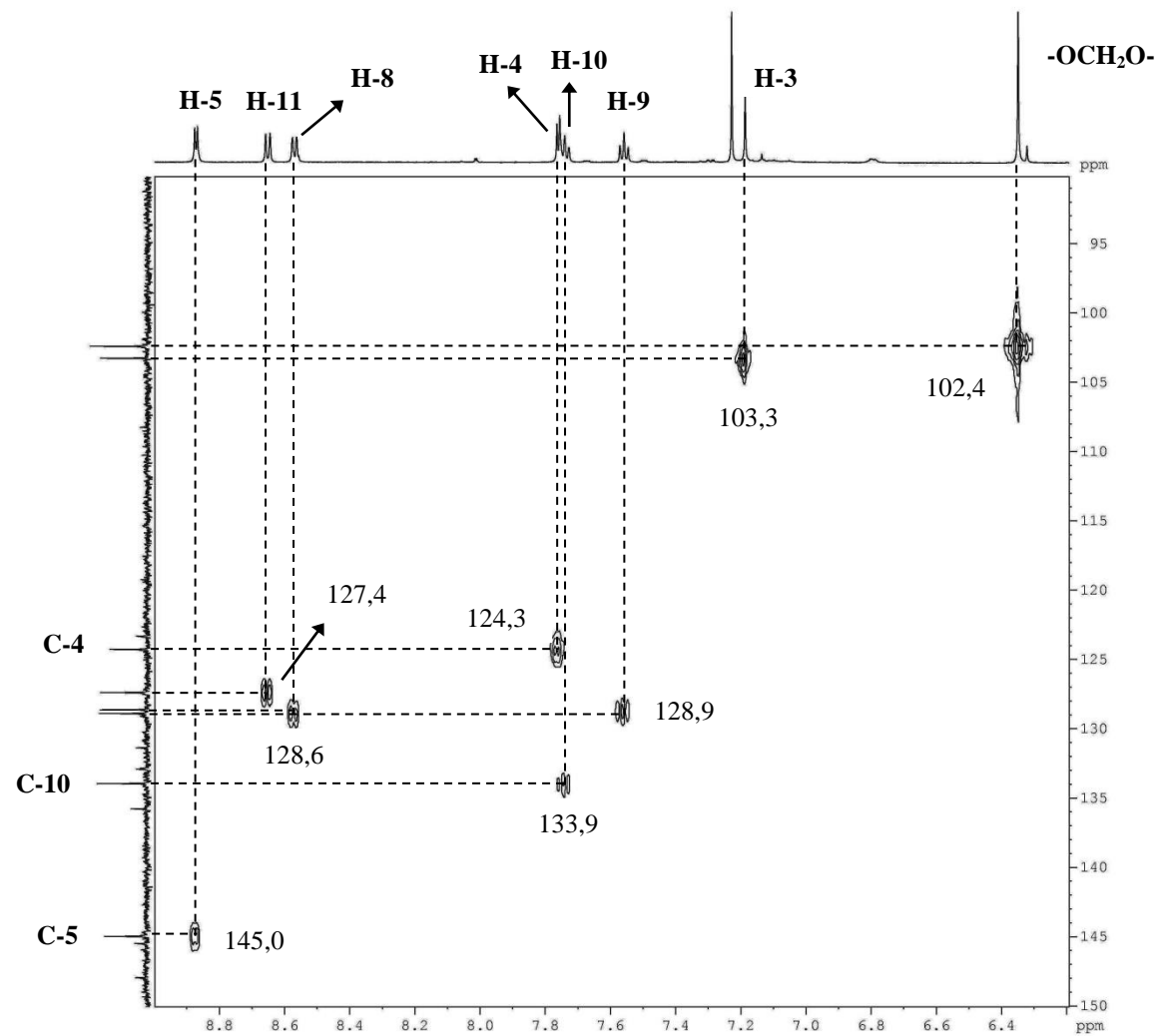


FIGURA 4.11 - Mapa de contorno de HMBC da substância **02** (CDCl₃, 600 MHz)

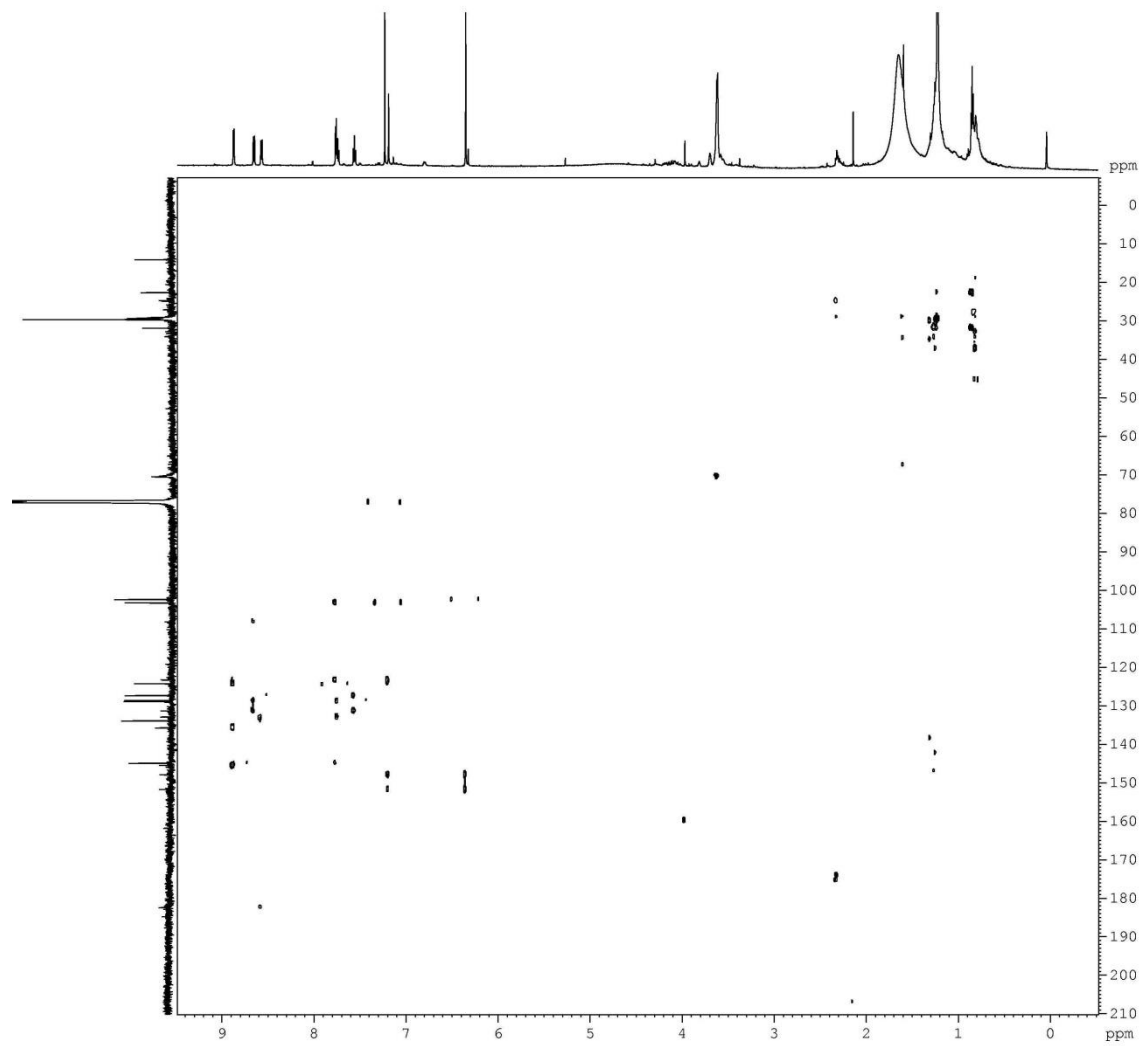


FIGURA 4.12 - Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância **02** (CDCl₃, 600 MHz)

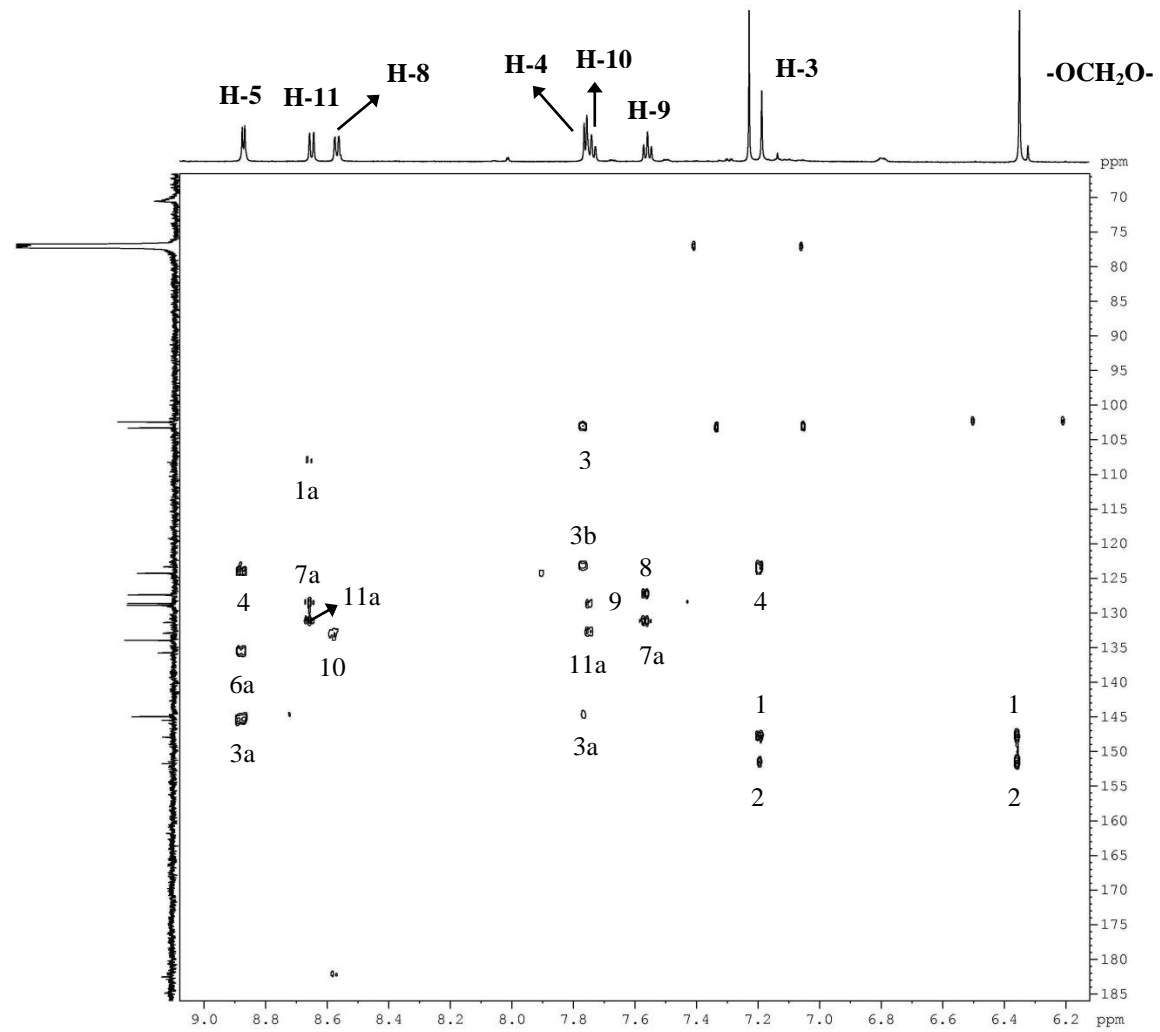


FIGURA 4.13 - Espectro de COSY da substância **02** (CDCl₃, 600 MHz)

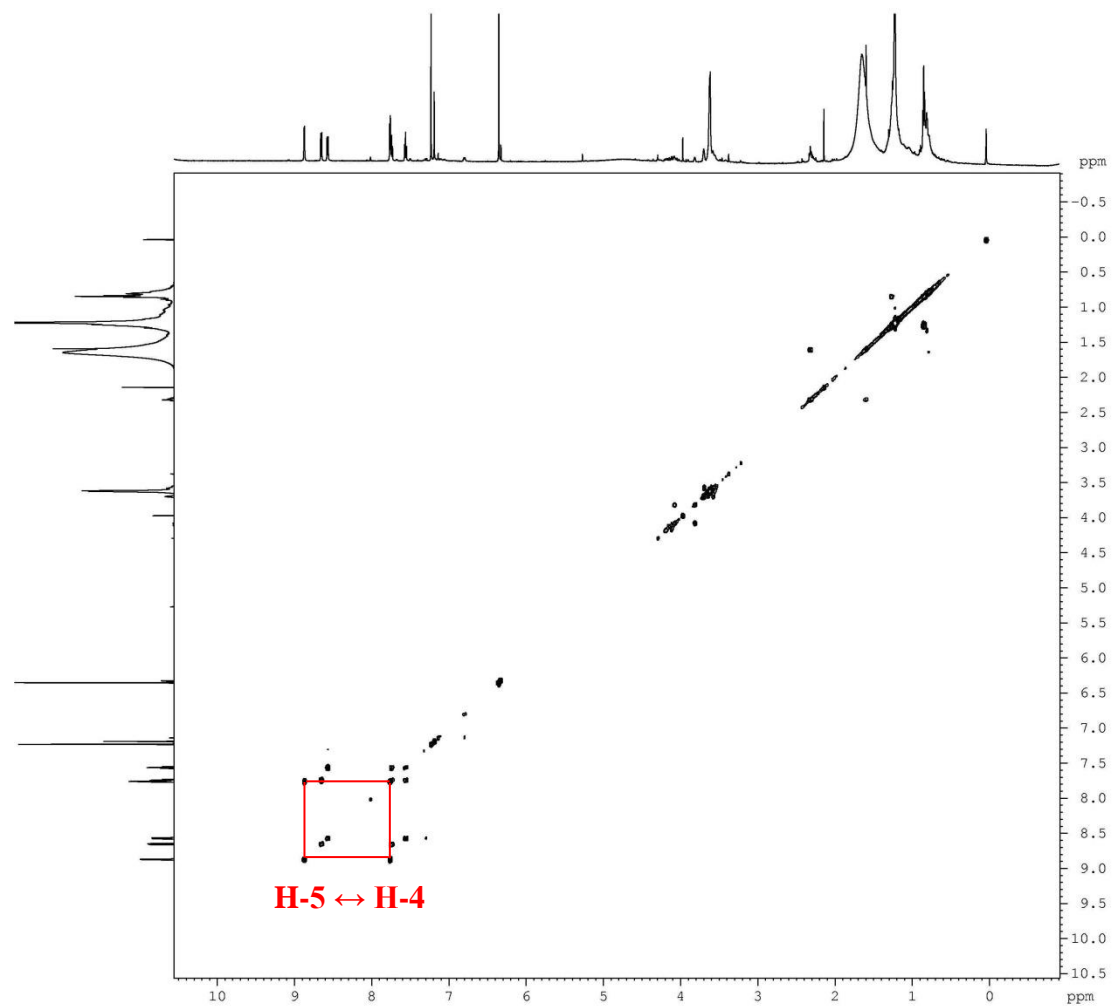
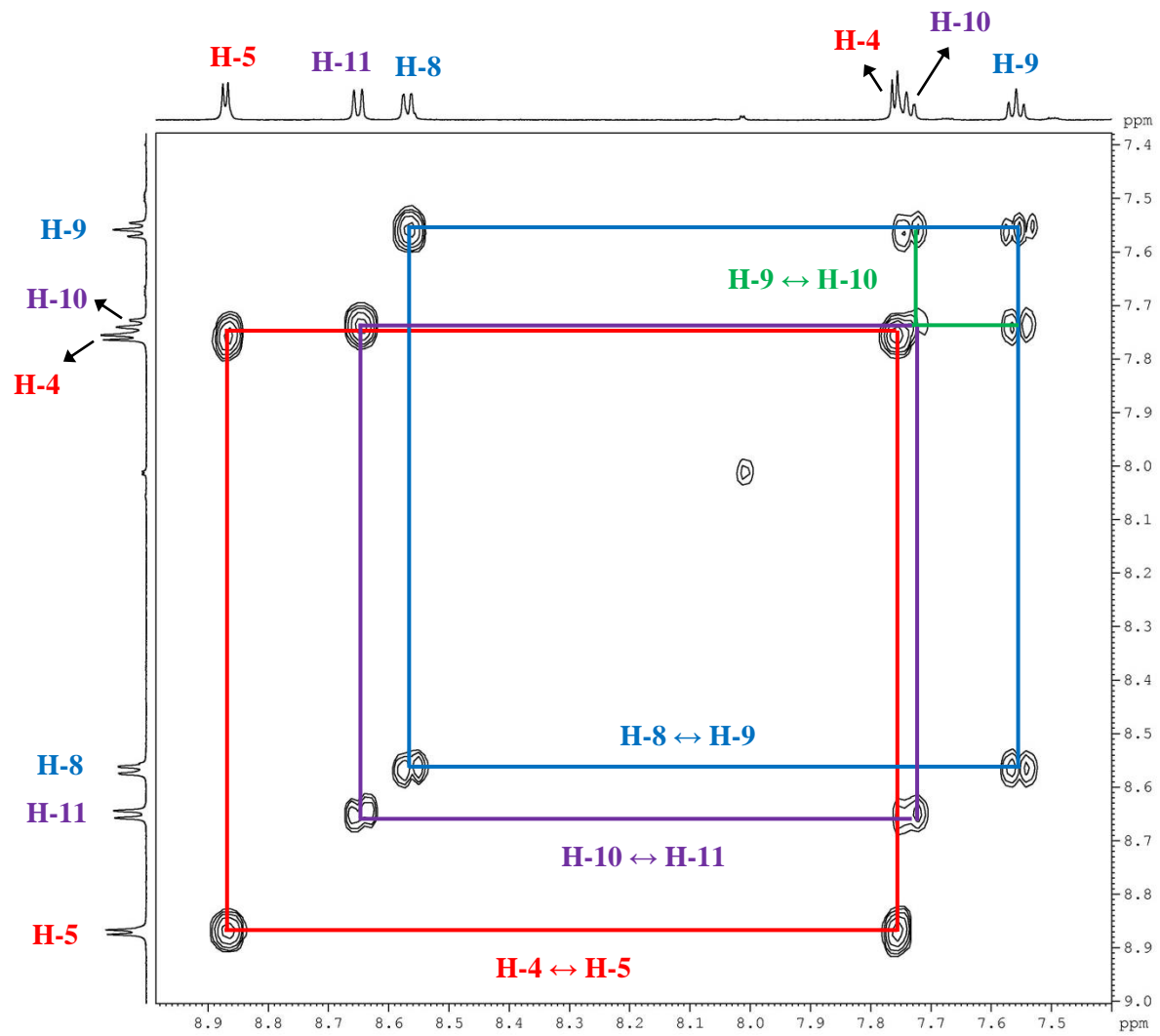


FIGURA 4.14 - Expansão do espectro de COSY da substância **02** (CDCl₃, 600 MHz)



5 - CONCLUSÃO

O estudo químico do extrato etanólico do caule e folhas de *A. coriacea* proporcionou o isolamento e a elucidação estrutural de duas substâncias, compreendendo um ácido carboxílico aromático (substância **01**) e um alcaloide (substância **02**).

A presença do alcaloide liriodenina reforça o posicionamento desta classe de substância em plantas do gênero *Annona*, visto que alcaloides do tipo aporfínicos são frequentemente encontrados no mesmo. O primeiro relato da liriodenina na espécie *A. coriacea* foi no presente trabalho, corroborando com o uso desta substância como um marcador quimiotaxonômico, dado que esta substância é muito comum em espécies do gênero (ACHENBACH, HEMRICH, 1991).

Desse modo, o estudo da composição química de *A. coriacea* contribuiu para o conhecimento químico de *A. coriacea*, e conseqüentemente, do gênero ao qual pertence, a fim de conhecer as classes de metabólitos secundários produzidos pela mesma.

Novos trabalhos voltados à ensaios biológicos dos compostos isolados serão realizados, visto que há diversos relatos dessa planta em uso medicinal popular, bem como atividades biológicas relevantes.

REFERÊNCIAS

ACHENBACH, H. & HEMRICH, H. "Alkaloids, flavonoids and phenylpropanoids of the west african plant *Oxymztraelutina*". *Phytochemistry*, 30: 1265, **1991**.

AHAMMADSAHIB, K.I.; HOLLINGWORTH, R.M.; MCGOVREN, J.P.; HUI, Y.H. & MCLAUGHLIN, J.L. "Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin". *Life Sci.*, 53: 1113, **1993**.

ALALI, F.Q.; LIU, X.X. & MCLAUGHLIN, J.L. "Annonaceous acetogenins: recent progress". *J. Nat. Prod.*, 62:504, **1999**.

ALVES, T.C.; GONÇALVES, M.R.S.; CORREIA, F.C.S.; SILVA, V.C.; JUNIOR, P.T.S.; CARVALHO, M.G.; FILHO, R.B. & DALL'OGGIO, E.L. "New acetogenins from the seeds of *Annona coriacea*". *Helv. Chim. Acta*, 97: 1469, **2014**.

BATLLE-BAYER, L.; BATJES, N.H. & BINDRABAN, P.S. "Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado". *Agr. Ecosyst. Environ.*, 137: 47, **2010**.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E. & CORTES, D. "Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action". *Nat. Prod. Rep.*, 22: 269, **2005**.

BUTLER, M.S.; ROBERTSON, A.A.B. & COOPER, M.A. "Natural product and natural product derived drugs in clinical trials". *Nat. Prod. Rep.*, 25: 475, **2014**.

CARPOTECA, 2015. *Annona crassiflora*. <http://carpoteca.blogspot.com.br/2013_01_01_archive.html> Acesso em: 07 março 2015.

CHANG, S.W.; KIM, H.K.; LEE, I.K.; CHOI, S.U.; RYU, S.Y. & LEE, K.R. "Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*". *Nat. Prod. Sci.*, 15(4): 234, **2009**.

CHEN, Y.; CHEN, J. & LI, X. "Cytotoxic bistetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*". *J. Nat. Prod.*, 74: 2477, **2011**.

CHEN, H.; ZUO, Y. & DENG, Y. "Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid Chromatography". *J. Chromatogr. A*, 913: 387, **2001**.

COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; SALVADOR, M. J.; MAIA, B.H.L.N.S.; CABRAL, E.C. & EBERLIN, M. N. "Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents". *J. Nat. Prod.*, 73: 1180, **2010**.

COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; XAVIER, C.M.; SILVA, J.E.A.; AMARAL, A.C.F.; SOUZA, A.D.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; FERREIRA, A.G.; MACHADO, G.M.C. & LEON, L.L.P. "A pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity". *J. Nat. Prod.*, 69: 292, **2006**.

DI STASI, L.C. & HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª ed. UNESP, São Paulo, 2002. 592p.

DUTRA, L.M.; BOMFIM, L.M.; ROCHA, S.L.A.; NEPEL, A.; SOARES, M.B.P.; BARISON, A.; COSTA, E.V. & BEZERRA, D.P. "*ent*-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24: 3315, **2014**.

ETSY, 2015. Graviola. <<https://www.etsy.com/pt/listing/210345002/annona-muricata-medicinal-tree-soursop?ref=market>> Acesso em: 03 março 2015.

FERRARI, M.; PELIZZONE, F. & FERRARI, G. "New diterpenoids with clerodane skeleton". *Phytochemistry*, 10: 3267, **1971**.

GORENFLO, L.J.; ROMAINE, S.; MITTERMEIER, R.A. & WALKER-PAINEMILLA, K. "Co-occurrence of linguistic and biological diversity in biodiversity hotspots and high biodiversity wilderness areas". *PNAS*, 109: 8032, **2012**.

GUO, Z.; WANG, X.; LUO, J.; LUO, J.; WANG, J. & KONG, L. "A novel aporphine alkaloid from *Magnolia officinalis*". *Fitoterapia*, 82: 637, **2011**.

- KLINK, C.A. & MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1: 147, **2005**.
- LEBOEUF, M.; BHAUMIK, A.C.P.K.; MUKHERJEE, B. & MUKHERJEE, R. “The phytochemistry of the Annonaceae”. *Phytochemistry*, 21: 2783, **1982**.
- LIMA, L.A.R.S.; PIMENTA, L.P.S. & BOAVENTURA, M.A.D. “Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity”. *Food Chem.*, 122: 1129, **2010**.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002. 30p.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008. 67-71p.
- MATSUMOTO, S.; VARELA, R.M.; PALMA, M.; MOLINILLO, J.M.G.; LIMA, I.S.; BARROSO, C.G. & MACÍAS, F.A. “Bio-guided optimization of the ultrasound-assisted extraction of compounds from *Annona glabra* L. leaves using the etiolated wheat coleoptile bioassay”. *Ultrason. Sonochem.*, 21: 1578, **2014**.
- MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J.E. & ESPINDOLA, L.S. “*In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies”. *J. Ethnopharmacol.*, 110: 165, **2007**.
- MISHRA, B.B. & TIWARI, V.K. “Natural products: An evolving role in future drug Discovery”. *Eur. J. Med. Chem.*, 46: 4769, **2011**.
- MMA, 2015. Ministério do Meio Ambiente. <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>> Acesso em: 06 março 2015.
- MUSSINI, P.; ORSINI, F.; PELIZZONI, F. & FERRARI, G. “Constituents of *Annona coriacea* the structure of a new diterpenoid”. *J. Chem. Soc.*, 21: 2551, **1973**.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. & KENT, J. “Biodiversity hotspots for conservation priorities”. *Nature*, 403: 853, **2000**.
- QUEIROZ, E.F.; ROBLLOT, F.; CAVE, A.; HOCQUEMILLER, R.; SERANI, L.; LAPREVOTE, O. & PAULO, M.Q. “A new bistetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona salzmanii*”. *J. Nat. Prod.*, 62: 710, **1999**.
- RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F. & BRIDGEWATER, S. “The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity”. *Ann. Botany*, 80: 223, **1997**.
- REMÉDIO CASEIRO, 2015. Pinha. <<http://www.remedio-caseiro.com/os-beneficios-da-pinha-fruta-do-conde>> Acesso em: 27 fevereiro 2015.
- SANTOS, A.F. & SANT’ANA, A.E.G. “Molluscicidal properties of some species of *Annona*”. *Phytomedicine*, 8: 115, **2001**.
- SILVA, D.B.; MATOS, M.F.C.; NAKASHITA S.T.; MISU, C.K.; YOSHIDA, N.C.; CAROLLO, C.A.; FABRI, J.R.; MIGLIO, H.S. & SIQUEIRA, J.M. “Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfinicos”. *Quim. Nova*, 30: 1809, **2007**.

SILVA, E.L.M.; FRAROBLOT, F.; LAPREVOTE, O.; LAURENT SERANI, L. & CAVE, A. "Coriaheptocins A and B, the first heptahydroxylated acetogenins, isolated from the roots of *Annona coriacea*". *J. Nat. Prod.*, 60: 162, **1997**.

SILVA, E.L.M.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; SERANI, L. & LAPREVOTE, O. "Structure elucidation of annoheptocins, two new heptahydroxylated C₃₇ acetogenins by high-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry". *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12: 1936, **1998**.

SILVA, E.L.M.; ROBLOT, F.; MAHUTEAU, J. & CAVE, A. "Coriadienin, the first Annonaceous acetogenin with two double bonds isolated from *Annona coriacea*". *J. Nat. Prod.*, 59: 528, **1996**.

SIQUEIRA, C.A.T. Aspectos Químicos e Atividade Antiprotozoária *in vitro* de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos - USP, 2010. Dissertação de mestrado, 179 p.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008. 93-97p.

SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.P.C. & LOPES, N.P. Farmacognosia coletânea científica. UFOP, Ouro Preto, 2012. 372p.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C. & QUETIN-LECLERC J. "Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids". *Curr. Med. Chem.*, 5:173, **2005**.

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". *J. Braz. Chem. Soc.*, 18: 1554, **2007**.

VENDRAMIN, M.E.; COSTA, E.V.; SANTOS, E.P.; PINHEIRO, M.L.B.; BARISON, A. & CAMPOS, F.R. "Chemical constituents from leaves of *Annona rugulosa* (Annonaceae)". *Biochem. Syst. Ecol.*, 49: 152, **2013**.

YU, J.; HU, X.E.; HO, D.K.; BEAN, M.F.; STEPHENS, R.E. & CASSADY, J.M. "Absolute stereochemistry of (+)-gigantech from *Annona coriacea* (Annonaceae)". *J. Org. Chem.*, 59: 1598, **1994**.