

**Análise por HPLC e Espectrometria de Massas do Extrato Alcaloídico Hexânico das Folhas de *Annona muricata*****HPLC and Mass Spectrometry analysis of Hexane Extract Alkaloidal from the Leaves of *Annona muricata***

DOI:10.34115/basrv4n3-078

Recebimento dos originais:10/05/2020

Aceitação para publicação:03/06/2020

**Heriberto Rodrigues Bitencourt**

Doutor em Química pela Universidade Federal do Pará

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01 - Bairro - Guamá, Belém-PA.

Cep: 66.075-110

E-mail: eriberto@ufpa.br

**Maricelia Lopes dos Anjos**

Bach. em Química pela Universidade Federal do Pará

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01 - Bairro - Guamá, Belém-PA.

Cep: 66.075 – 110

E-mail: mariceliadosanjos@yahoo.com.br

**Antônio Pedro da Silva Souza Filho**

Doutor em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Instituição: Embrapa Amazônia Oriental

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, S/N

CEP: 66.085-100

E-mail: antonio-Pedro.filho@embrapa.br

**Leonardo Lemos Almeida**

Bach. em Química pela Universidade Federal do Pará

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém-PA, Brasil.

Cep: 66.075-110.

E-mail: leolemos202@gmail.com

**Patrícia Santana Barbosa Marinho**

Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal de São Carlos

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01 - Bairro - Guamá, Belém-PA,

Cep: 66.075-110

E-mail: pat@ufpa.br

**Andrey Moacir do Rosario Marinho**

Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal de São Carlos  
Instituição: Universidade Federal do Pará  
Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01 - Cremação, Belém – PA, Brasil.  
Cep: 66.075-110  
E-mail: andrey@ufpa.br

**Simone Menezes Siqueira Rodrigues**

Bacharela em Química pela Universidade Federal do Pará  
Instituição: Universidade Federal do Pará  
Endereço: Cidade Nova 5, we-28, num 1001.  
Cep: 67.133-110  
E-mail :simonesiqrodrigues@Gmail.com

**Jeferson Rodrigo Souza Pina**

Mestre em Química Orgânica pela Universidade Federal do Pará  
Instituição: Universidade Federal do Pará  
Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01 - Cremação, Belém – PA, Brasil.  
Cep: 66.075-110  
E-mail: konanquim@gmail.com

**José Ciriaco Pinheiro**

Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo  
Instituição: Universidade Federal do Pará  
Endereço: Laboratório de Química Teórica e Computacional, Universidade Federal do Pará  
Rua Augusto Correa, 1, Guamá  
Cep: 66.075-110  
E-mail: ciriaco@ufpa.br

**RESUMO**

*Annona muricata*, uma planta frutífera da região amazônica, muito apreciada pelo seu fruto, a graviola, comum na região Amazônica e bastante estudada devido aos seus componentes químicos, alcalóides e acetogeninas. Com base nessas informações, neste trabalho relata-se a análise via HPLC e Espectrometria de massas do extrato alcaloídico obtido a partir do extrato hexânico das folhas, via partição ácido/ base.

**Palavras-Chave:** alcalóide; anonaina; aporfina

**ABSTRACT**

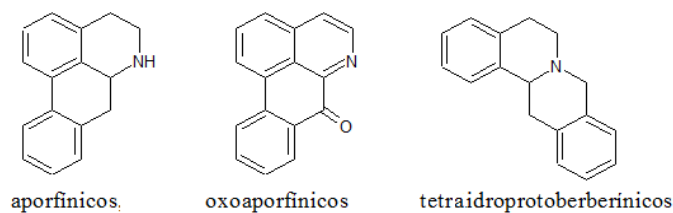
*Annona muricata*, a fruit plant from the Amazon region, much appreciated for its fruit, soursop, common in the Amazon region and widely studied due to its chemical components, alkaloids and acetogenins. Due to these factors, this work reports the analysis via HPLC and mass spectrometry of the alkaloid extract obtained from the hexane extract of the leaves, via the acid / base partition.

**Key-words:** Alkaloid; anonaine; aporphine

## 1 INTRODUÇÃO

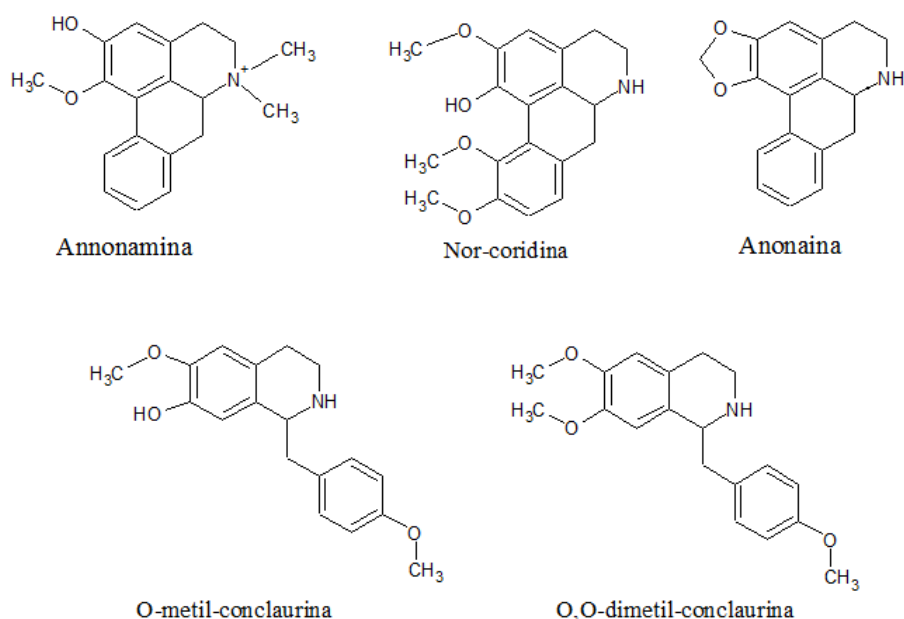
A família Annonaceae é composta de aproximadamente 2400 espécies distribuídas em 180 gêneros, tendo mais de 500 espécies, apresentando diversas substâncias alcaloídicas e não alcaloídicas. Os principais alcalóides são os do tipo aporfínicos, oxoaporfínicos (liriodenina; TAYLOR, 1961) e os tetraidroprotoberberínicos (Figura 1) (LEBOEUF et al., 1980).

Figura 1- Estrutura química dos alcalóides.



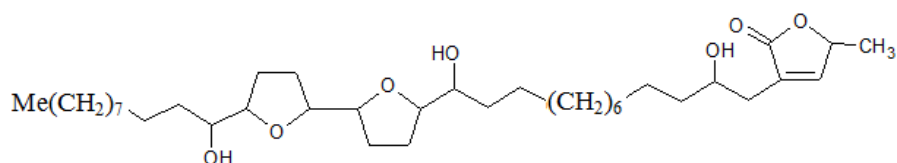
*Annona muricata*, é uma espécie da família anonácea, popularmente conhecida como gravioleira, é uma planta originária das Antilhas, onde se encontra em estado silvestre. Nos Andes do Peru, a folha é tradicionalmente usada como chá no tratamento de catarro excessivo. As sementes tem ação antiparasitária, as raízes e as folhas eram utilizadas para diabetes. Apresenta vários nomes populares como: araticum de comer, araticum do grande, araticum manso, araticum, jaca, jaca de pobre, coração, coração de rainha, jaca do Pará, jaqueira mole. Em Minas Gerais é também conhecida como pinha. No Maranhão é chamada jacama e fruta-pão. Angola é conhecida por sape-sape. Em Moçambique é conhecida como anona. Em nossa região, no estado do Pará é bastante apreciada pelo seu fruto, a graviola, o qual é usado para a preparação de sucos e sorvetes (LEIVA et al., 2018).

Várias classes de metabólitos secundários estão presentes nesta espécie, como os compostos fenólicos extraídos da polpa de frutos maduros, derivados do ácido cinâmico e do ácido p-cumárico, juntamente com vários outros compostos menores (JIMÉNEZ et al., 2014); óleos essenciais das folhas, obtidos por araste à vapor, que indicou a presença de 80 compostos, sendo os mais abundantes  $\beta$ -cariofileno (13,6%),  $\delta$ -cadineno (9,1%), epi- $\alpha$ -cadinol (8,4%),  $\alpha$ -cadinol (8,3%) (KOSSOUOH et al., 2007); alcalóides, como reticulina, coclaurina, coreximina, atherosperminina, estefarina, anomurina, anomuricina (LEBOEUF et al., 1981), anonaina, annonamina, nor-corina, O-metil-conclaurina, O,O-dimetil-conclaurina (MATSUSHIGE et al., 2012; Figura 2).

Figura 2- Alcalóides isolados de *A. muricata* (MATSUSHIGE et al., 2012).

Acetogeninas, bulatacina (HUI et al., 1989; Figura 3), muricinas (J, K, L; SUN et al., 2014), annonamuricinas (A, B, C e D; SUN et al., 2017), anomuricina E (MOGHADAMTOUSI et al., 2015), muricapentocina (KIM et al., 1998), annopentocinas (A, B e C), cis e trans-annonmuricinas-D-onas (ZEN et al., 1996), além de um provável precursor biossintético, a montecristina, que após epoxidação e reações subsequentes levou a uma acetogenina conhecida com um sistema do tipo bis-tetra-hidrofurano (GLEYE et al., 1997).

Figura 3- Estrutura química de bulatacin



Varias atividades biológicas são atribuídas para essa espécie, como benefícios a saúde em consequência da atividade antioxidante dos compostos fenólicos; aos alcalóides foram relatadas atividades antimicrobiológicas, anticancerígenas (WARTHEN et al., 1969), antifúngicas (DE LIMA et al., 2012), antimalárica e antibacteriana (NUGRAHA et al., 2019), as atividades anticancerígenas contra cânceres de pele não melanoma (CHAMCHEU et al., 2018), atividade parkinsoniana atípica (MATSUSHIGE et al., 2012). Por sua vez, as acetogeninas possuem também atividade leishmanicida (JARAMILLOA et al., 2000), antiproliferativas contra células PC-3 do câncer de próstata, câncer

pancreático (PACA-2), adenocarcinoma do cólon (HT-29), propriedades quimiopreventivas contra câncer induzido por azoximetano, 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno e 12,O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (RODUAN et al., 2017), entre outras.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Espectrômetro de massas Waters Acquity TQD e Cromatógrafo da linha Alliance e2695 (Waters) (Pós-Graduação em Química/UFGA).

### 2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados foram das marcas Aldrich, Vetec ou Nuclear, todos PA.

### 2.3 PROCEDIMENTO CROMATOGRÁFICO POR CLAE/DAD

O desenvolvimento do método cromatográfico para análise do extrato alcaloídico foi realizado em cromatógrafo da linha Alliance e2695 (Waters), com um sistema de bomba binário e injetor automático acoplado a um detector de UV/Vis com arranjo de diodo abrangendo a faixa de comprimento de onda de 210 – 600 nm. A fase estacionária foi uma coluna de fase reversa Sunfire C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), com coluna de guarda Sunfire C18 (20 mm x 4,6 mm, 0,5 µm) e fluxo de 1 mL/min em forno termostático a 40 °C. A amostra foi diluída em metanol grau HPLC (Jt Baker®) e posteriormente filtrada em membrana filtrante de nylon com poros de 0,45 µm, da marca Millipore (Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda). A fase móvel constituiu-se de uma mistura binária de água ultra pura (GEHAKA) e MeOH filtrado em gradiente exploratório linear de eluição na proporção do método de H<sub>2</sub>O-MeOH 90:10 a 0:100 de B em 60 min. A amostra foi injetada com um volume de 20 µL.

### 2.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ALCALOÍDICO:

Coleta: foram coletadas folhas verdes de planta oriunda de plantação da cidade de Belém-PA. As folhas foram secas em local arejado ao abrigo da luz à temperatura de 40°C e a pressão ambiente durante 7 dias. Posteriormente, foram triturados a fragmentos pequenos.

Preparação do Extrato Hexânico das Folhas: o extrato foi obtido a partir do material botânico triturado e seco (41,5g), que foi colocado em um recipiente de vidro com tampa e encoberto com hexano PA, durante 48hs. A solução hexânica obtida, foi filtrada e evaporada, fornecendo um resíduo (resíduo 1) semi-sólido de massa igual à 9,8g (25%).

Preparação do Extrato Alcaloídico das Folhas: o resíduo 1 (9,8g), obtido da solução hexânica foi dissolvido em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  PA e submetido a partição em ampola de decantação de 250 mL, com solução de ácido cítrico 5%, três vezes, para obtenção da solução ácida, com os alcalóides. A solução diclorometânica foi lavada com água destilada (3 vezes) e secada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada, fornecendo um resíduo (resíduo 2) de massa igual à 0,5g. A solução ácida coletada, foi basificada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  PA e submetida a extração novamente com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  PA em ampola de decantação de 250 mL, três vezes, para obtenção da solução diclorometânica contendo os alcalóides. Essa solução diclorometânica foi lavada com água destilada (3 vezes) e secada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada, fornecendo o extrato alcaloídico de massa igual à 0,1g.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato alcaloídico obtido foi analisado via HPLC (Figura 4) e foi verificada a presença de dois picos A (100%) e B (40%), ambos com uma absorção na região do ultravioleta de  $\lambda 239\text{nm}$ . Indicando tratar-se de um sistema conjugado.

O scan feito usando o Espectrometro de massas do extrato alcaloídico, indicou a presença de apenas um constituinte principal, com m/z igual a 265,3. Com base nesses dados e verificando a literatura, pode-se propor que o alcalóide em questão é a anonaina (mm 265g/mol;  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ ). Pelo espectro de massas (Figura 5) pode-se então verificar os demais fragmentos relativos aos íons negativos obtidos pela quebra da molécula, comum neste tipo de método, como a perda de água (265-18) m/z 247 e perda de gás carbônico (265-44) m/z 221 (JACKSON E MARTIN, 1966).

Figura 4- Cromatograma do extrato alcaloídico.

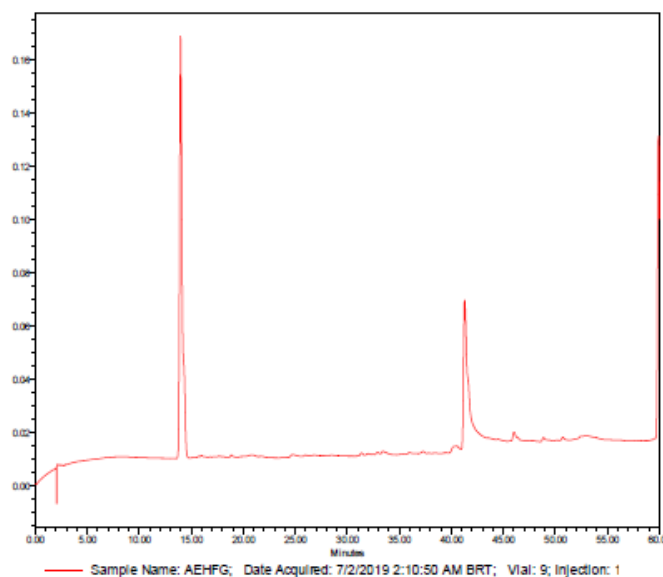
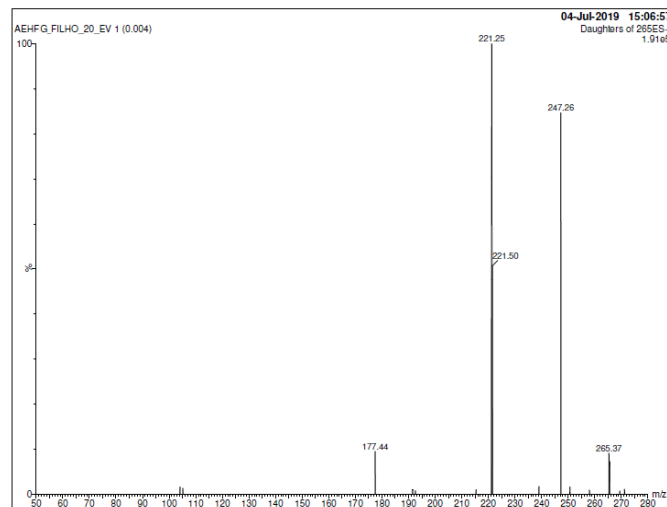


Figura 5- Espectro de massas de anonaina.



#### 4 CONCLUSÃO

O método de análise de HPLC em questão, demonstrou ser bastante eficiente, pelos dados obtidos, sem a necessidade de se fazer colunas de cromatografia clássica, bem como a espectrometria de massas, devido proporcionar a massa molar e os fragmentos da substância presente, indicando tratar-se do alcalóide anonaina, substância já relatada na literatura para esta espécie.

#### AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará e a EMBRAPA- Amazônia Oriental.

#### REFERÊNCIAS

CHAMCHEU, J. C.; RADY, I.; CHAMCHEU, R.-C. N.; SIDDIQUE, A. B.; BLOCH, M. B.; BANANG MBEUMI, S.; BABATUNDE, A. S.; UDDIN, M. B.; NOUBISSI, F.K.; JURUTKA, P. W.; LIU, Y.-Y.; SPIEGELMAN, V. S.; WHITFIELD, G. K.; EL SAYED, K. A. **Graviola (*Annona muricata*) Exerts Anti-Proliferative, Anti-Clonogenic and Pro-Apoptotic Effects in Human Non-Melanoma Skin Cancer UW-BCC1 and A431 Cells In Vitro: Involvement of Hedgehog Signaling.** *Int. J. Mol. Sci.* v. 19, nº 6, p. 1791, 2018.

DE LIMA, J. P. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. S.; SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; SILVA-JARDIM, I.; COSTA, E. V. **In Vitro Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae).** *Rev. Virtual Quim*, v. 4, nº 6, p. 692-702, 2012.

GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L. **Isolation of Montecristin, a Key Metabolite in Biogenesis of Acetogenins from *Annona muricata* and Its Structure Elucidation by Using Tandem Mass Spectrometry.** J. Org. Chem., v. 62, n° 3, p. 510-513, 1997.

HUI, Y.-H.; RUPPRECHT, J. K.; LIU, Y. M.; ANDERSON, J. E.; SMITH, D. L.; CHANG, C.-J.; MCLAUGHLIN, J. L. **Bullatacin and Bullatacinone: two Highly potent bioactive Acetogenins from *Annona Bullata*.** J. Nat. Prod. v. 52, n° 3, p. 463-477, 1989.

JACKSON, A. H. and MARTIN, J. A. **Steric effects in the mass spectra of aporphine alkaloids.** J. Chem. Soc. C. p. 2181-2183, 1966.

JARAMILLOA, M. C.; ARANGO, G. J.; GONZÁLEZ, M. C.; ROBLEDOS, S. M.; VELEZ, I. D. **Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp.** Fitoterapia. v. 71, p. 183-186, 2000.

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

KIM, G.-S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F.-E.; MCLAUGHLIN, J. L.; and SASTRODIHARDJO, S. **Two New Mono-Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, Annomuricin E and Muricapentocin, from the Leaves of *Annona muricata*.** J. Nat. Prod. v. 61, n° 4, p. 432-436, 1998.

KOSSOUOH, C.; MOUDACHIROU, M.; ADJAKIDJE, V.; CHALCHAT, J.-C.; GILLES FIGUÉRÉDO, G. **Essential Oil Chemical Composition of *Annona muricata* L. Leaves from Benin.** Journal of Essential Oil Research, v. 19, n° 4, p. 307-309, 2007.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B. M.; MUKHERJEE, R. **The Phytochemistry of the Annonaceae.** Phytochemistry. v. 21, n° 12, p. 2783-2813, 1980.



LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVÉ, A.; DESCONCLOIS, J. F.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. **Alkaloids of Annonaceae. XXIX. Alkaloids of *Annona muricata***. *Planta Med.*, v. 42, n° 5, p. 37-44, 1981.

LEIVA, S.; GAYOSO, G. and CHANG, L. ***Annona muricata* L. “guanábana” (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico**. *Arnaldoa* v. 25, n° 1, p. 127-140, 2018.

MATSUSHIGE, A.; KOTAKE, Y.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; OHTA, S. and TAKEDA, Y. **Annonamine, a New Aporphine Alkaloid from the Leaves of *Annona muricata***. *Chem. Pharm. Bull.* v. 60, n° 2, p. 257-259, 2012.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; ROUHOLLAHI, E.; KARIMIAN, H.; FADAEINASAB, M.; FIROOZINIA, M.; ABDULLA, M. A.; KADIR, H. A. **The Chemopotential Effect of *Annona muricata* Leaves against Azoxymethane Induced Colonic Aberrant Crypt Foci in Rats and the Apoptotic Effect of Acetogenin Annonamuricin E in HT-29 Cells: A Bioassay Guided Approach**. *PLoS ONE*, v. 10, n° 4, p. 1-28, 2015.

NUGRAHA, A. S.; HARITAKUN, R.; LAMBERT, J. M.; DILLON, C. T.; KELLER, P. A. **Alkaloids from the root of Indonesian *Annona muricata* L.** *Natural Product Research*, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2019.1638380. 2019.

RODUAN, M. R. M.; HAMID, R. A.; SULAIMAN, H.; MOHTARRUDIN, N. ***Annona muricata* leaves extracts prevent DMBA/TPA induced skin tumorigenesis via modulating antioxidants enzymes system in ICR mice**. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 94, p. 481-488, 2017.

SUN, S.; LIU, J.; KADOUH, H.; SUN, X.; ZHOU, K. **Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*)**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v 24, n° 12. p 2773-2776, 2014.

SUN, S.; LIU, J.; SUN, X.; ZHU, W.; YANG, F.; FELCZAK, L.; DOU, Q. P.; ZHOU, K. **Novel Annonaceous acetogenins from Graviola (*Annona muricata*) fruits with strong anti-proliferative activity**. *Tetrahedron Letters*, v. 58, n° 19, p. 1895-1899, 2017.

TAYLOR, W. I. **The Structure and Synthesis of Liriodenine a new type of Isoquinoline Alkaloid.** Tetrahedron. v. 14, p. 42-45, 1961.

WARTHEN, D.; GOODEN, E. L.; JACOBSON, M. **Tumor Inhibitors: Liriodenine, a Cytotoxic alkaloid from Annona glabra.** J. Pharm. Sci. v. 58, n° 5, p. 637-638, 1969.

ZENG, L.; WU, F.-E.; OBERLIES, N. H.; MCLAUGHLIN, J. L. and SASTRODIHADJO, S. **Five New Monotetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Leaves of Annona muricata.** J. Nat. Prod., v. 59, n° 11, p. 1035-1042, 1996.