

Estudo químico do extrato clorofórmico das folhas da *Annona muricata* L.

Chemical study of the chloroform extract of Annona muricata L. leaves



Maria Luiza da Silva Pereira

Graduanda do curso de Engenharia Química (UNIPAM). e-mail: marialuizapereirab@outlook.com

Karoline Pereira Ribeiro

Mestre em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Professora do UNIPAM. e-mail: karolinepr@unipam.edu.br

Resumo: *Annona muricata* L. é uma espécie que possui grandes folhas ovais e esverdeadas. Habita em solos secos, predominantemente dos cerrados. Essa espécie possui uma representatividade na flora brasileira e intenso uso como planta medicinal, possuindo alta atividade antibacteriana e uma ótima ação terapêutica. Devido à grande utilização desta planta na medicina popular, propôs-se uma prospecção química com as folhas de *A. muricata*. Para isso, foram realizados testes para identificação de cumarinas, alcaloides, flavonoides, triterpenos/esteroides, saponinas, quinonas/antraquinonas, taninos, resinas e glicosídeos cardiotônicos. Foi identificada a presença dos metabólitos secundários: alcalóides, saponinas, taninos e esteroides. Esses resultados levam em consideração que os extratos de *Annona muricata* L. testados, podem contribuir para avaliar o potencial farmacológico atribuído à planta. Esses resultados demonstram o potencial dessa espécie tanto para fonte de compostos antibacterianos como de analgésicos, necessitando assim de outros estudos.

PALAVRAS-CHAVE: *A. muricata* L. Extrato. Metabólitos Secundário. Farmacologia.

ABSTRACT: *Annona muricata* L. is a species that has large oval and greenish leaves. It inhabits dry soils, predominantly of cerrado. This species has a representativeness in the Brazilian flora and intense use as a medicinal plant possessing high antibacterial activity and a great therapeutic action. Due to the great use of this plant in popular medicine, it was proposed a chemical prospection with the leaves of *A. muricata*. For this, tests were performed to identify coumarins, alkaloids, flavonoids, triterpenes/steroids, saponins, quinones/antraquinones, tannins, resins and cardiotonic glycosides. The presence of secondary metabolites: alkaloids, saponins, tannins and steroids was identified. These results take into account that the extracts of *Annona muricata* L tested can contribute to evaluate the pharmacological potential attributed to the plant. These results demonstrate the potential of this species both for the source of antibacterial compounds and for analgesics, thus requiring other studies.

KEYWORDS: *A. muricata* L. Extract. Secondary metabolites. Pharmacology.

1. INTRODUÇÃO

A *Annona muricata L.* pertence à família Annonaceae e ao gênero *Annona*. É também conhecida como graviola, guanabara, araticum, coração-de-rainha, fruta-do-conde, jaca-do-pará, pinha, entre outros. Os frutos são do tipo baga com polpa mucilaginosa e levemente ácida. Originária da América tropical, principalmente das Antilhas e da América Central, é muito cultivada nos países de clima tropical, inclusive no Brasil (CORREA, 1984; VIEIRA, 2010).

O uso empírico de plantas medicinais por parte da população é milenar, despertando o interesse de muitos pesquisadores e visando o conhecimento sobre novas moléculas que possam ser usadas na terapêutica. O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, que, associada à rica diversidade étnica, torna o país o cenário ideal para o desenvolvimento de estudos voltados à comprovação de usos populares de plantas (FOGLIO, et al. 2006).

A análise química tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Segundo Falkenberg, Santos e Simões (1999), a triagem química possibilita conhecer os compostos químicos e avaliar a presença dos mesmos em uma determinada espécie vegetal. Para dar continuidade à descrição de um grupo de compostos químicos presentes em uma planta, primeiramente faz-se a extração de substâncias químicas com um determinado solvente, logo conhecido em extrato.

Os metabólitos secundários são considerados como produtos de excreção vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas. Os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, frequentemente possuem atividades biológicas importantes. Do ponto de vista farmacêutico, o maior interesse deriva essencialmente do número elevado de substâncias farmacologicamente importantes (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001), como é o caso de alcaloides, saponinas, cumarinas, taninos, entre outros.

De acordo com a medicina popular, todas as partes da árvore da graviola são utilizadas na medicina natural, ou seja, cascas, raízes, folhas, flores e sementes da fruta. Atualmente, o chá da *Annona muricata L.* é utilizado pela população em geral, devido às suas propriedades terapêuticas. A graviola mostra-se, portanto, com um grande potencial farmacológico, do ponto de vista de seu conteúdo de metabólitos secundários, fazendo-se necessário maiores investigações para isolamento e identificação dos compostos de interesse.

A determinação de metabólitos secundários é bastante importante, uma vez que a caracterização da parte orgânica se faz necessária para uma possível indicação alternativa de propriedades farmacológicas. Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar a composição química dos extratos de folha da *Annona muricata L.*, nos quais foram realizadas triagem química para a identificação dos metabólitos secundários presentes nesta, observando suas propriedades químicas e avaliando sua capacitação como planta medicinal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A família Annonaceae Jussieu compreende aproximadamente 135 gêneros,

que englobam 2500 espécies, com distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo (LOBÃO *et al.*, 2005; JOLY, 1993). A *Annona muricata* L possui árvore de aproximadamente 6 metros de altura, copa pequena e poucos ramos, folhas com disposição alternada e arrançadas em um único plano (filotaxia alternada) de tamanho 12-16cm de comprimento por 4-8cm de largura, com presença de pelos de cor ferrugíneos e brilhantes. Esta apresenta flores de aproximadamente 6 cm, de cor amarelada, sépalas em número de três e pétalas dispostas em duas séries de três de coloração amarelada. Os estames e os carpelos numerosos são dispostos em um receptáculo hemisférico, sendo os estames localizados na porção basal e os carpelos na apical (PRANCE; SILVA, 1976; CAVALCANTE, 1976; STEYEMARK *et al.*, 1997).

Estudos químicos com a *A. muricata* conduziram ao isolamento de compostos de diversas classes, tais como acetonemias, alcaloides, terpenoides, carboidratos, polifenóis, lipídeos e aminoácidos, sendo que algumas dessas substâncias estão associadas ao sequestro dos radicais livres formados nos processos degenerativos (VILA-NOVA *et al.*, 2013; ANGELO *et al.*, 2007).

Deste modo, a *A. muricata* está relacionada à prática médica popular, mais precisamente no uso de remédios utilizados em sistemas tradicionais e no estudo científico através de ativos biológicos, ou seja, existe uma relação quanto às informações obtidas através do conhecimento popular de plantas medicinais com análises químicas (ELIZABETSKY; SOUZA, 1999)

Nos frutos da *A. muricata* são encontrados açúcares, taninos, ácido ascórbico (vitamina C), pectinas, beta-caroteno (vitaminas A) e complexo B. O óleo obtido do fruto contém ésteres e compostos nitrogenados como as substâncias responsáveis pelo aroma. Estudos químicos revelam que as folhas contêm até 1,8% de óleo essencial rico em gama-cadineno e alfa-elemeno. Nas folhas, casca e raiz, encontram-se diversos alcaloides como reticulinas, coreximina, coclarina e anomurina. Diversas acetogeninas também podem ser encontradas nas folhas, casca e raízes (LORENZI; MATOS, 2002).

São utilizadas na medicina natural todas as partes da árvore da *Annona muricata* L. A literatura etnofarmacológica registra vários usos medicinais baseados no senso comum, que lhe atribui várias propriedades, embora a eficácia e a segurança de suas preparações não tenham sido totalmente comprovadas cientificamente (PEREIRA *et al.*, 2004; REIS, 2011).

O desenvolvimento de pesquisas de base, como a avaliação química, vem sendo utilizado para identificar a presença dos compostos químicos em espécies vegetais, identificando os grupos presentes em uma planta, dentre eles os fenólicos (FALKENBERG, SANTOS & SIMÕES, 1999).

3. METODOLOGIA

3.1. DELINEAMENTO E LOCAL DE ESTUDO

Este foi realizado nos laboratórios de ensino e pesquisa de Química do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Reagentes e equipamentos

Os reagentes utilizados nas análises foram de grau (P.A): acetona (Êxodo científica, Brasil), clorofórmio (Vetec Química Fina, Brasil), etanol, hidróxido de potássio, cloreto férrico, ácido acético, éter etílico, ácido clorídrico, hidróxido de amônio, reagentes de Dragendoff, Mayer e Bertrand, ácido sulfúrico, cloreto de alumínio, anidrido acético, água destilada e deionizada, solução metanoica, anisaldeído sulfúrico e cloreto de sódio.

Os equipamentos utilizados foram: Balança analítica da marca Tech Master (modelo BA437/01), estufa da marca odontobras (modelo EL-1.6), moinho de facas da marca Willye (modelo NL-226), extrator de Soxhlet, manta aquecedora da marca Fisatom (modelo 52), bomba d'água da marca Fisatom, evaporador rotatório da marca Fisatom (modelo 802), óculos, máscara.

3.2.1. Coleta e secagem do material vegetal

A coleta da planta *Annona Muricata* L. foi realizada na região de Presidente Olegário-MG. As folhas foram lavadas com água corrente para a retirada de terra, em seguida envolvidas com o papel kraft e levadas à estufa com uma temperatura de 40° C, para total remoção residual. Após a secagem, o material foi triturado em um moinho de facas até a obtenção do pó, originando a matéria-prima analisada.

3.2.2. Extração por extrator de Soxhlet

Uma amostra das folhas secas de *Annona muricata*, com aproximadamente 6g da matéria-prima foi submetida à extração em um extrator tipo soxhlet, com cerca de 300 mL de clorofórmio, durante 9 h. Este procedimento foi repetido mais quatro vezes, e após submeter-se ao roto-vapor, finalizou-se com um total de 4g de extraído.

O mesmo procedimento foi repetido, porém, a amostra das folhas de *Annona muricata* se encontrava in natura. Utilizou-se aproximadamente 6g da matéria-prima que foi submetida à extração em um extrator tipo soxhlet, com cerca de 300 mL de clorofórmio, durante 9h. Este procedimento foi repetido mais quatro vezes, e após submeter-se ao roto-vapor, finalizou-se com um total de 5,5 g de extraído.

3.3. ESTUDO QUÍMICO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Para a realização dos testes de metabólitos secundários, foram realizadas com o extrato clorofórmio, submetendo aos testes químicos, conforme metodologia de Bessa, Terrones, Santos (2007).

TABELA 1. Testes para identificação dos metabólitos secundários

Metabólito secundário	Teste
Cumarinas	Keller-killiani e teste de identificação (lâmpada UV).
Alcaloides	Dragendorff, Mayer e Bertand.
Flavonoides	Shinoda, Cloreto de Alumínio e Pew.
Triterpenos/Esteroides	Liebermann-Burchard.
Saponinas	Testes da espuma, Rossol e Komarovisk.
Quinonas/ Antraquinonas	Bornträger direta e com prévia hidrólise ácida.
Taninos	Cloreto férrico 10% e o teste de precipitação em gelatina incolor.
Resinas	Preparação de um extrato hidro alcoólico e após a filtragem do mesmo adiciona-se água e leva ao aquecimento.
Glicosídeos cardiotonios	Liebermann- Burchard e Keller-killiani.

Fonte: Bessa, Terrones e Santos (2007).

3.3.1. Identificação de cumarinas

Foi realizada a reação de Keller-Kiliani (ácido acético glacial, numa gota de cloreto férrico a 5% em metanol e ácido sulfúrico concentrado). Em um tubo de ensaio foram colocados 2,0 mL da solução metanólica e 3 gotas do extrato clorofórmio de *Annona muricata*, tampado com papel de filtro impregnado em solução 10% 12 de NaOH, levando ao banho de água a 100° C por alguns minutos. Removendo o papel de filtro, examinou-se sob luz UV. A fluorescência amarela indica a presença de cumarinas (BESSA; TERRONES; SANTOS, 2007)

3.3.2. Identificação de alcaloides

A 2,0 mL da solução metanólica foram adicionados 2,0 mL de HCl (10%). Essa mistura deve ser aquecida por 10 minutos, juntamente com 3 gotas do extrato clorofórmio de *Annona muricata*. Esperando esfriar, filtrou-se, dividindo o filtrado em três tubos de ensaios, acrescentando algumas gotas dos reativos de reconhecimento: Dragendorff, Mayer e Bertand. Uma leve turbidez ou precipitado (respectivamente roxo a laranja, branco a creme e marrom) evidenciou a possível presença deles (BESSA; TERRONES; SANTOS, 2007).

3.3.3. Identificação de flavonoides

Foram colocados em um tubo 2,0 mL da solução metanólica, alguns fragmentos de Mg e agregados, pelas paredes do tubo, algumas gotas de HCl diluído

juntamente a 1 mL do extrato clorofórmio de *Annona muricata*. Observou-se a coloração, que varia para as diferentes estruturas (BESSA; TERRONES; SANTOS, 2007).

3.3.4. Identificação de esteroides e triterpenos

A 2,0 mL da solução metanólica foram adicionados 5,0 mL de clorofórmio, filtrando e dividindo o filtrado em duas porções. Em cada um dos tubos realizaram-se as reações de Liebermann Burchard e Salkowski, acrescentadas ao extrato clorofórmico de *Annona muricata*. Os triterpenos desenvolvem coloração estável e os esteroides desenvolvem coloração mutável com o tempo (BESSA; TERRONES; SANTOS, 2007).

3.3.5. Identificação de saponinas

Em 1 mL do extrato clorofórmio de *Annona muricata* foram adicionados 2,0 mL da solução metanólica e adicionados 5,0 mL de água fervendo. Ao esfriar, o composto foi agitado vigorosamente e deixado em repouso por 20 minutos. Classifica-se a presença de saponinas pela formação de espumas (BESSA; TERRONES; SANTOS, 2007).

3.3.6. Identificação de taninos

Em 1 mL do extrato clorofórmio de *Annona muricata* foram adicionados 2,0 mL da solução metanólica e adicionados 5,0 mL de água destilada. Foi filtrada e adicionada 1 ou 2 gotas de solução de cloreto férrico a 10%. A coloração azul indica possível presença de taninos hidrolisáveis, e a coloração verde, de taninos condensados (BESSA; TERRONES; SANTOS, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos testes realizados em laboratório, foram determinados os princípios ativos presente ao extrato de clorofórmio das folhas de *Annona Muricata* L. *in natura*, observando resultado positivo para alcaloides, saponinas, taninos e esteroides. Para as folhas secas a 40°C observou-se resultado positivo para alcaloides, taninos e esteroides, divergindo o teste de saponinas na avaliação das folhas (Tabela 2, na página seguinte). Os resultados foram comparados com a literatura *Alfaia; Almeida (2015).

Ballvé (1985) ressalta que, na obtenção dos alcaloides, quando há evidência de uma leve turbidez ou precipitado, isso indica presença deles, o que foi visualizado neste experimento, obtendo-se um resultado positivo para os testes com a folha seca a 40° C e *in natura*.

Para as saponinas, é necessária a presença de espuma. Esse aspecto foi confirmado nos testes com as folhas *in natura*, divergindo com o resultado encontrado com extrato das folhas secas a 40° C. Esta diferença de resultado pode ter ocorrido em função do calor, que teria degradado a propriedade química.

Para taninos a coloração azul representa presença de taninos hidrolisáveis,

e a verde, de taninos condensados. Para este estudo, os extratos tiveram presença apenas de taninos hidrolisáveis, em ambos extratos. Porém, divergiram com os resultados encontrados de Alfaia e Almeida (2015), que apresentaram negativo para taninos, podendo esta ser justificada pela diferença de região ou metodologia utilizada.

TABELA 2. Avaliação dos princípios ativos encontrados nas folhas da espécie *Annona Muricata L.*

Metabolitos Secundários	Folhas de <i>Annona Muricata L. in natura</i>	Folhas de <i>Annona Muricata L. seca a 40° C</i>	Folhas de <i>Annona Muricata L.*</i>
Cumarina	-	-	-
Alcaloides	+	+	+
Flavonoides	-	-	-
Saponinas	+	-	+
Taninos	+	+	-
Esteroides e Triterpenos	+	+	+

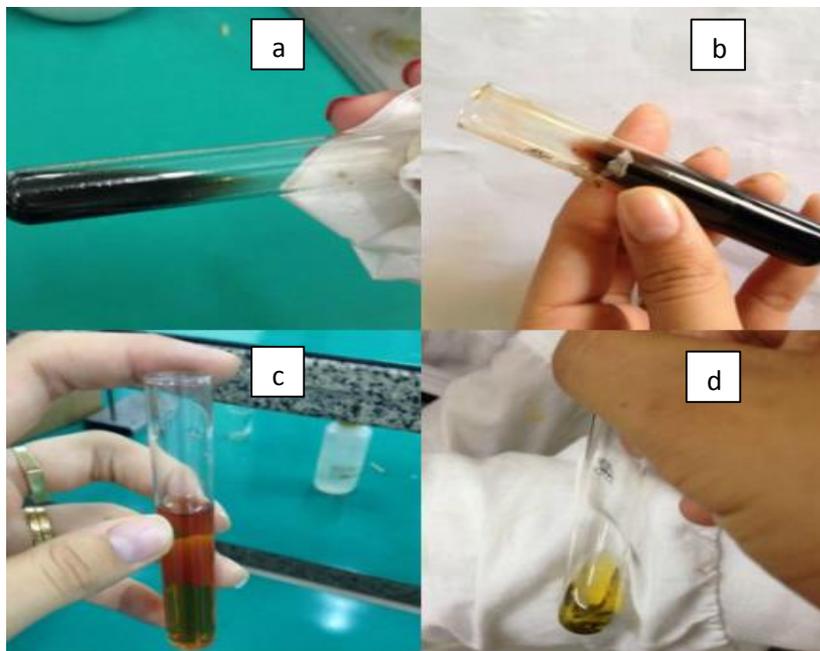
Fonte: Dados do autor, 2017. *Alfaia; Almeida, 2015.

O teste para triterpenos foi identificado por coloração, que varia de vermelho a marrom, sendo resultado positivo. Soldi (2007, p. 14) diz que “triterpenos são compostos caracterizados por exibir uma ampla faixa de atividades biológicas incluindo atividade antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antinociceptiva, gastroprotetiva, hepatoprotetiva e cardioprotetiva”.

A presença de metabólitos secundários na planta nos indica a presença de constituintes que podem ser utilizados em diversas enfermidades. É o caso dos alcaloides que, devido à presença de nitrogênio, em sua maioria apresentam propriedades essenciais e forte atividade fisiológica (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). As plantas que possuem saponinas são empregadas também por sua ação mucolítica, diurética e depurativa (TESKE; TRENTINI, 1995). Os taninos exercem ação adstringente, antidiarreica e antisséptica (TESKE; TRRENTINI, 1995).

Em síntese, a avaliação química feita através da metodologia de Bessa, Terrones e Santos (2007), que obtiveram resultados positivos com relação à presença de alguns metabólitos secundários, como alcaloides, saponinas, taninos hidrolisáveis, esteroides e triterpenos. Na figura 1, apresentam-se as imagens destes resultados realizados em laboratório.

FIGURA 1. Resultados dos princípios ativos encontrados nas folhas da espécie *Annona*: taninos (a), esteróides e triterpenos (b), alcaloides (c) e saponinas (d)



5. CONCLUSÃO

De acordo com resultados encontrados neste estudo, constatou-se que as classes de metabólitos secundários presentes em *A. muricata* são alcaloides, saponinas, taninos hidrolisáveis, esteroides e triterpenos, os quais apresentam atividades farmacológicas contra várias doenças descritas na literatura, sendo também os mesmos já descritos em vários estudos realizados com as diversas espécies deste gênero. Esses resultados demonstram o potencial dessa espécie tanto para fonte de compostos antibacterianos como de analgésicos, necessitando assim de outros estudos.

Dessa forma, é de grande importância obter a avaliação microbiológica, e a verificação do efeito anticarcinogênico associada à farmacognosia pode fornecer subsídios para investigação da atividade fitoterápica dessa planta.

REFERÊNCIAS

ALFAIA, Daiani Patrícia Silva; ALMEIDA, Sheylla Susan Moreida da Silva de. *Avaliação fitoquímica, análise citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas de Annona muricata L. (Annonaceae)*. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v-6.p-26-30>>. Acesso em: 23 out. 2017.

- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66(1): 1-9, 2007.
- BALLVÉ, C. A. *et al* Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul, *Caderno de Farmácia*, 1(2): 83-94, 1985. Disponível em: <http://pesquisa.bvsalud.org/brasil/resource/pt/lil-31767>. Acesso em: 02 jul. 2017.
- BESSA, Tatiana; TERRONES, Manuel Gonzalo Hernandez; SANTOS, Douglas Queiroz. *Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de Cenchrus echinatus*. 2007. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizonte-cientifico/article/viewFile/3873/2878>>. Acesso em: 02 mar. 2017.
- CAVALCANTE, P.B. *Frutas comestíveis da Amazônia*. 2 ed. Belém: Ed. Museu Paraense Emilio Goeldi, 1976, p. 24-26.
- CORRÊA, M. P. *Dicionário de plantas medicinais do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de desenvolvimento Florestal, v. 6, n. 3, p. 646. Graviola do Norte, 1984.
- ELISABETSKY, Elaine; SOUZA, Gabriela Coelho. "Etnofarmacologia como Ferramenta na Busca de Substâncias Ativas", in: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1999, pp. 107-108.
- FALKENBERG, Miriam de Barcellos; SANTOS, Rosana Isabel; SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira. "Introdução à Análise Fitoquímica", in: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1999.
- _____. "Introdução à Análise Fotoquímica", in: SIMÕES, C. *et al*. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. in: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 1999.
- FOGLIO, Mary Ann. *et al*. *Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar*. Campinas-SP: Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf. Acesso em: 29 jan. 2017.
- JOLY, A. B. "Botânica", in: *Introdução à toxamonia vegetal*. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993
- LOBÃO, A. Q.; ARAÚJO, D. S. D.; KURTZ, B. C. Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia*, 56(87): 85-96, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais do Brasil nativas e exóticas*. Nova Odessa: Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2002, pp. 60-61.
- PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes-RJ. *Revista Brasileira de Farmacognosia*,

14(1): 40-44, 2004.

PRANCE, G.T.; SILVA, M.F. *Árvores de Manaus*. Manaus: Ed. INPA, 1975, p.44-48.

REIS, C. N. *Annona muricata*: análise química e biológica dos frutos de gravioleira. Rio de Janeiro, Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2011. 150p.

ROBBERS, J; SPEEDIE, M. K; TYLER, V. E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. São Paulo: Premier, 1997.

STEYEMARK, J.A. *et al.* « Annonaceae” in: STEYEMARK, J.A. *et al.* Flora of the Venezuelan Guayana. St. Louis: Ed. The Missouri Botanical Garden Press, 1997, vol. 2.

STASI, L. C. *Plantas medicinais: arte e ciência*. Um Guia de Estudo Interdisciplinar. São Paulo: Unesp, 1995.

TESKE, M; TRENTINI, A. M. *Herbarium*: compêndio de Fitoterapia. 3 ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995.

VILA-NOVA, N. S. *et al.* Different susceptibilities of *Leishmania spp.* promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone, *Experimental Parasitology*, v. 133, p. 334-338, 2013.

VIEIRA, G. H. F. *et al.* Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria, *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 52(3): 129-132, maio/jun., 2010.