

**VARIAÇÃO SAZONAL DOS COMPONENTES DE**  
***Annona cacans* WARMING**

**Seasonal Variation of *Annona cacans* Warming Composition**

Maria Lucia Saito<sup>1</sup>  
Fernando de Oliveira<sup>2</sup>

**SUMÁRIO:** Através de análise gravimétrica de alcalóides e cromatografia comparativa de extratos de caule e folha de *Annona cacans* Warming coletados em 4 diferentes estações do ano observou-se alteração acentuada no teor das diversas substâncias isoladas deste vegetal. No inverno o teor de alcalóides básicos do caule cai a nível muito baixo, elevando-se ao máximo na primavera. Os alcalóides lactâmicos e a oxoaporfina liriodenina estão presentes em todos os materiais, e os flavonóides estão presentes no verão e ausentes na primavera, quando o teor de alcalóides é o maior possível. Pode ser observado também diminuição do teor de estefarina, considerado precursor biossintético dos alcalóides asimilobina e michelalbina, quando estas últimas aparecem. Salienta-se a importância do estudo fitoquímico em diversas épocas do ano, para evitar conclusões equivocadas a respeito da presença ou ausência de determinadas substâncias.

**UNITERMOS:** *Annona cacans*, variação de composição, alcalóides, flavonóides.

---

<sup>1</sup> Pesquisadora do Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura / EMBRAPA,

<sup>2</sup> Prof. Titular da Universidade São Francisco

## INTRODUÇÃO

*Annona cacans* Warming, é uma das cerca de 140 espécies pertencentes ao gênero *Annona* L. (Annonaceae), e pode ser encontrada nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (1,2,3).

Esta espécie é curiosamente conhecida pelo povo como "araticum cagão" e "cortiça cagão", ressaltando a propriedade laxante do fruto. Outros nomes atribuídos à espécie são "fruta da quaresma", "araticum de paca" e "graviola do mato", este último não constante da literatura, porém freqüente em etiquetas de exsiccatas depositadas em herbário.

Existe na literatura, inúmeras menções sobre atividades medicinais de espécies do gênero *Annona* L. como a atividade antimicrobiana (4,5), atividade anti-helmíntica (6), citotóxica (7) e antitumorais (8,9,10).

São comuns também citações sobre atividades inseticidas nas espécies do gênero *Annona* L. como as atividades apresentadas por acetogeninas (9,11), ou outros componentes (12,13,14).

Durante o estudo químico da espécie *Annona cacans* (15,16), foi observado diferença acentuada entre as composições de caules de coletas diferentes (julho e outubro), principalmente quanto ao conteúdo alcaloídico, motivando-nos a pesquisar a variação sazonal dos componentes. Nesse trabalho foram isolados os alcalóides estefarina, asimilobina, michelalbina, liriiodenina, aristololactamas B-II e A-II.

## OBJETIVO

Verificar a variação da composição química de *Annona cacans* Warming em diferentes épocas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais destinados a este estudo, constituídos de caule e folhas, foram coletados no parque do Instituto de Botânica de São Paulo. Exsicata de referência foi depositada no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, sob nº SP-205.260.

Para o estudo comparativo de composição de alcalóides e flavanonas em diferentes épocas do ano, foram utilizados caules coletados nos meses de: fevereiro de 88 (verão), outubro de 88 (primavera), abril de 89 (outono), julho de 89 (inverno). Quanto às folhas, foram utilizados materiais coletados em fevereiro de 88.

Foram utilizadas misturas alcaloidicas obtidas de caules coletados em outubro de 88 (caule 2, primavera), fevereiro de 88 (caule 3, verão), abril de 89 (caule 4, outono), julho de 89 (caule 5, inverno) e outubro de 89 (caule 6, ~~outono~~ <sup>primavera</sup>).

Como padrão para comparação cromatográfica dos componentes, foram utilizados aqueles isolados em trabalhos anteriores (15,16), sendo dois flavonóides (5-OH, 7,3'4'-MeOH flavanona (1) e 4',5-diOH 3',7-MeOH flavanona (2)) e os alcalóides: liriodenina (7), aristolactamas BII (9) e AII (10) e os derivados acetilados de: asimilobina (5), michelalbina (6), estefarina (11).

### - Processo de Extração de Alcalóides

Os alcalóides menos básicos, como as lactamas e oxoaporfinas, foram extraídas do extrato etanólico com clorofórmio antes da extração dos outros alcalóides.

Uma parte do extrato alcóolico (caule e folha separadamente) foi redissolvido em água e filtrado. O resíduo foi lavado diversas vezes com pequena quantidade de água, até que se obtivesse solução clara. A fração aquosa alcaloidica do extrato foi alcalinizada para pH próximo de 9 com hidróxido de amônio e extraída com clorofórmio por 5 a 6 vezes. As frações clorofórmicas assim obtidas, foram filtradas através de

algodão hidrófilo e reunidas em outro funil de separação. A fase aquosa extraída foi reservada e a orgânica foi extraída com água acidulada. Na 1ª extração foi utilizado HCl a aproximadamente 0.3 %. Da 2ª extração em diante foi utilizado HCl a 0.1 %, e a extração foi repetida por aproximadamente 5 vezes.

A fração aquosa ácida contendo os alcalóides na forma de sal foi também filtrada através de algodão e reunida em outro funil. Esta fração foi novamente alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9 e reextraída com clorofórmio. Obteve-se assim a mistura de alcalóides na forma livre.

A mistura de alcalóides utilizados para comparação cromatográfica foi acetilada para evitar decomposição durante o trabalho.

#### - Cromatografia Analítica em Camada Delgada

As placas de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizadas na comparação sazonal dos extratos, foram preparadas com silicagel GF na espessura de 0.2 mm. Os cromatogramas foram desenvolvidos em cuba saturada, com desenvolvimento ascendente, simples, e o percurso foi de 10 cm. Os extratos foram diluídos com 5 ml do solvente utilizado na extração e aplicados com seringa na quantidade de 5 microlitros cada. Os padrões foram colocados na quantidade adequada para a visualização, sem sobrecarregar a mancha. Após o desenvolvimento, a visualização foi feita com luz ultravioleta de 366 nm para os flavonóides e alcalóides fluorescentes. Os cromatogramas contendo flavonóides foram nebulizados com solução metanólica a 5 % de  $AlCl_3$  e secas, antes da observação em luz UV 366 nm.

Os cromatogramas contendo alcalóides em geral foram primeiro visualizados com luz UV a 366 e 254 nm e depois nebulizados com reativo de Dragendorff e observados à luz natural. As quantidades foram avaliadas de acordo com a intensidade das manchas.

## RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das extrações e comparações cromatográficas foram:

### 1 - Teor alcalóidico em diversas épocas

Quantidades de alcalóides dos diversos materiais trabalhados (alcalóides básicos totais)

materiais	alcalóides (g/100g de material)
caule 2 - outubro/88	0,066
caule 3 - fevereiro/88	0,068
caule 4 - abril/89	0,033
caule 5 - julho/89	0,003
casca - outubro/89	0,077
lenho - outubro/89	0,033
extrato EtOH folha	0,009
extrato CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> da folha	0,002

### 2 - Dados cromatográficos:

As seguintes tabelas expressam os resultados comparativos das composições dos diversos extratos:

**Tabela 1** - Comparação cromatográfica entre os componentes das misturas de alcalóides acetilados (FE=silicagel GF; FM=CHCl<sub>3</sub>-Ac. etila 3:2).

material	subst.	5	6	11	7
caule-fevereiro/88		2	1	tr	1
caule-abril/89		3	2	1	3
caule-julho/89		1	1	1	1
casca-out/89		3	2	tr	1
lenho-out/89		3	2	tr	0
folha-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		1	1	0	1
folha-etanol		1	1	0	0
hRf:		42	35	15	32

3 = grande quantidade, 2 = média quantidade, 1 = pequena quantidade; tr=traços; 0 = não detectado.

**Tabela 2** - Comparação cromatográfica entre componentes dos extratos hexânico e clorofórmico de lenho e casca - (FE= silicagel GF; FM=CHCl<sub>3</sub>-Ac. etila 3:2)

extrato	subst.:	9	10	7
hexânico de lenho		0	0	0
hexânico de casca		2	2	1
clorofórmico de lenho		2	1	1
clorofórmico de casca		2	2	2
hRf:		45	25	30

2 = média quantidade, 1 = pequena quantidade, 0 = não detectado.

**Tabela 3 - Resultado da CCD dos extratos hexânicos e diclorometânicos de diversas coletas. (FE=silicagel GF, FM= clorofórmio-hexano 7:3)**

extrato	subst.	1	2	9	10	7
hex. 2		1	1	1	1	-
hex. 4		2	1	2	2	-
hex. 7		tr	0	1	2	-
hex. 10		0	0	1	1	-
DCM-2		1	1	2	2	2
DCM-4		2	1	3	3	2
DCM-7		0	0	2	2	2
DCM-10		0	0	2	1	2
hRf:		85	70	45	15	18

hex = extrato hexânico; DCM = extrato diclorometânico; 2,4,7,10 respectivamente: materiais coletados em fevereiro, abril, julho e outubro. 3= quantidade grande, 2= média quantidade, 1= pequena quantidade, tr= traços, 0 = não detectada; - = não testada.

**Tabela 4 - Resultados da CCD dos extratos acetato de etila das diversas amostras de caule. (FE=silicagel GF; FM= clorofórmio-hexano-acetato de etila 7:3:1).**

material	subst.	1	2	9	10	8	7
fevereiro		1	tr	2	2	0	tr
abril		1	tr	2	2	1	1
julho		tr	0	3	3	tr	tr
outubro		0	0	2	1	1	1
hRf:		75	56	30	10	12	15

Os números indicam quantidades das substâncias: 3=grande, 2= média, 1=pequena, tr= traços, 0=não detectada

Observamos que, quanto ao teor alcaloídico (alcalóides com caráter mais básicos), os maiores valores são registrados em outubro, na primavera (0,066%) e fevereiro, no verão (0,068%). Teor menor foi observado em julho (0,003%), sendo que, nessa época o vegetal não apresentava folhas. No mês de abril (outono) apresentou teor intermediário entre verão e inverno (0,033%), indicando que o teor alcaloídico diminui do verão até o inverno, e volta a crescer na primavera, quando novas folhas aparecem.

No material coletado na primavera foi feito também estudo comparativo do teor alcaloídico entre lenho e casca, sendo maior o conteúdo deste último, embora, em peso, a casca represente menos que 40% do peso do caule. Outro fato que chamou a atenção foi a menor presença da substância 7 no lenho.

A tabela 1 mostra a variação relativa dos alcalóides, que foram identificados através de padrões dos componentes isolados deste vegetal. Nos caules de fevereiro, abril e outubro, nota-se quantidade relativa maior da substância 5 (asimilobina), o que não foi observado em julho, quando o teor alcaloídico cai a nível mais baixo. Observou-se também, diminuição da quantidade de proaporfina (subst. 11) nos meses em que os alcalóides 'asimilobina' (subst. 5) e 'michelalbina' (subst. 6) apareciam aumentados.

Nas folhas foram verificados teores muito baixos desses alcalóides e, a tabela 1 mostra que os componentes estão presentes em quantidades pequenas.

A tabela 2 mostra ausência dos alcalóides aristololactâmicos e oxoaporfínicos no extrato hexânico de lenho, e presença no hexânico de casca, diclorometânico de lenho e casca.

A observação da tabela 3, referente ao extrato hexânico permite constatar que a substância 1 (flavanona) está presente no vegetal nos meses de fevereiro e abril, diminuindo bastante a partir desta época, chegando mesmo a estar ausente no mês de outubro. Este fato pode ser constatado também no extrato diclorometânico.

Com relação às aristololactamas (subst. 9 e 10), pelas tabelas 3 e 4 verificamos que a substância 9 está presente em todos os extratos,



ocorrendo em maior quantidade nos extratos de abril. O componente 10 está também presente em todos os extratos, ocorrendo em menor quantidade no do mês de outubro.

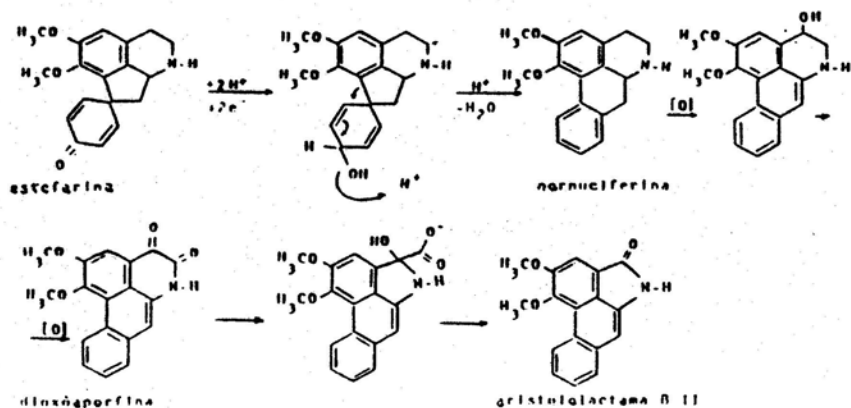
A substância 7 (liriodenina) está presente em todos os extratos, ocorrendo entretanto, em quantidades reduzidas nos meses de fevereiro e julho. Finalmente, a substância 8 acha-se ausente no extrato de fevereiro, e presente em quantidade reduzida no mês de julho.

O extrato etanólico apresenta composição complexa, com muitas manchas superpostas formando caudas, sendo de difícil interpretação. Entretanto a presença das aristolactamas (subst.9 e 10) e liriodenina (subst.7), que apresentam fluorescência, puderam ser constatadas.

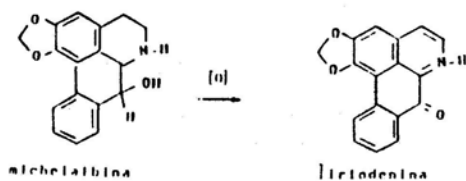
As aristolactamas (subst.9 e 10) e liriodenina (subst.7) estão presentes em quase todas as épocas do ano, e em todos os extratos: desde o extrato hexânico até o etanólico, sendo que em quantidade menor nos extratos hexânico, provavelmente devido à menor solubilidade nesse solvente.

Considerando que as coletas foram feitas no mesmo local e de árvores em estado de desenvolvimento semelhantes, os resultados deste estudo justifica o fato de não se ter conseguido isolar alcalóides (exceto as aristolactamas) do caule coletado em julho, pois nesse mês os alcalóides com caráter mais básicos estão presentes em quantidade muito pequena.

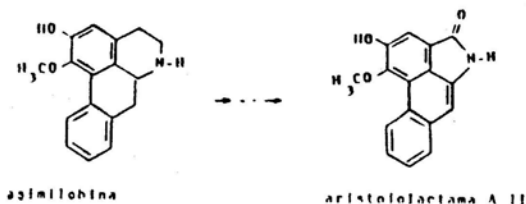
Algumas observações destas análises de presença/ausência dos alcalóides podem ainda ser confrontados com a via biossintética mais aceita para os aporfínicos. A observação do caminho biossintético (fig. 1) atualmente aceita para os aporfínicos, nos mostra uma interrelação entre os alcalóides isolados de *Annona cacans* Warming e mostra que a proaporfina estefarina está relacionada com a aristolactama B-II:



A presença concomitante de 'michelalbina' e 'liriodenina' no vegetal em estudo, é uma evidência a mais no sentido de considerar a segunda substância como originária da primeira (figura 2):



e observa-se também que pode existir uma relação entre a aristolactama A-II e a assimilobina (figura 3):



Outro fato que nos chamou a atenção, nos estudos sobre a variação sazonal dos extratos, é a diminuição da quantidade de proaporfina nos meses em que os alcalóides 'asimilobina' e 'michelalbina' apareciam aumentados, sendo o primeiro em maior quantidade. Na biossíntese desses dois últimos alcalóides a proaporfina aparece como a precursora de ambas.

Através desse raciocínio, o alcalóide 1,2-dimetoxi noraporfina (nornuciferina) pode estar presente no vegetal, assim como os intermediários dioxoaporfínicos das aristolactamas. Esses alcalóides não foram isolados no trabalho de análise da composição química.

O resultado da observação dos cromatogramas, comparativamente, permite pôr em evidência, que a quantidade de um determinado metabólito secundário pode variar no vegetal nas diversas estações do ano, podendo mesmo estar presente em uma determinada época e estar ausente em outra.

Pelos fatos mencionados reforçamos a idéia de que no estudo químico de vegetais existe conveniência de se efetuar mais de uma coleta, de preferência em estações diversas do ano.

Este fato assume relevância em quimiossistemática, principalmente quando se está cotizando presença ou ausência de determinado metabólito em determinado taxon. Assim, coleta efetuada numa determinada época pode levar a resultado positivo, ao passo que em outra época pode levar a resultado negativo. O mesmo pode ser dito quando se efetua análises com diversas partes da planta como por exemplo casca e lenho de caules.

SUMMARY: The gravimetric and comparative chromatographic analysis of extracts of *Annona cacans* Warming stem and leaves collected at four different seasons, showed different quantity of substances isolated from this plant.

At winter, when the leaves are absent, the basic alkaloids is present in the minimum quantity and

the maximum presence is observed at spring, when new leaves are present. In this last season, the flavonoid level is low.

The stepharine, a biossintetic precursor of asimilobine and michelalbine vanish as the two last alkaloids appear. It is pointed out the importance of studying the plant chemistry at different period of year to avoid mistake in the analysis of the chemistry of certain plant species.

UNITERMS: *Annona cacans*, variation of composition, alkaloids, flavonoids.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ANGELY, J. - *Flora Analítica e Fitogeográfica do Estado de São Paulo*. São Paulo: Ed. Phytton, 1969 V-1, p.111-4.
02. ANGELY, J. - *Flora Analítica do Paraná*, Curitiba: Ed. Phytton, 1965, p.331-3.
03. REITZ, P. R. et KLEIN, R. M. - O reino vegetal de Rio do Sul. *Sellowia*, 16: 9-118, 1964.
04. VILLAR DEL FRESNO, A.; ARAMBUL, M. M. et CAÑAVATE, J. L. R. - Propriétés antimicrobiennes des feuilles d'*Annona cherimolia* Mill. *Plantes Med. Phytother.* 17 (4): 230-5, 1983.
05. WU, T. S.; JONG, T. T.; TIEN, H. J.; KUOH, C. S.; FURUKAWA, H. et LEE, K. H. - Annoquinone-A, an antimicrobial and cytotoxic principle from *Annona montana*. - *Phytochemistry*, 26(6): 1623-1625, 1987.
06. MACKIE, A et MISRA, A. L. - Chemical investigation of the leaves of *Annona senegalensis*. I.- Constituents of the leaf wax. *J.Sci.Food Agric.*, 7 (3), 203-9, 1956.
07. CORTES, D.; RIOS, J. L.; VILLAR, A. et VALVERDE, S. - Cherimoline et dihydrocherimoline: deux nouvelles  $\gamma$ -lactones bis-tetrahydrofuranniques possédant une activité antimicrobienne. - *Tetrahedron Letters*, 25 (30): 3199-3202, 1984.

LECTA - USF, Brag. Pta., vol 12, nº 2, pp. 49 a 62, 1994

08. ADESOGAN, E.K. et DURODOLA, J.I. - Antitumour and antibiotic principles of *Annona senegalensis*. - **Phytochemistry**, 15 (8): 1311-12, 1976.
09. HUI, Y.H.; RUPPRECHT, J.K.; LIU, Y.M.; ANDERSON, J.E.; SMITH, D.L.; CHANG, C.J. et McLAUGHLIN, J.L. - Bullatacin and bullatacinone: two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*. - **J.Nat. Prod.** 52 (3): 463-477, 1989.
10. WARTHEN, D.; GOODEN, E.L. et JACOBSON, M. - Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. **J.Pharm.Sci** 58 (5): 637-8, 1969.
11. MIKOLAJCZAK, K.L.; McLAUGHLIN, J.L. et RUPPRECHT, J.K. - Control of pests with *Annonaceous acetogenins*. (U.S. Dept.Agric.) U.S.Pat.Appl. US 860.351 26 sp. 1986, Appl 06 may 1986; 28pp. Avail NTIS order n° Pat. Appl- 6.860.351. in CA 106: 63.044.
12. BEYE, F. - Insecticides from the vegetable kingdom. **Plant Reserch and development**, 7, 13-31, 1978.
13. HARPER, S.H.; POTTER, C. et GILLHAM, E.M. - *Annona* species as insecticides. **Annals of Applied Biology**, 34: 104-7, 1947.
14. HEAL, R.E.; ROGERS, E.F.; WALLACE, R.T. et STARNES, O. - A survey of plants for insecticidal activity - **Lloydia**, 13, 89-162, 1950.
15. SAITO, M.L. et ALVARENGA, M.A. Alkaloids of *Annona cacans* Warming. **Fitoterapia**, 65(1): 87, 1994.
16. SAITO, M.L. et ALVARENGA, M.A. **Phytochemical study of *Annona cacans* Warming. II (no prelo).**