

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA**

ANA CRISTINA COSTA MOTA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CASCA DO CAULE
DA ESPÉCIE VEGETAL ARATICUM BRAVO (*Annona tomentosa* R. E. Fr.)**

SÃO LUIS, MA

2016

Ana Cristina Costa Mota

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CASCA DO CAULE
DA ESPÉCIE VEGETAL ARATICUM BRAVO (*Annona tomentosa* R. E. Fr.)**

Monografia apresentada junto
à coordenação do curso de
Química Licenciatura como
requisito parcial para obtenção
do grau de Licenciada em
Química.

SÃO LUIS, MA

2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Mota, Ana Cristina Costa.

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CASCA DO CAULE DA ESPÉCIE VEGETAL ARATICUM BRAVO *Annona tomentosa* R. E. Fr / Ana Cristina Costa Mota. - 2016.
66 p.

Orientador(a): Profa. Dra. Joselene Ribeiro de Jesus Santos.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, UFMA - São Luís MA, 2016.

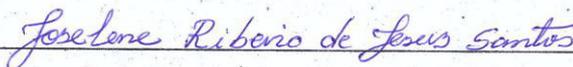
1. Annonacea. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Triagem fitoquímica. I. Jesus Santos, Profa. Dra. Joselene Ribeiro de. II. Título.

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CASCA DO CAULE
DA ESPÉCIE VEGETAL ARATICUM BRAVO (*Annona tomentosa* R. E. Fr.)

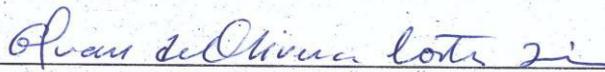
ANA CRISTINA COSTA MOTA

Aprovada em: 24 / 08 / 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Joselene Ribeiro de Jesus Santos
Orientadora
Departamento de Química - UFMA



Prof. Dr. Gilvan de Oliveira Costa Dias
Departamento de Química - UFMA



Profa. Ms. Francisca Socorro Nascimento Taveira
Departamento de Química - UFMA

AGRADECIMENTOS

Á Deus, em primeiro lugar, pelas bênçãos concedidas e pelas vitórias alcançadas, pois nada seria possível sem a sua vontade.

Aos meus pais, Vicente Ferrer Mota e Marizete Costa pela educação, dedicação, amor e carinho em todos os momentos.

Ás minhas irmãs, Celiane, Ana Célia e Luana, por estarem sempre ao meu lado com muito amor e paciência.

Ao meu tio Paulo Mota, que sempre me ajudou e acreditou na minha vitória.

Ao meu namorado Pedro Veras, pelo companheirismo, amor, amizade, incentivo e colaboração durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu amigo irmão Marcos Bispo, a quem eu devo um agradecimento muito especial, pela disponibilidade e ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho a quem eu tenho muito respeito e admiração.

Aos meus amigos, Helany Rabanaque e Filipe Brandão pela amizade e por compreender a minha ausência.

Á minha amiga Ana Rios, pela amizade, incentivo e por todos os momentos divertidos.

À minha orientadora Profa. Dra. Joselene Ribeiro de Jesus Santos, pela confiança, paciência, apoio, incentivo e orientação deste trabalho.

À Silene Vendrasco, pela confiança, ajuda e incentivo para a conclusão do curso.

Ao Marcos Aurélio e Geraldo Fernandes, pela ajuda e incentivo.

A Universidade Federal do Maranhão por fornecer as estruturas físicas para a realização dos experimentos, ao Laboratório de Produtos Naturais (LPN), e ao Laboratório de Microbiologia Clínica (LABMIC), por todo o apoio dado para a conclusão da pesquisa.

À Coordenação do Curso de Química pela ajuda durante todo o período acadêmico.

A todos os meus professores que são os maiores responsáveis por eu estar concluindo mais uma etapa da minha vida, orientando e compartilhando conhecimentos e sendo exemplos para mim.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram de alguma forma a conquistar essa vitória.

Muito obrigada!

“A mudança está em tuas mãos. Reprograma tua meta, busca o bem e viverás melhor. Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”

Chico Xavier

RESUMO

A *Annona tomentosa* R. E. Fr. (Annonaceae), conhecida no Brasil como Araticum-bravo ou Araticum de moita, é uma árvore de pequeno porte encontrada em todo território brasileiro, principalmente nas áreas costeiras, sua distribuição é descontínua, aparecendo nos campos abertos, no cerrado de árvores arbustivas e no cerradão, onde a vegetação é mais densa, ocorrendo desde Goiás, Tocantins e Maranhão até o estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Todas as partes deste vegetal são utilizadas na medicina popular, tem sido utilizadas principalmente para o combate às diarreias, estomatites, cefaléia, nas nevralgias, em furúnculos, úlceras e na erradicação de piolhos além de antireumática. Com base nos dados obtidos por levantamento bibliográfico, este trabalho buscou informações de naturezas químicas, através da triagem fitoquímica e microbiológica pelos testes de atividade antimicrobiana. Na triagem fitoquímica foram confirmadas a presença de substâncias pertencentes às classes funcionais de fenóis, taninos, antocianinas, antocianidina, flavonóides, xantonas saponinas, esteróides triterpenóides e alcalóides. A confirmação para alcalóides foi realizada por cromatoplacas. Utilizou-se para a avaliação da atividade antimicrobiana cepas padrão (ATCC) de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* 25923), das bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* 27853), (*Escherichia coli* 35218), (*Klebsiella pneumoniae* 700603). Foram utilizados nos testes microbiológicos os isolados clínicos de (*Acinetobacter baumannii*) e o fungo (*Cândida albicans*). O potencial antimicrobiano do extrato foi analisado pela técnica de perfuração em meio Müller Hinton, os resultados demonstraram que as cascas da *Annona tomentosa* apresentaram um potencial inibitório de crescimento sobre a bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* 25923, e sobre os microrganismos clínicos com destaque para *A. baumannii* com formação de halo de (20mm) respectivamente.

Palavras-chave: Annonacea, triagem fitoquímica, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Annona tomentosa R. E. Fr. (Annonaceae), known in Brazil as Araticum-bravo or Araticum de moita, is a small tree found throughout Brazil, especially in coastal areas, their distribution is discontinuous, appearing in open fields, savannah scrubland trees and big savannah, where vegetation is denser, occurring from Goiás, Tocantins and Maranhão to the state of São Paulo and Mato Grosso do Sul. All parts of this plant are used in folk medicine, are employed mainly for combating diarrhea, stomatitis, headache, in neuralgia, in boils, ulcers and eradication of lice beyond antirheumatic. Based on data from literature, this study sought information from chemical natures by phytochemical and microbiological screening for antimicrobial activity tests. In phytochemical screening it was confirmed the presence of substances in the functional classes of phenols, tannins, anthocyanins, anthocyanidin, flavonoids, xanthones saponins, triterpenoid steroids and alkaloids, confirming the presence for everyone. Confirmation for alkaloids was performed by cromatoplas. It was used to evaluate the antimicrobial activity standard strains (ATCC) of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* 25923), Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* 27853) (*Escherichia coli* 35218), (*Klebsiella pneumoniae* 700603). Were used in microbiological testing, clinical isolates (*Acinetobacter baumannii*) and fungi (*Candida albicans*). The antimicrobial potential of the extract was analyzed by drilling technique among Müller Hinton, the results showed that the shells *Annona tomentosa* had an inhibitory growth potential on the Gram-positive bacterium, *Staphylococcus aureus* 25923, and on clinical microorganisms especially *A. baumannii* halo formation (20mm) respectively.

Keywords: Annonaceae, phytochemical screening, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto geral da planta em estudo, árvores de pequeno porte em áreas muito seca.....	16
Figura 2	Estrutura do ácido Caurenóico.....	17
Figura 3	Alguns metabólitos secundários da família Annonaceae: alcalóide liriodenina (a), apigenina (b), kaempferol (c), quercetina (d), β estigmasterol (e) sitosterol (f).....	24
Figura 4	Difosfato de dimetilalila.....	24
Figura 5	Terpenos isolados do gênero Annona: Cânfora (a) e borneol (b).....	25
Figura 6	Acetogeninas presentes em espécies de Annonas.....	26
Figura 7	Três dos alcalóides isolados da espécie <i>Annona salzmanii</i> : Reticulina (a), Laurelliptina (b) e Isoboldina (c).....	27
Figura 8	Estrutura química da anonaína.....	27
Figura 9	Alcalóides proaporfínicos de Annona.....	28
Figura 10	Fórmula estrutural básica das Chalconas.....	29
Figura 11	Estrutura básica dos Flavonóides.....	29
Figura 12	Estruturas químicas de acetogeninas isoladas de <i>Annona glabra</i>	30
Figura 13	Acetogeninas isoladas do gênero <i>annonna</i> responsável pela atividade antioxidante.....	31
Figura 14	Planta em estudo.....	33
Figura 15	Imagem da área do local de coleta do material vegetal as margem direita do Rio Bacanga em São Luis-MA.....	36
Figura 16	Momento da coleta das cascas do vegetal.....	36
Figura 17	Exsicata da espécie vegetal Araticum Bravo (<i>Annona tomentosa</i>)...	37
Figura 18	Processo de extração, filtração e concentração no rota evaporador do extrato. Cascas trituradas (a), pesagem (b), extração (c), filtração a vácuo (d) e concentração (e).....	38
Figura 19	Fluxograma de preparação, extratação e fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico e triagem dos constituintes fitoquímicos das cascas da <i>Annona tomentosa</i>	39

Figura 20	Confirmação de alguns compostos durante os testes fitoquímicos...	46
Figura 21	Placa do extrato eter-clorofórmio e utilizando como fase móvel DCM:Metanol (9,5:0,5) e revelado com reagente de dragendorff.....	47
Figura 22	Placa do teste de Perfuração para a bactéria <i>Escherichia coli</i> 35218.....	48
Figura 23	Placa do teste de Perfuração para a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853, imagem por fora (a), por dentro (b).....	48
Figura 24	Placa do teste de Perfuração para a bactéria <i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603.....	49
Figura 25	Placa do teste de Perfuração para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> 25923, imagem por fora (a), por dentro (b).....	49
Figura 26	Placa do teste de Perfuração para a bactéria <i>Acinetobacter baumannii</i> , imagem por fora (a), por dentro (b).....	50
Figura 27	Placa do teste de Perfuração para a bactéria <i>Candida albicans</i> , imagem por fora (a), por dentro (b).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características de algumas classes de metabólitos secundários em plantas medicinais.....	22
Tabela 2	Avaliação dos constituintes em função do pH do meio.....	40
Tabela 3	Avaliação dos constituintes pela variação da coloração em função do pH do meio.....	41
Tabela 4	Resultados da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico das cascas da <i>Annona Tomentosa</i>	44
Tabela 5	Resultados do teste de perfuração para atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das cascas da <i>Annona Tomentosa</i>	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1. Geral	18
2.2. Específicos	18
3 METODOLOGIA	19
4 REVISÃO DA LITERATURA	19
4.1. PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL	19
4.2. METABÓLICOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	20
4.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA FAMÍLIA ANNONACEAE	23
4.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO GÊNERO ANNONA	24
4.4.1 Terpenos	24
4.4.2 Acetogeninas	25
4.4.3 Alcalóides	26
4.4.4 Flavonóides	28
4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS ASSOCIADAS AO GÊNERO ANNONA	29
4.5.1 Atividade citotóxica	29
4.5.2 Atividade antioxidante	30
4.5.3. Atividade antimicrobiana	32
4.6 ESPÉCIE EM ESTUDO	32
4.7 REFERÊNCIAS TAXONÔMICAS	33
4.8 DESCRIÇÃO BOTÂNICA	34
5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	34
5.1. Equipamentos Utilizados	34
5.2. Reagentes	35
5.3. COLETA E IDENTIFICAÇÃO	35
5.3.1. SECAGEM E MOAGEM	37

5.4. PROSPECÇÃO DOS CONSTITUINTES FITOQUÍMICOS DAS CASCAS DO CAULE DA ESPÉCIE VEGETAL <i>annona tomentosa</i>	37
5.4.1 PESO SECO E RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO.....	38
5.5 METODOLOGIA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA	43
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1 PESO SECO E RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO....	44
6.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DA <i>annonna tomentosa</i>	44
6.2.1 TESTE PARA ALCALOIDES EM CROMATOGRAFIA	47
6.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i>	47
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO.....	65

1 INTRODUÇÃO

O uso dos produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por várias populações com o intuito de tratar diversas patologias. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, os produtos naturais continuam sendo utilizados e, estima-se que, cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de metabólitos secundários de plantas e animais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008).

O Brasil é um país rico em diversidade animal e vegetal, cujo território possui cinco principais biomas sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga, portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos (SILVEIRA et al., 2008). De acordo com Arruda, o caminho das plantas medicinais no Brasil, empregadas na medicina popular e nas práticas médicas vigentes foram construídas mediante relações culturais entre os grupos étnicos formadores da base social brasileira, os índios, os negros e os brancos.

Após a constatação de que o conhecimento empírico concernente às plantas medicinais, desenvolvida ao longo dos séculos, pode em muitos casos ter uma comprovação científica atendendo o binômio segurança e eficácia exigida pelos órgãos de controle de medicamentos (SILVEIRA et al., 2008), tem levado pesquisadores de várias áreas do saber e a indústria farmacêutica a investir mais nas pesquisas, tendo em vista a utilização dos princípios ativos como protótipos para a descoberta de fontes e/ou modelos para a produção de novos fármacos menos tóxicos e mais eficazes (FRANCO & MAIA, 2009).

A família Annonaceae, destaca-se por possuir um grande número de espécies de interesse industrial, sendo a maioria dessas frutíferas encontradas principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (CHATROU et al., 2012). Possui cerca de 2500 espécies, compreendidas em 135 gêneros distintos. O gênero *Annona* L. compreende aproximadamente 162 espécies de árvores e arbustos (CHATROU et al., 2012). No Brasil podem ser encontradas cerca de 60 espécies com a maioria ocorrendo em florestas (COSTA et al., 2011).

A *Annona tomentosa* é uma árvore de pequeno porte encontrada em todo território brasileiro, como mostra a (Figura 1), principalmente nas áreas costeiras e conhecidas popularmente como araticum-do-brejo e araticum-bravo.



Figura 1: Aspecto geral da planta em estudo, árvores de pequeno porte em área muito seca.

Quimicamente a família Annonaceae, é uma das famílias de plantas tropicais menos estudadas. Entretanto, investigações fitoquímicas e farmacológicas sobre membros desta família vêm se intensificando nos últimos anos (LIMA et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2006; MOREIRA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007; COSTA et al., 2008; VALTER et al., 2008). Estudos sobre a *Annona glabra* têm demonstrado grande quantidade de compostos de natureza química diversificada nas mais variadas partes da planta. Os principais grupos de compostos presentes em extratos preparados de cascas (OLIVEIRA et al., 2002), caules (CHEN et al., 2004), folhas (OLIVEIRA et al., 2002) e frutos (CHANG et al., 1998; CHEN et al., 2004) são os alcalóides, as acetogeninas e os diterpenos. Dentre estes, o ácido caurenóico (I), ou ácido caur-*ent*-16-en-19-oico, como mostra a (Figura 2) pág. 17, é um dos mais estudados, para o qual várias atividades biológicas já foram descritas, desde a inibição da replicação do vírus HIV em linfócitos (CHANG et al., 1998), como agente citotóxico (COSTA-LOTUFO et al., 2002; ZHANG et al., 2004), trypanosomicida (VIEIRA et al., 2002), larvicida (SLIMESTRAD et al., 1995), antimicrobiano (PADMAJA et al., 1995; VELIKOVA et al., 2000), vermífugo, esporicida (PADMAJA et al., 1995), analgésico (BLOCK et al., 1998), contraceptivo

(PAGE et al., 1992), relaxante da musculatura lisa vascular aórtica de ratos (TIRAPELLI et al., 2004), até como agente antiinflamatório (PAIVA et al., 2002).

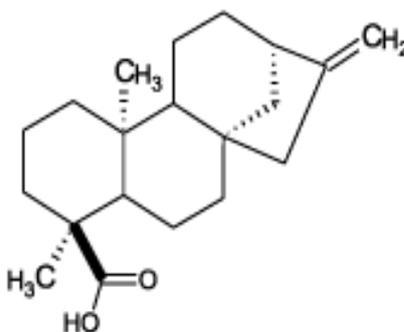


Figura 2: Estrutura do ácido caurenóico ou ácido caur-*ent*-16-en-19-oico

Todas as partes deste vegetal são utilizadas na medicina popular. As sementes são consideradas adstringentes, eméticas, e estudos confirmaram a atividade antiparasitária, moluscicida e antivírus Herpes simplex, ao mesmo tempo em que se atribuem às cascas, ação antidiabética e espasmolítica. A utilização do suco do fruto da *Annona muricata* L., é usado em bochechos no combate às aftas, internamente como antitérmico, diurético e no combate de insônias leves. A infusão das folhas secas é usada contra insônias graves, dores de cabeça e como emagrecedor. O decocto das folhas contém o óleo essencial com ação parasiticida, antirreumática e antinevrálgica (GONÇALVES, 2007, LUNA.; et al., 2010). Economicamente, este gênero é considerado o mais importante para a família Annonaceae, por apresentar algumas espécies que são cultivadas e comercializadas no Brasil em larga escala, como *A. crassiflora* (araticum), *A. squamosa* (fruta-do-conde), *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa) e *A. cherimola* (cherimoia). O valor econômico dessas espécies está relacionado principalmente às propriedades nutricionais dos frutos que são consumidos *in natura*, mas também são amplamente utilizados em produtos processados ou semi-processados, especialmente na preparação de sucos, sorvetes e sobremesas (LAGE, 2011, p. 6; DINIZ et al., 2013). Além disso, várias espécies do gênero *Annona* possuem potencial farmacológico no que diz respeito às atividades antioxidante (LIMA et al., 2010), antimicrobiana (COSTA et al., 2013), antitumoral (LIMA et al., 2012), antinociceptiva, anti-inflamatória (SIEBRA et al., 2009),

ansiolítica, sedativa e antidepressiva (DINIZ et al., 2013), o que desperta o interesse de grupos de pesquisa nacionais e internacionais, além do setor industrial farmacêutico.

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas são reconhecidas empiricamente há séculos. Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antimicrobianos, tais como Brasil (DINIZ et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Detectar das classes de produtos naturais de substâncias bioativas presentes nas cascas do caule da espécie vegetal, *Araticum Bravo* (*Annona tomentosa*).

2.2. Específicos

- ✧ Detectar através de triagem fitoquímica as classes de metabólitos secundários presentes;
- ✧ Detectar os compostos fenólicos em especial os flavonóides e os alcalóides da espécie vegetal através da prospecção fitoquímica com a utilização de técnicas cromatográficas adequadas;
- ✧ Determinar a atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico frente às bactérias (*Staphylococcus aureus* 25923), (*Pseudomonas aeruginosa* 27853), (*Escherichia coli* 35218), (*Klebsiella pneumoniae* 700603) e isolados clínicos de (*Acinetobacter baumannii*) e o fungo (*Candida albicans*);
- ✧ Contribuir para o estudo químico e biológico de espécies da família Annonaceae;

3 METODOLOGIA

A execução do procedimento metodológico do trabalho foi feita em etapas, conforme descrição abaixo:

- ✧ Levantamento bibliográfico sobre as informações químicas e da família, gênero e espécie vegetal descrita na literatura nos últimos anos, conforme descrição no item 4.3 pág. 23.
- ✧ Coleta, secagem, moagem e pesagem do material vegetal, conforme descrição no item 5.3.1 pág. 37.
- ✧ Obtenção dos extratos como descrito no fluxograma da Figura 19 pág. 39.
- ✧ Realização dos ensaios fitoquímicos e microbiológicos como apresentados nos itens 5.4 e 5.5, págs 37 a 43.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1. PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

Durante um longo período de tempo, plantas têm sido avaliadas como fonte de produtos naturais para conservar a saúde humana, especialmente nas últimas décadas, com estudos intensivos para terapia natural. A propósito, o uso de componentes das plantas na área farmacêutica tem gradualmente aumentado no Brasil. De acordo com Organização Mundial de Saúde, plantas medicinais deveria ser a melhor fonte para obter uma variedade de drogas (BERTINI et al., 2005).

No Brasil, a primeira descrição sobre o uso de plantas como remédio foi feita por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, de 1587. Esse tratado descrevia os produtos medicinais utilizados pelos índios “as árvores e ervas da virtude”. Com vinda dos primeiros médicos portugueses ao Brasil, diante da escassez, na colônia, de remédios empregados na Europa, perceberam a importância das plantas utilizadas pelos indígenas como medicamento. (VEIGA, 2002), tendo assim grande influência das culturas para a utilização dessas plantas como medicamentos. Entre os índios, o pajé ou feiticeiro utilizava plantas entorpecentes para sonhar com o espírito que lhe revelaria a erva ou o modo de curar o enfermo e também pela observação de animais que procuram certas plantas quando doentes. Um exemplo é o uso da raiz de ipecacuanha, pelos animais, para

alívio de diarreias. Os pajés associavam o uso de plantas a rituais de magia e seus tratamentos eram, assim, transmitidos oralmente de uma geração a outra (JORGE & MORAIS, 2003).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida, atualmente, um sentimento geral de decepção com a medicina convencional e o desejo de adotar um estilo de vida “natural” tem levado à utilização crescente de outras formas de terapia, inclusive em países desenvolvidos. Dentro deste contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS), reiterou o compromisso em estimular o uso da medicina tradicional e medicina complementar para o período 2002-2005. Por sua vez, o Brasil em 2005, através do SUS, propõe a inclusão das plantas medicinais e fitoterapia como opções terapêuticas no sistema público de saúde. Contudo que esses produtos a base de plantas atendam a legislação vigente. (BRASIL, 2006).

4.2. Metabólicos Secundários e Atividade Antimicrobiana

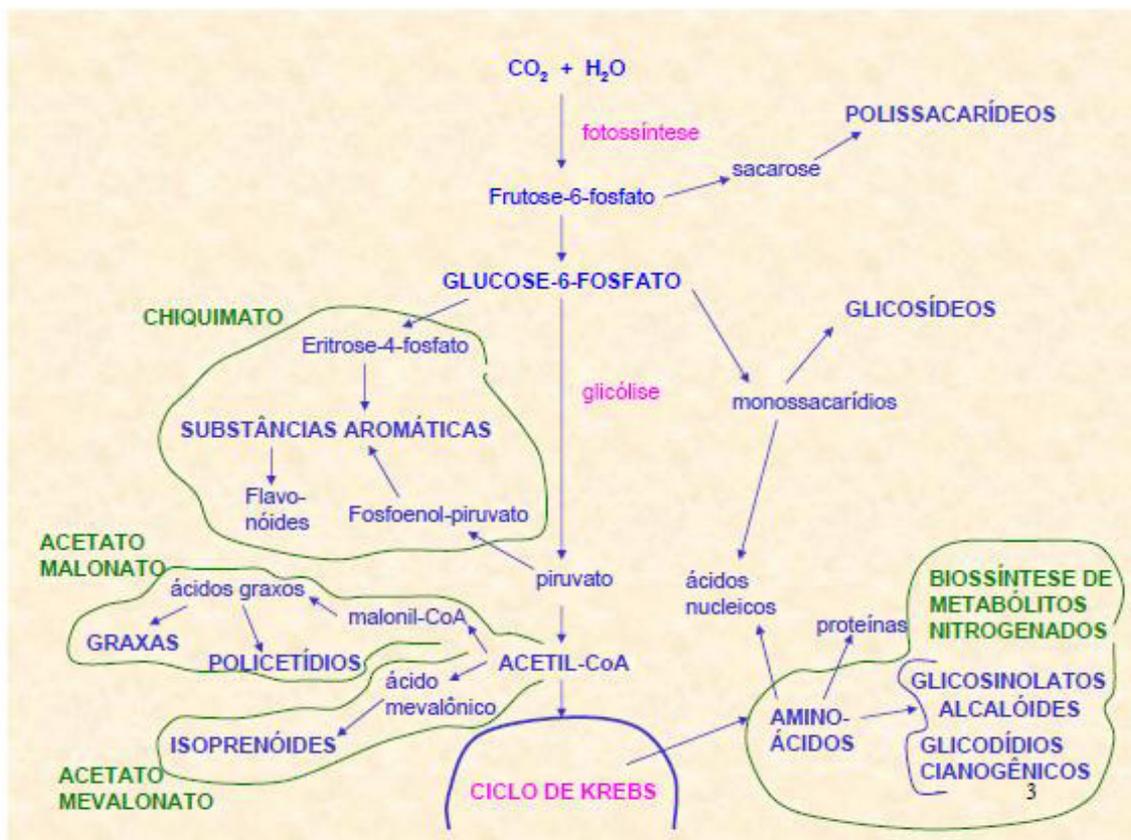
Metabolismo é o conjunto de reações que constantemente ocorrem nas células. Portanto, os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados são chamados metabólitos. Separados em metabólitos ou produtos primários e secundários. Os metabólitos primários, por definição, são moléculas que se encontram em todas as células vegetais e são necessários para a vida da planta. São os açúcares, aminoácidos, proteínas e os ácidos nucleicos.

Os metabólitos secundários, ao contrário, são restritos em sua distribuição, tanto dentro da planta quanto entre diferentes espécies de plantas. São importantes para a sobrevivência e a propagação das plantas que os produzem, são eles: compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais, flavonóides e alcalóides entre outros. São esses compostos os responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas, e eles apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra estresse ambiental (LÓPEZ, 2006; RAVEN et al., 2007).

Os compostos possuem importantes funções nos vegetais, já que são constituídos de substâncias que agem na preservação da integridade das plantas. Por outro lado, esses compostos, ao serem incorporados ao organismo animal, produzem variados efeitos e, quando benéficos, caracterizam as plantas que os possuem. Muitos desses compostos ou grupos deles podem provocar reações nos

organismos, esses são os princípios ativos. Assim, planta medicinal é aquela que contém um ou mais de um princípio ativo que lhe confere atividade terapêutica (LORENZI & MATOS, 2002).

Os Metabólitos secundários são produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, algas, insetos, animais marinhos, e outros seres. Nas plantas o conjunto de compostos secundários é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante o crescimento da planta, sendo que esse equilíbrio é influenciado por fatores genéticos (que são fixos) e ambientais como luz, temperatura, tipo de solo, água, além de outros, que são variáveis. Entre as explicações sobre a origem de metabólitos secundários produzidos pelos organismos, está a pressão seletiva natural que inclui resposta a interações de competição, parasitismo e modificações ambientais que alterem a disponibilidade de recursos. O esquema 1, mostra a possível rota Biossintética dos metabólicos secundários em plantas. (RAVEN et al., 2007).



Esquema 1: Rota biossintética dos metabólicos secundários em plantas.

Existem várias classes de metabólitos secundários em plantas, alguns de maior importância são abordados na Tabela 1.

Tabela 1: Características de algumas classes de metabólitos secundários em plantas medicinais

Princípio Ativo	Propriedades Medicinais ou Tóxicas
Alcalóides	Atuam no sistema nervoso central (calmante, sedativo, estimulante, anestésico, analgésico). Alguns podem ser cancerígenos e outros antitumorais.
Flavonóides	Antiinflamatório, fortalece os vasos capilares, antiesclerótico, antidematoso, dilatador de coronárias, espasmolítico, antihepatotóxico, antioxidante, colerético e antimicrobiano.
Taninos	Adstringentes e antimicrobianos (antidiarréico). Precipitam proteínas.
Óleos essenciais	Bactericida, antivirótico, cicatrizante, analgésico, relaxante, expectorante e antiespasmódico.

Adaptada de Lorenzi & Matos (2002).

As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos como alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos terpenos, poliacetilenos, que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (COWAN, 1999). Com o avanço das pesquisas notou-se a importância dessas substâncias na defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores (YUNES & CALIXTO, 2001). Além disso, foi percebido que algumas plantas podem formar substâncias de natureza antimicrobiana.

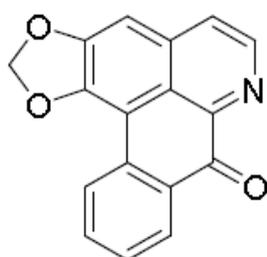
No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com Cardoso & Santos, em 1948, que avaliaram extratos de 100 diferentes plantas, indicadas em terapêutica como anti-inflamatórias ou cicatrizantes. Destas, apenas cinco extratos apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Proteus X-19* (SARTORI et. al, 2003).

4.3. Metabólitos Secundários da Família Annonaceae

Em 1982, Leboeuf e colaboradores publicaram uma revisão sobre a fitoquímica da família Annonaceae, onde é relatada a predominância de alcalóides aporfínicos e oxoaporfínicos dentre os metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes à família. Além de alcalóides, constituintes como polifenóis, óleos essenciais, terpenos e substâncias aromáticas também são encontradas em representantes da família. (LAGE, 2011).

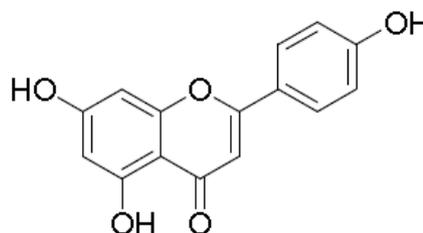
Na (Figura 3) pág. 24, são mostrados alguns produtos do metabolismo secundário em anonáceas. O alcalóide oxoaporfínico liriodenina (a) é o mais comum da classe (SANTOS., et al., 2003). Entre os compostos fenólicos os de maior ocorrência são os flavonóides (SIMÕES e SCHENKEL. 2004). Dentre os quais o O-glicosídeos de apigenina (b) kaempferol (c), quercetina (d), são bastante comuns. (SANTOS e SALATINO, 2000).

Entre os esteróides, os dois de maior ocorrência são o β -sitosterol (e) e o estigmasterol (f), (LEBOEUF., et al., 1982).



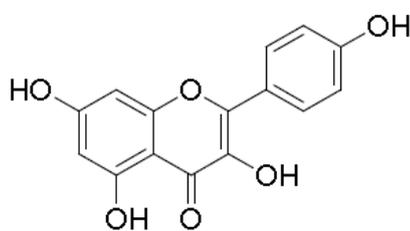
liriodenina (a)

Fonte: Santos., et al., 2003



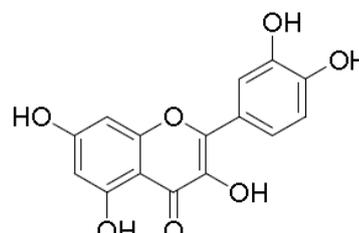
o-glicosídeos de apigenina (b)

Fonte: Santos e Salatino, 2000



kaempferol (c)

Fonte: Santos e Salatino, 2000



quercetina (d)

Fonte: Santos e Salatino, 2000

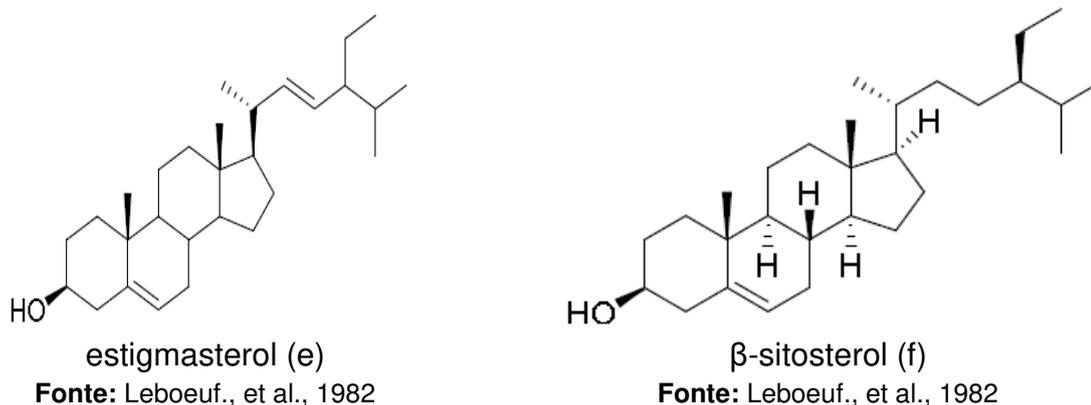


Figura 3: - Alguns metabólitos secundários da família Annonaceae: alcalóide lirioidenina (a), apigenina (b), kaempferol (c), quercetina (d), β -estigmasterol (e) sitosterol (f).

4.4 Metabólitos Secundários do Gênero Annona

4.4.1 Terpenos

Os terpenos representam uma ampla e diversa classe de metabólitos formados pela condensação de unidades de difosfato de dimetilalila, como mostra a (Figura 4). Eles são classificados como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos que possuem respectivamente 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 átomos de carbonos em sua estrutura, (DEWICK, 2002).

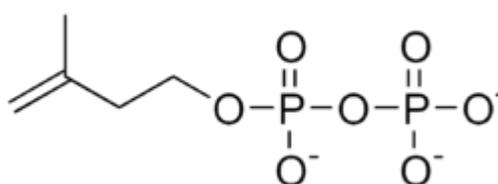


Figura 4 - Difosfato de dimetilalila

Os monoterpenos canfôra (a) e borneol (b), de acordo com a (Figura 5), foram encontrados em raízes e casca de *Annona squamosa* (RAO et al., citados por (LEBOEUF, 1982).

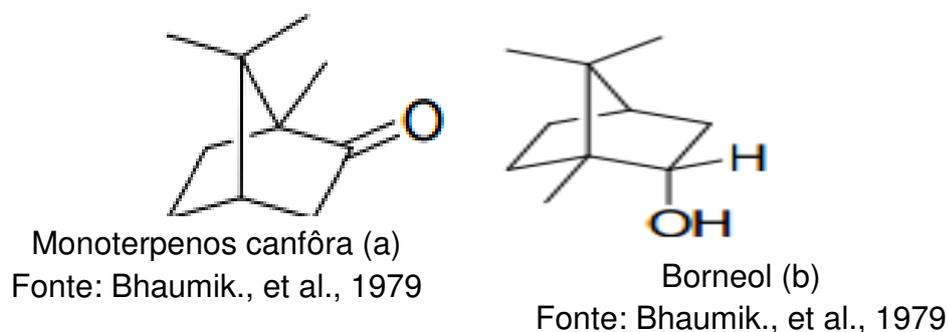
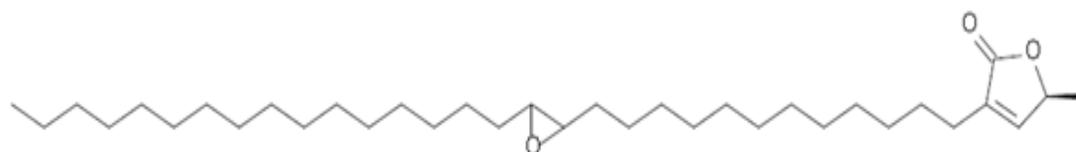


Figura 5: Terpenos isolados do gênero *Annona*: cânfora (a), borneol (b)

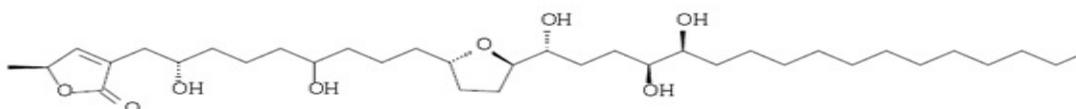
4.4.2 Acetogeninas

As acetogeninas são uma das classes mais importantes de produtos naturais que apareceram nas últimas décadas, encontradas exclusivamente na família Annonaceae, sendo gênero *Annona* a principal fonte desta classe de composto. Considerando que dos 417 compostos conhecidos até 2004, 289 foram isolados a partir de 20 espécies de *Annona*, (BERMEJO, et al., 2005). As acetogeninas têm apresentado uma grande propriedade biológica, tais como: citotóxica, antitumoral, antiparasitária, pesticida, antimicrobiana e atividade imunossupressora (ALALI, et al., 1999). A (Figura 6) pág. 26 mostra alguns exemplos de acetogenina já encontradas em plantas do gênero *Annona* tais como: *A. muricicata*, a epomurinina (a), (MELOT., et al., 2009), *A. montana*, o tucupentol (b), (COLOM., et al., 2009), *A. cornifolia*, cornifolina (c), (SANTOS., et al., 2006).



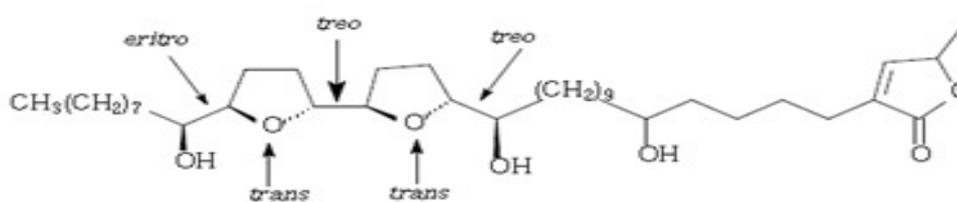
epomurinina (a)

Fonte: *A. muricicata* (Melot et al., 2009)



tucupentol (b)

Fonte: *A. Montana* (Colom et al., 2009)



Cornifolina (c)

Fonte: *A. cornifolia* A.St. Hil (Santos et al., 2006)

Figura 6: Acetogeninas presentes em espécies de Annonas

4.4.3 Alcalóides

Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas e em sua maioria farmacologicamente ativos. Os alcalóides aporfínicos têm uma ampla representação dentro do grupo dos alcalóides isoquinolínicos. Dentre os alcalóides isoquinolínicos, destacam-se os compostos liriodenina, um alcalóide do tipo oxoaporfínico e anonaína, tipo aporfínico, os mais encontrados nas espécies do gênero *Annona*, sendo ainda considerados marcadores quimiotaxonômicos desta família (BERMEJO, et al., 2005).

Pesquisas mostraram que da casca do tronco de *Annona salzmanii*, foram isolados quatro alcalóides: anonaína, cuja fórmula estrutural é mostrada na (Figura 8), e os demais reticulina (a), laurelliptina (b) e isoboldina (c) que são mostrados na (Figura 7).

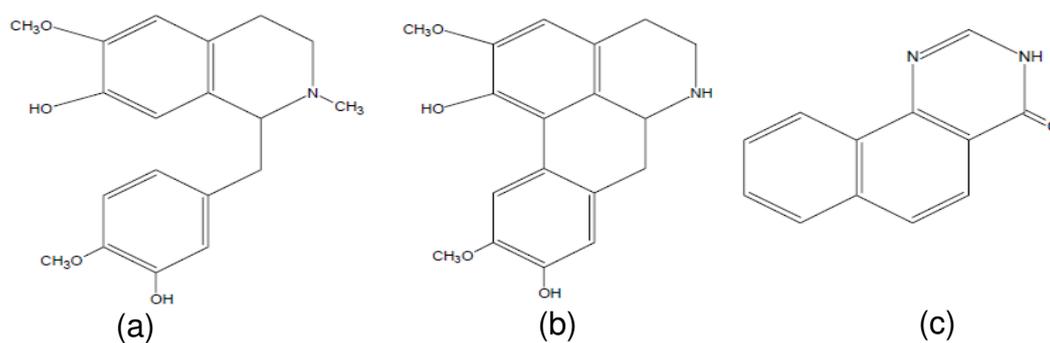
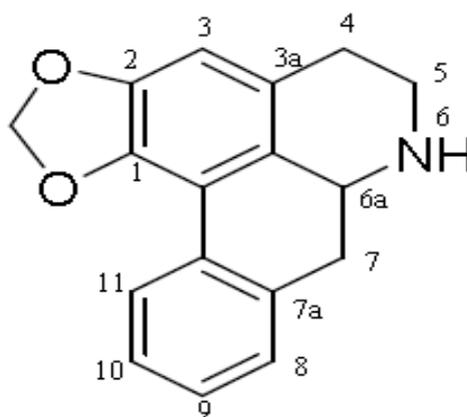


Figura 7: Três dos alcalóides isolados da espécie *Annona salzmanii*: Reticulina (a), Laurelliptina (b) e Isoboldina (c).

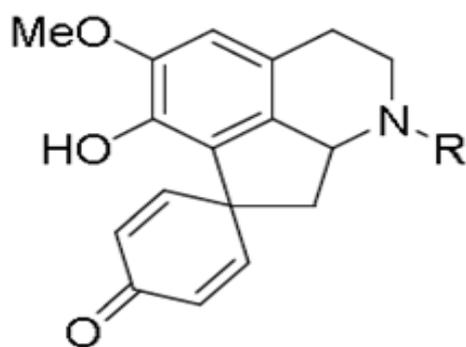
A anonaína é o alcalóide aporfínico, de ocorrência mais comum no gênero *Annona*. É encontrada nas espécies *A. cherimola*, *A. glabra*, *A. montana*, *A. paludosa*, *A. reticulata*, *A. senegalensis* e *A. squamosa* (QUEIROZ., et al., 1996, BHAUMIK., et al., 1979). Outros representantes comuns dessa classe de alcalóides estão ilustrados na (Figura 9).



anonaína

Fonte: Queiroz, et al., 1996, Bhaumik., et al., 1979

Figura 8: Estrutura química da anonaína



aporfínicos

Fonte: Queiroz., et al., 1996, Bhaumik., et al., 1979

R	Alcalóide
H	Estefarina
CH ₃	Glaziovina
C(O)OCH ₃	Promucosina

Figura 9: Alcalóides aporfínicos e proaporfínicos de Annona.

4.4.4 Flavonóides

Os flavonóides, ilustrado na (Figura 11) pág. 29, são substâncias redutoras, derivados das chalconas, cuja fórmula estrutural é mostrada na (Figura 10) pág. 29, (SIMÕES, et al., 2004). Ocorrem nas plantas em uma variedade de formas estruturais contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo básico, (HARBONE, 1984). São conhecidos por serem sintetizados por plantas em respostas a infecções microbianas, justificando assim sua ação antimicrobiana frente a vários microorganismos. Eles derivam de compostos químicos com esqueletos do tipo flavonas, flavonóis, antocianidinas e catequinas, entre outros, (DEWICK, 2002).

As classes de flavonóides mais abundantes no gênero Annona são os flavonóis, dentre essa classe os mais comuns são a quercetina e a canferol, como mostra a (Figura 3) (d) e (c), respectivamente. A quercetina (3,5,7,3'-4'- pentahidroxi flavona) é o principal flavonóide presente na dieta humana e o seu consumo diário estimado, varia entre 50 e 500 mg (DESCHNER, E.E. et al, 1991). e seus derivados glicosilados, estando presentes tanto os o-glicosídeos como os c-glicosídeos, (SANTOS e SALATINO, 2000).

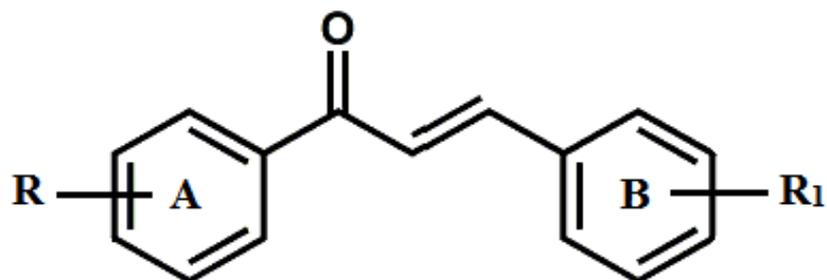


Figura 10: Fórmula estrutural básica das chalconas.

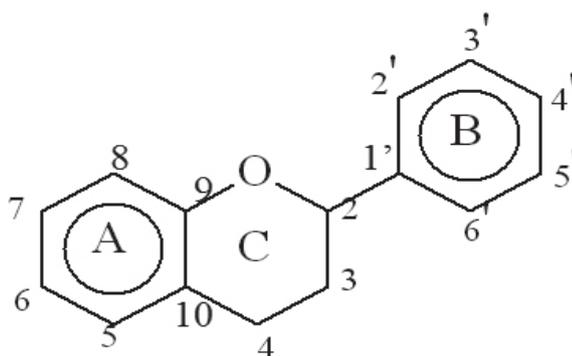


Figura 11: Estrutura básica dos flavonóides.

4.5 Atividades Biológicas Associadas ao Gênero *Annona*

4.5.1 Atividade Citotóxica

A busca por substâncias com atividade citotóxica e potencialmente anticancerígena sempre foi uma das prioridades da química medicinal, visto que o câncer é uma das doenças que mais mata no mundo, e um grande número de abordagens diferentes tem sido utilizada nessa busca. No entanto, a descoberta de substâncias antitumorais seletivas permanece como um dos objetivos nas pesquisas do combate ao câncer, (PISCO, et al., 2006).

Com relação à atividade anticancerígena a abordagem utilizada é a atividade citotóxica frente à *Artemia salina*, onde o experimento consiste em medir a concentração do produto que mata 50% da população de artemia, levando-se em consideração os dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que considera tóxica a substância que apresenta valores de DL50 < 103 mg L⁻¹ frente à *Artemia salina* (MEYER et al., 1982)..

Extratos de varias partes da planta do gênero *annona* foram submetidos ao ensaio de letalidade sobre *Artemia salina* como: folhas, sementes e madeira de *Annona crassiflora*, sementes de *Annona nutans*, folhas de *Annona cherimola* e folhas de *A muricicata*, todos apresentaram atividades citotóxica positiva, (SANTOS.; PIMENTA., et al., 2003).

Estudo feito com extrato hidroalcoólico de *Annona tomentosa* apresentou atividade hemolítica ($\leq 20\%$) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e moderada ($> 20\%$ e $\leq 50\%$) nas concentrações de 300 e 500 $\mu\text{g/mL}$ quando da avaliação do efeito citotóxico através da quantificação da atividade hemolítica dos mesmos em eritrócitos de rato (CAMARA, 2013)

As acetogeninas annoglaxina (a) e 27-hidroxibullatacina (b), é ilustrada na (Figura 12), isoladas de *Annona glabra*, mostraram atividade tóxica sobre células tumorais de mama, rim, próstata e pâncreas, (LIU, et al., 1999) e sobre linhagem celular de hepatoma humano, sendo esta ação causada pela diminuição do potencial transmembrânico de mitocôndrias, induzindo a morte celular (apoptose), (CHEN et al., 2004).

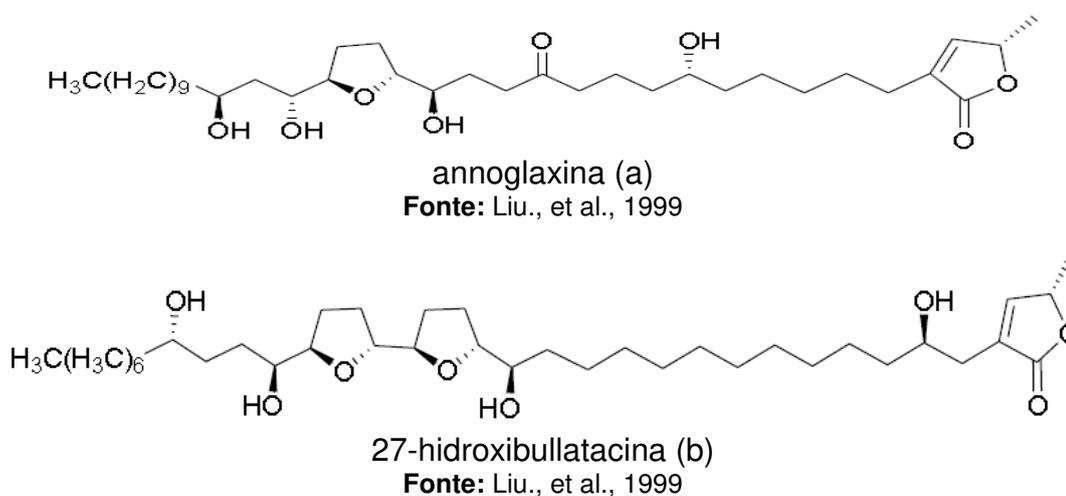


Figura 12: Estruturas químicas de acetogeninas isoladas de *Annona glabra*.

4.5.2 Atividade Antioxidante

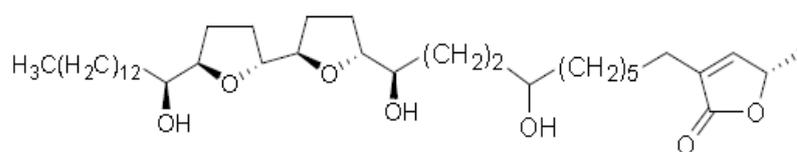
Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, P.G. 2000). Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos

antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (RICE-EVANS, C., et al, 1996). Os compostos fenólicos também são potentes antioxidantes. Compostos antioxidantes estão naturalmente presentes em frutas, sendo que algumas apresentam altas concentrações de determinados grupos (HARBORNE, J.B., et al, 1994).

Os radicais livres atuam de forma a danificar as biomoléculas, comprometendo algumas funções do organismo humano, assim como agem em plantas e em alimentos, modificando a cor e o aspecto do alimento. Sobretudo, as pesquisas em volta desse assunto vêm crescendo juntamente com o surgimento de inovações para determinação de atividades antioxidantes (ALVES, et al. 2010).

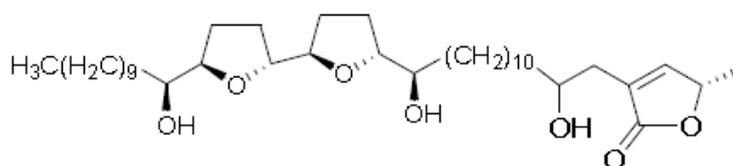
Dentre os metabólitos secundários já encontrados ou detectados no gênero *Annona* que mostraram possuir atividade antioxidante se destacam as acetogeninas e os flavonóides.

As acetogeninas 9-hidroxfolianaina (a), e a bulatacina (b) mostradas na (Figura 13), foram isoladas de *Annona cornifolia*, e quando submetidas à atividade antioxidante frente ao radical orgânico 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) apresentaram um resultado positivo, caracterizando o potencial antioxidante da espécie vegetal (LIMA., et al., 2010).



9-hidroxfolianaina (a)

Fonte: Lima., et al., 2010



bulatacina (b)

Fonte: Lima., et al., 2010

Figura 13: Acetogeninas isoladas do gênero *annona* responsável pela atividade antioxidante.

Outros flavonóides como a quercetina, isoramnetina, kaempferol e seus derivados c- ou o- glicosídeos, que já foram detectados em *Annona crassiflora*, demonstraram atividade antioxidante utilizando dois métodos, frente ao radical DPPH e ao β -caroteno, (ALVES et al., 2007).

4.5.3. Atividade antimicrobiana

De acordo com alguns levantamentos feitos sobre atividades biológicas observadas em alcalóides aporfínicos e proaporfínicos, a anonaína (Figura 8) e a estefarina (Figura 9), apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, a glaziovina (Figura 9), apresentou atividades sobre *Escherichia coli*. (RIOS., et al., 1998).

Flavonóides como quercetina e O-glicosídeos de quercetina apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* (FEHLBERG et al., 2009).

4.6 Espécie em Estudo

O Araticum (*Annona tomentosa*) é árvore de pequeno porte, como mostra a (Figura 14), encontrada em todo território brasileiro, principalmente nas áreas costeiras, sua distribuição é descontínua, aparecendo nos campos abertos, no cerrado de árvores arbustivas e no cerrado, onde a vegetação é mais densa, ocorrendo desde Goiás, Tocantins e Maranhão até o estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul, (RIOS., et al., 1998). “Araticum”, nome indígena e vêm do Tupi e significa “fruta mole”. O araticunzeiro destaca-se pelas suas propriedades farmacológicas especiais que incluem a sua utilização por populações regionais no tratamento de picadas de cobras, e em afecções parasitárias no couro cabeludo, (ALMEIDA., et al. 1998).

A espécie botânica *Annona tomentosa*, é cultivada e bastante apreciada por seu fruto conhecido comumente como araticum bravo. Popularmente, é empregada no tratamento de diarreias, estomatites, nas nevralgias, cefaléias, em furúnculos, úlceras e na erradicação de piolhos.

O estudo do caule e folhas da espécie vegetal *Annona tomentosa* é uma possibilidade inovadora de isolamento de componentes possivelmente conhecidos ou menos comuns, uma vez que poucos estudos científicos são encontrados nas bases de dados pesquisadas e pouco se sabe sobre atividade biológica.



Figura 14: Planta em estudo

4.7 REFERÊNCIAS TAXONÔMICAS

A família Annonaceae é considerada em alguns sistemas de classificação tradicionais como Angiosperma basal por apresentar atributos considerados primitivos como hábito lenhoso; perianto bem desenvolvido.

De acordo com o sistema de taxonomia vegetal - APG (*Angiosperm Phylogeny Group*) (2003) e BARROSO (1991) a classificação taxonômica é feita da seguinte maneira:

Reino:	Plantae
Divisão:	Spermatophyta
Classe:	Magnolitaе
Ordem:	Magnoliales
Família:	Annonaceae
Tribo:	Unoneae
Gênero:	Annona
Espécie:	<i>Annona tomentosa</i>

4.8 Descrição Botânica

Araticum bravo é uma árvore com altura de 1 a 2 metros, ramificado desde o solo, formando moitas ou touceiras com caule de 60 cm a 80 cm de diâmetro. As raízes tem xilopódio (grossa como cenoura) que armazena água e nutrientes. As flores de ambas as espécies são isoladas, axilares (entre folhas e galhos), medindo 2 a 3,5 cm de comprimento, com 3 sépalas externas livres e carnosas e 3 pétalas internamente com cor creme-amareladas e menos carnosas, (MAAS., et al. 2010).

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. Equipamentos Utilizados

Balança analítica analógica (HIDROMEL);
Balança analítica digital (SHIMADZU);
Bomba de vácuo TE-058 (TECNAL);
Estufa de secagem (ODONTOBRÁS);
Evaporador rotativo (Staufen, IKA-WERK);
Moinho elétrico (Tecnal).

5.2. Reagentes

Acetato de etila P.A. (Isofar);
Acetona P.A. (Vetec);
Ácido Acético (Isofar);
Ácido Clorídrico P.A. (Merck)
Álcool Etílico Hidratado 70⁰ INPM;
Álcool Metílico P.A. (Isofar);
Clorofórmio P.A. (Isofar);
Carbonato de Bismutita (Isofar);
Diclorometano P.A. (Isofar);
Iodeto de Potássio P.A. (Isofar)
Hexano P.A. (Isofar);
Iodo P.A. (Vetec);
Sílica gel 60 para coluna (0,63 – 0,200 mm);
Sílica gel 60 G.

5.3. Coleta e Identificação

A espécie vegetal *Annona tomentosa* foi coletada na Área de Proteção Ambiental da Universidade Federal do Maranhão como mostra (Figura 15), localizada próximo à Barragem do Bacanga em São Luis do Maranhão no dia 10 de Fevereiro de 2015 acerca de 10h00 min, como mostra a (Figura 16). Após a coleta fez-se a limpeza das cascas. A identificação do vegetal foi feita no Herbário Rosa Mochel da Universidade Estadual do Maranhão e está disposta sobre a exsicata de acordo com a (Figura 17) de número 3773.



Fonte: Imagem google maplink/2015

Figura 15: Imagem aérea do local de coleta do material vegetal as margem direita do Rio Bacanga em São Luis-MA.



Figura 16: Momento da Coleta das cascas do vegetal



Figura 17: Exsicata da espécie vegetal Araticum Bravo (*Annona tomentosa*)

5.3.1. Secagem e Moagem

Após a coleta e a devida limpeza do material botânico em estudo, retirou-se as cascas do caule e estas foram submetidas à secagem a sombra por cinco dias, A desumidificação foi efetuada em estufa de secagem com temperatura entre 40-45⁰C por 24 horas, em seguida, o material foi triturado em moinho elétrico.

5.4. A Prospecção dos Constituintes Fitoquímicos das Cascas do Caule da Espécie Vegetal *annonna tomentosa* foi desenvolvido conforme fluxograma descrito na (Figura 19) pág. 39.

Para obtenção do extrato bruto, após secas e trituradas, pesou-se 200 g das cascas da *Annona tomentosa*, colocou-se em um recipiente de vidro adequado, juntamente com a solução hidroalcoólica 70% na proporção 1:3 (m/v)(YUNES, 2001). A mistura foi agitada e deixou-se em repouso por 24 horas, após esse tempo a mistura foi filtrada. Ao resíduo adicionou-se novamente a mesma quantidade de solução. Repetiu-se este procedimento, totalizando-se quatro extrações, em seguida filtrou-

se. Obtendo-se 735 mL de material da casca do caule extraído. Fez-se a determinação de peso e rendimento, em seguida, retirou-se 100 mL para atividade Biológica. Logo após, o extrato bruto hidroalcoólico foi submetido ao processo de concentração sob pressão reduzida em evaporador rotativo á temperatura controlada entre 35 a 50⁰C, como mostra a (Figura 18). Descartou-se a torta (material sólido), (MATOS, 2009)

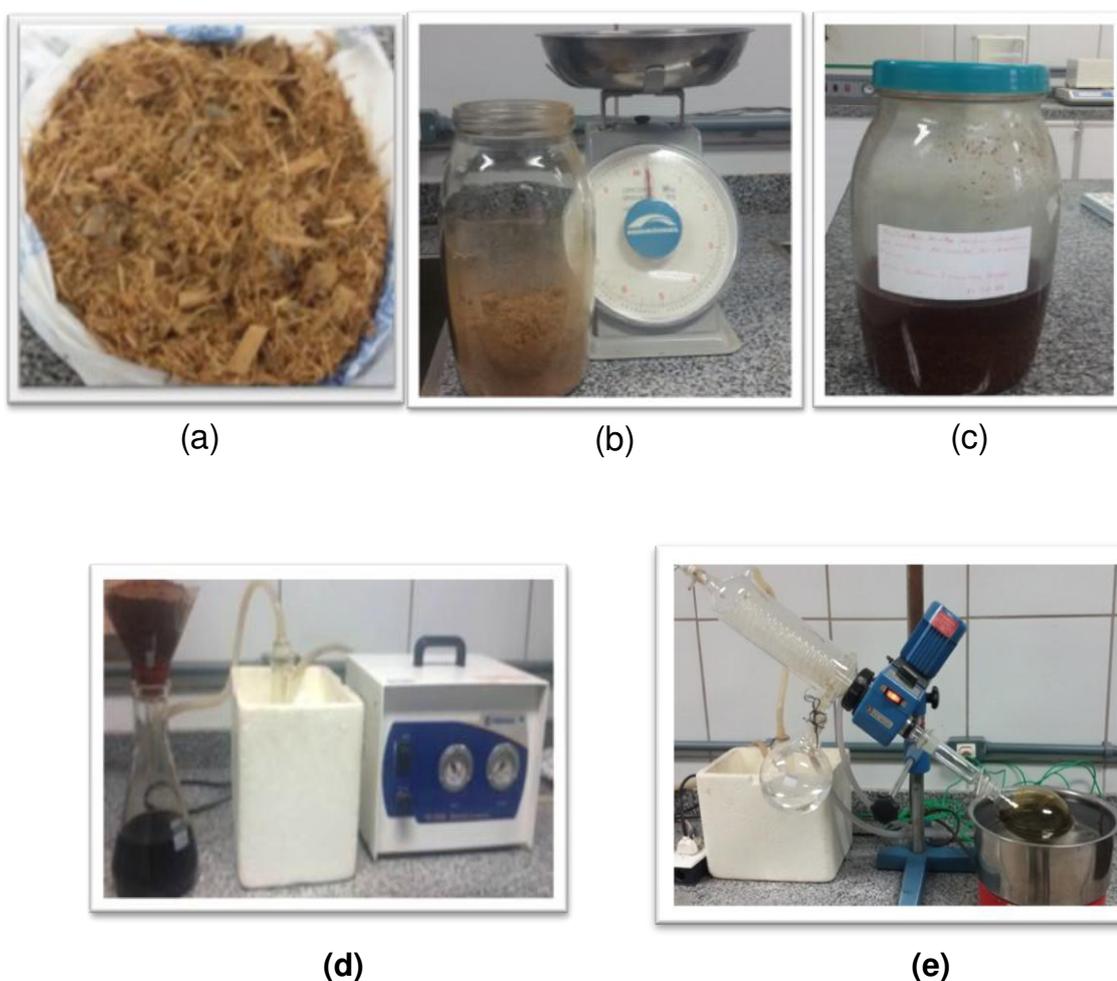


Figura 18: Processo de extração, filtração e concentração do extrato no rota evaporador. Cascas trituradas (a), pesagem (b), extração (c), filtração a vácuo (d), concentração (e), para obtenção do extrato bruto hidroalcoólico.

5.4.1 Peso Seco e Rendimento do Extrato Bruto Hidroalcoólico

A determinação do rendimento obtido na extração fez-se através do peso seco do extrato. Retirou-se três alíquotas de 1mL do extrato bruto e transferiu-se

para três frascos de vidro de massa determinada. Utilizou-se corrente de ar quente (secador de cabelo) e estufa à 100°C a fim de garantir a evaporação total do solvente contido nos frascos

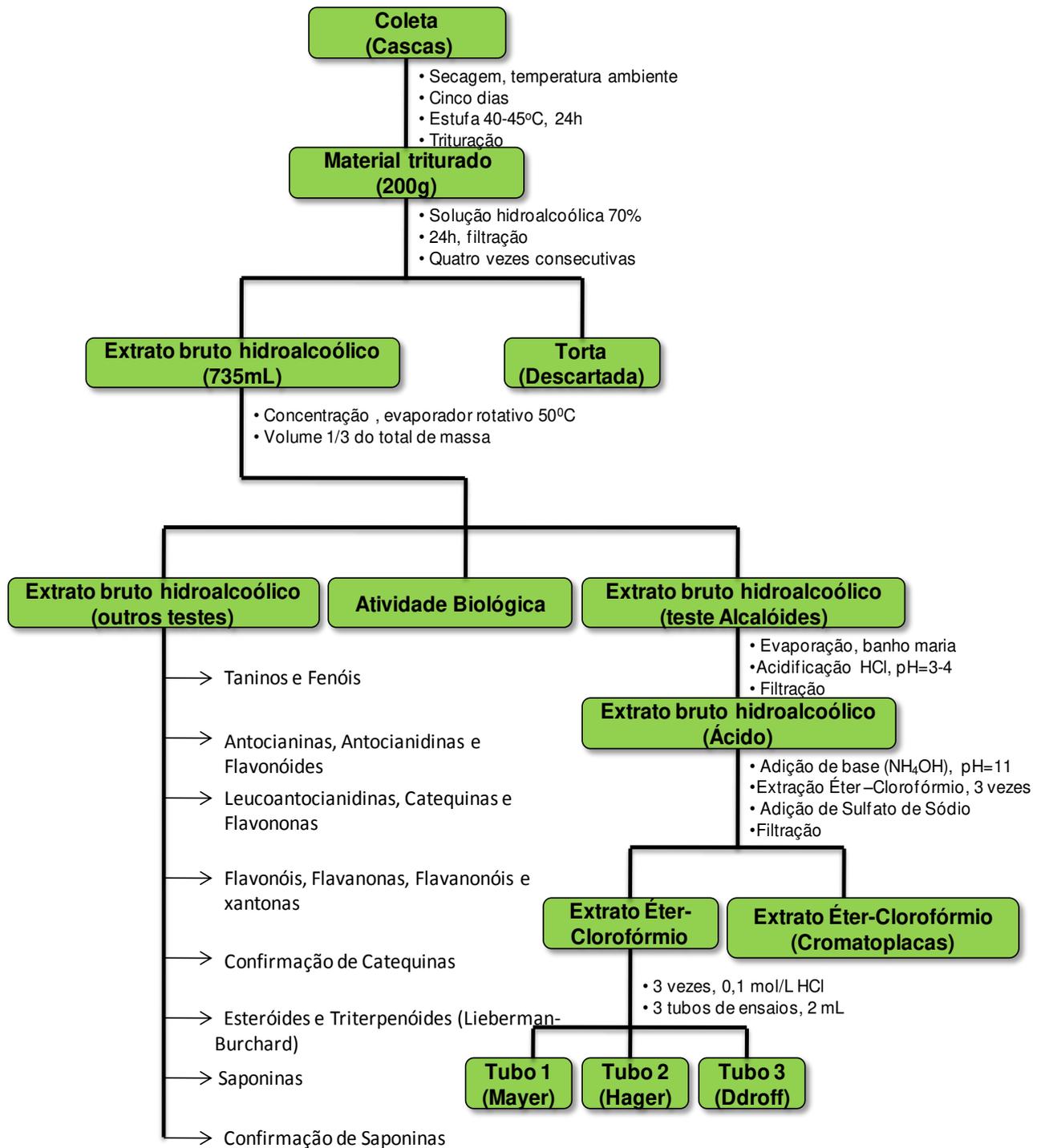


Figura 19: Fluxograma de preparação, extração e fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico e prospecção dos constituintes fitoquímicos das cascas da *Annona tomentosa*.

- Teste para Fenóis e Taninos

Adicionou-se 5 mL do extrato hidroalcoólico em um tubo de ensaio, acrescentou-se três gotas da solução de cloreto férrico (FeCl_3), agitou-se bem e observou-se a variação de cor ou formação de precipitado abundante, escuro. Em paralelo realizou-se um teste em branco, apenas água e cloreto férrico.

Coloração variável entre o azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis, quando o teste “branco” for negativo.

Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

- Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Tomou-se três tubos de ensaio em cada um adicionou-se 5 mL do extrato hidroalcoólico. Acidulou-se um deles a pH 3, alcalinizou-se outro a pH 8,5 e outro a pH 11. Observou-se a mudança da coloração do material de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação dos constituintes em função do pH do meio.

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido ⁽³⁾	Alcalino ^(8,5)	Alcalino ⁽¹¹⁾
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	--	--	Amarela
Chaconas e Auronas	Vermelha	--	Vermelho-púrpura
Flavonóis	--	--	Vermelho-laranja

Fonte: MATOS (2009), p.39

- Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Tomou-se dois tubos de ensaio em cada um adicionou-se 5 mL do extrato hidroalcoólico. Acidulou-se um deles por adição de HCl 3N até pH 3 e alcalinizou-se outro com NH_4OH até pH 11. Aqueceu-se ambos com auxílio de uma lâmpada de

álcool durante 2 minutos, cuidadosamente. Observou-se qualquer modificação na cor, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior.

O aparecimento ou a intensificação de cor indica a presença de constituintes específicos, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação dos constituintes pela variação da coloração em função do pH do meio.

Constituintes	Cor em meio	
	Ácido ⁽³⁾	Alcalino ⁽¹¹⁾
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-amarelado	-
Flavononas	-	Vermelha-laranja

Fonte: MATOS (2009), p.39

- Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Adicionou-se 5 mL do extrato hidroalcoólico a um tubo de ensaio com alguns centigramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. Aguardou-se o término da reação indicada pelo fim da efervescência e observou-se, a variação de cores por comparação com os tubos acidulados do teste anterior.

Aparecimento ou intensificação de cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

- Teste para confirmação de catequinas

Umedeceu-se bem a madeira de um palito de fósforo no extrato hidroalcoólico. Evaporou-se o solvente e reumedeceu-se uma face do palito com HCl concentrado, com auxílio de um bastão de vidro. Aqueceu-se o palito por 2 minutos ao calor de uma chama de álcool, evitando que ele fique tostado. Observou-se o aparecimento de coloração no lado acidulado do palito.

- Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard)

Adicionou-se 10 mL do extrato hidroalcoólico em um béquer, em seguida evaporou-se o solvente, extraiu-se o resíduo seco do béquer por três vezes com 2 mL de clorofórmio, filtrou-se a solução clorofórmica gota a gota em um pequeno funil fechado com algodão, coberto com algumas decigramas de Na_2SO_4 anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidro acético, agitou-se suavemente, logo em seguida adicionou-se cuidadosamente três gotas de H_2SO_4 concentrado. Tornou-se a agitar suavemente e observou-se se há rápido desenvolvimento de cor.

- Teste para saponinas

Tomou-se o resíduo insolúvel em clorofórmio, separado no teste anterior, dissolveu-se novamente com 10 mL de água destilada filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se o tubo com a solução, fortemente por 2 minutos e observou-se a formação de espuma.

- Teste para confirmação de saponinas

Adicionou-se 2 mL de HCl concentrado ao conteúdo do tubo preparado no teste anterior, deixou-se durante uma hora imerso em banho-maria. Deixou-se esfriar, neutralizou-se e agitou-se novamente.

- Teste para alcalóides

Tomou-se 1/3 do extrato hidroalcoólico restante, juntou-se NH_4OH até pH 11, extraiu-se as bases orgânicas com três porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL de uma solução éter-clorofórmica (3+1), em um funil de separação.

Tratou-se a solução éter-clorofórmica com Na_2SO_4 anidro para eliminar o excesso de água. Reextraiu-se as bases orgânicas da solução éter-clorofórmica, com três pequenas porções sucessivas de HCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$. Rejeitou-se a solução éter-clorofórmio, repartiu-se a solução ácida obtida em três tubos de ensaio. Adicionou-se a cada tubo, respectivamente, três gotas dos reagentes de

precipitação de alcalóides; Hager, Mayer e Dragendorff e em seguida fez-se cromatoplaça e foi pulverizada com dragendorff modificado.

5.5 METODOLOGIA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.5.1 Atividade Antimicrobiana pelo método de perfuração em meio Müller Hinton

Os experimentos para a determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico, foram realizados no laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Maranhão.

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padrão (ATCC) de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* 25923), Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* 27853), (*Escherichia coli* 35218), (*Klebsiella pneumoniae* 700603) e isolados clínicos de (*Acinetobacter baumannii*) e o fungo (*Candida albicans*).

Os microorganismos foram inicialmente reativados a partir das suas culturas originais e mantidas em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) à 37 °C por 24 horas, no entanto, para amostras fúngicas até 48 horas. Posteriormente, as amostras foram cultivadas em placas de Ágar Nutriente a 37°C por 18-24 horas e amostras fúngicas até 48 horas. Colônias isoladas foram então ressuspendidas em 3mL de solução fisiológica NaCl 0.89% estéril até atingir uma turbidez equivalente na escala 0,5 de Mc. Farland $1,5 \times 10^8$ bact/mL. Os testes foram realizados em triplicatas (CLSI, 2008).

O potencial antimicrobiano do extrato bruto hidroalcoólica foi avaliado pela técnica de perfuração em meio Müller Hinton, fez-se o semeio dos microorganismos e em seguida o meio foi perfurado com cilindros de (6 mm), posteriormente foram colocados nos poços 100 µL do extrato vegetal e seus respectivos controles, utilizou-se cloranfenicol como controle positivo (0,004/10ml) para as bactérias e cetoconazol (400mg/5ml) para a amostra fúngica. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para amostras bacterianas e fúngicas até 48 horas. Após incubação, foi medido o diâmetro do halo de inibição do crescimento quando presente. (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PESO SECO E RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO

Através da gravimétrica e da media aritmética, determinou-se o peso seco do extrato hidroalcoólico, cujo valor foi de 0,046 g/mL, com um total de massa obtida de 34 g e rendimento de 17%.

6.2 Prospecção Fitoquímica da *Annona tomentosa*

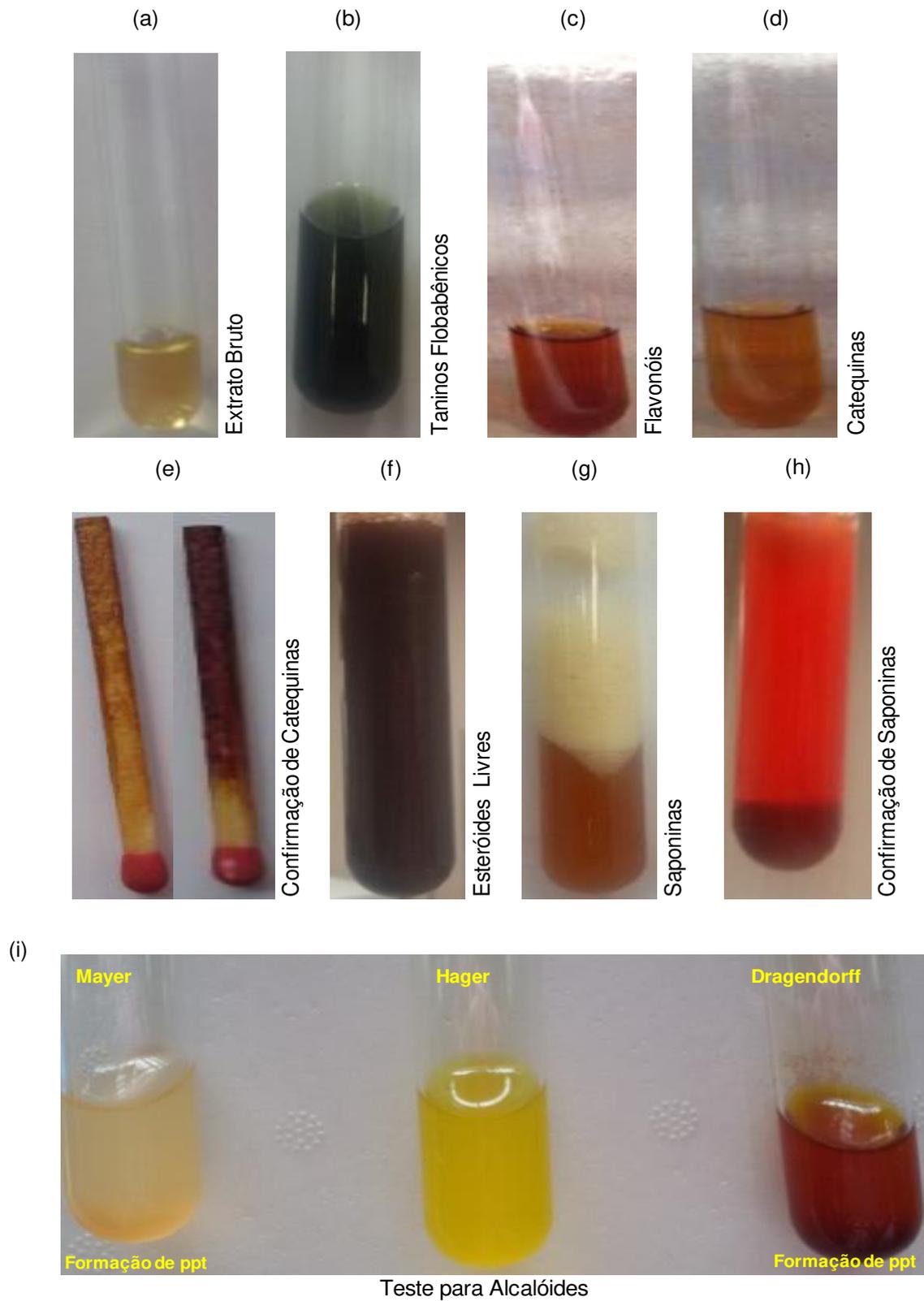
“A triagem fitoquímica caracteriza-se pela identificação de compostos químicos presentes na matéria prima vegetal” (SILVA et.al). Desse modo é que, através dos testes fitoquímicos realizados no extrato bruto hidroalcoólico das cascas do araticum bravo, foi possível identificar a presença de diferentes compostos orgânicos, assim como suas intensidades, descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico das cascas da *Annona tomentosa*

Constituintes	Resultados
Taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos)	++
Fenóis	++
Flavonóides, antocianidinas, antocianinas	++
Leucoantocianidinas, catequinas, flavononas	+++
Catequinas (confirmação)	+++
Esteróides Livres	++
Saponinas (Heterosídeos saponínicos)	+++
Confirmação de saponinas	+++
Alcalóides	+++

Forte: +++ **médio:** ++ **baixo:** + **Suspeito:** s **Insuficiente:** -

Os resultados foram satisfatórios, pois os constituintes identificados possuem grande importância para a química medicinal, dentre eles a presença de taninos, flavonóides, saponinas e os alcalóides nas cascas do *Araticum bravo* como mostra a (Figura 20). Os taninos são amplamente aplicados no curtume de couros (ALMEIDA, S.P. et al. 1998). No que tange a aplicação terapêutica, os taninos previnem a peroxidação de lipídios e degradação de nucleotídeos (LOPES, G.K.B et al., 1999, PIETTA, P.G. 2000), e aceleram o processo de cicatrização (PANIZZA, S et al. 1988). Já os flavonóides Inúmeras atividades biológicas estão associadas a esse grupo, como, por exemplo, funções antioxidante, antiinflamatória e anticancerígena (VERDI, L.G et al. 2005). A formação de espuma estável em tubo de ensaio, por intermédio de agitação vigorosa do extrato, revelou a presença de saponina. As saponinas têm sido associadas às atividades hemolítica, antiviral, antiinflamatória (SIMÕES, C. M. O. et al. 2004) e redução na falha congestiva cardíaca por de inibição do efluxo celular de Na^+ (SCHNEIDER, G. & WOLFLING, J. 2004). Os alcalóides apresentam grande atividade biológica, tais como, antitumoral, anestésica, antimalárica e apresenta atividade antidepressiva, sendo assim de grande importância farmacológica (BRUNETON, 1999).



Fonte: autora (2016)

Figura 20: Confirmação de alguns compostos durante os testes fitoquímicos.

6.2.1 Teste para Alcalóides em Cromatografia

O extrato bruto éter/clorofórmio, extraído a partir da base orgânica do extrato bruto da espécie vegetal *Annona tomentosa*, foi possível observar evidência forte característico de alcalóides como pode ser observado na (Figura 21).

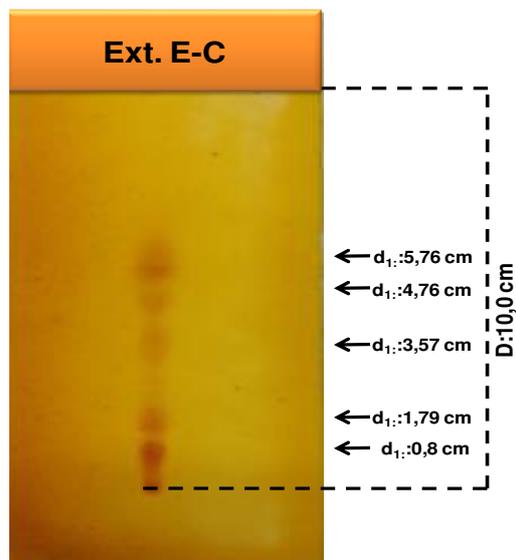


Figura 21: Placa do extrato éter-clorofórmio e utilizando como fase móvel DCM:Metanol (9,5:0,5) e revelado com reagente de dragendorff, com seus Rfs= 0,08; 0,179; 0,357; 0,476; 0,576.

6.3 Atividade Antimicrobiana *in vitro*

Tabela 5: Resultados do teste de perfuração para atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das cascas da *Annona tomentosa*

Microorganismos	Halos de inibição (mm)
	Extrato bruto hidroalcoólico
<i>Escherichia coli</i> 35218	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603	12
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	20
<i>Acinetobacter baumannii</i> (Isolado clínico)	20
<i>Candida albicans</i> (isolado clínico)	15

R:Resistente

- Bactérias Gram-negativas

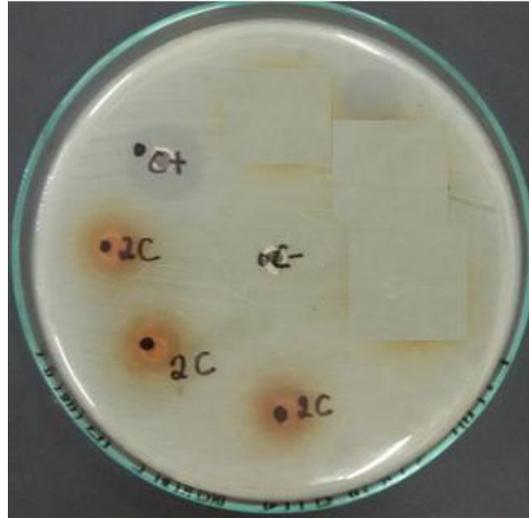


Figura 22: placa do teste de perfuração para a bactéria *Escherichia coli* 35218

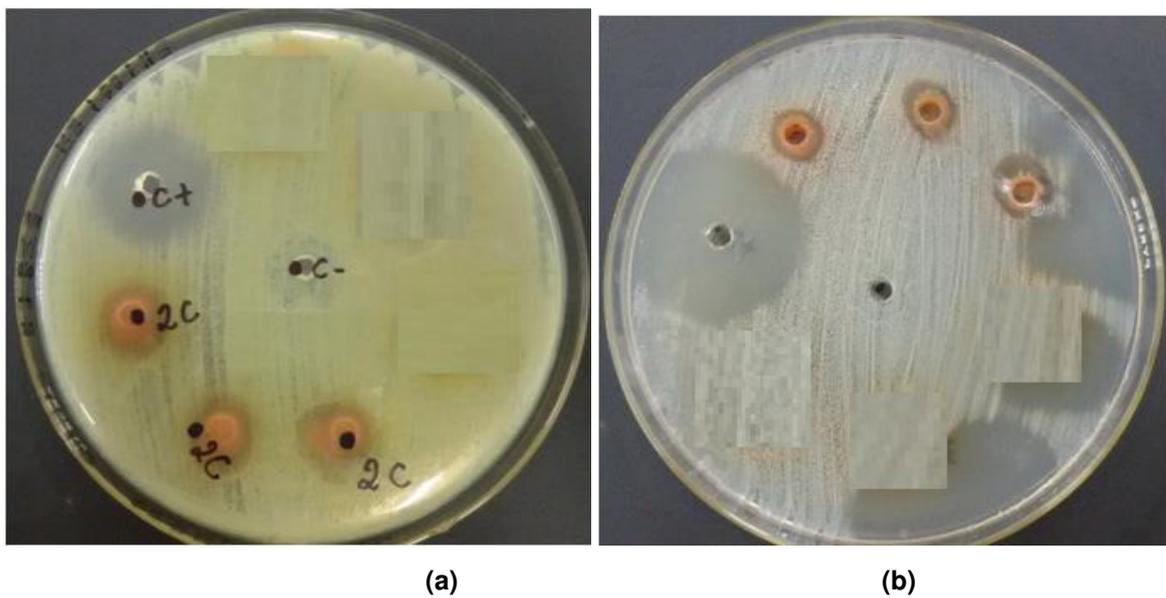


Figura 23:Placa do teste de perfuração para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* 27853. Imagem por fora (a), imagem por dentro (b).

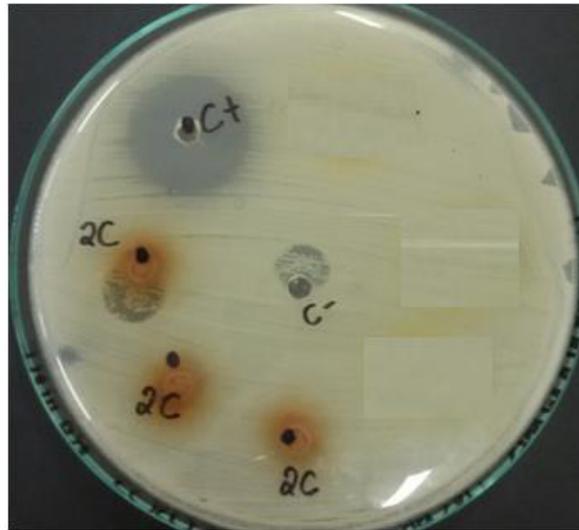


Figura 24:Placa do teste de perfuração para a bactéria *Klebsiella pneumoniae* 700603.

- **Bactéria Gram-positiva**

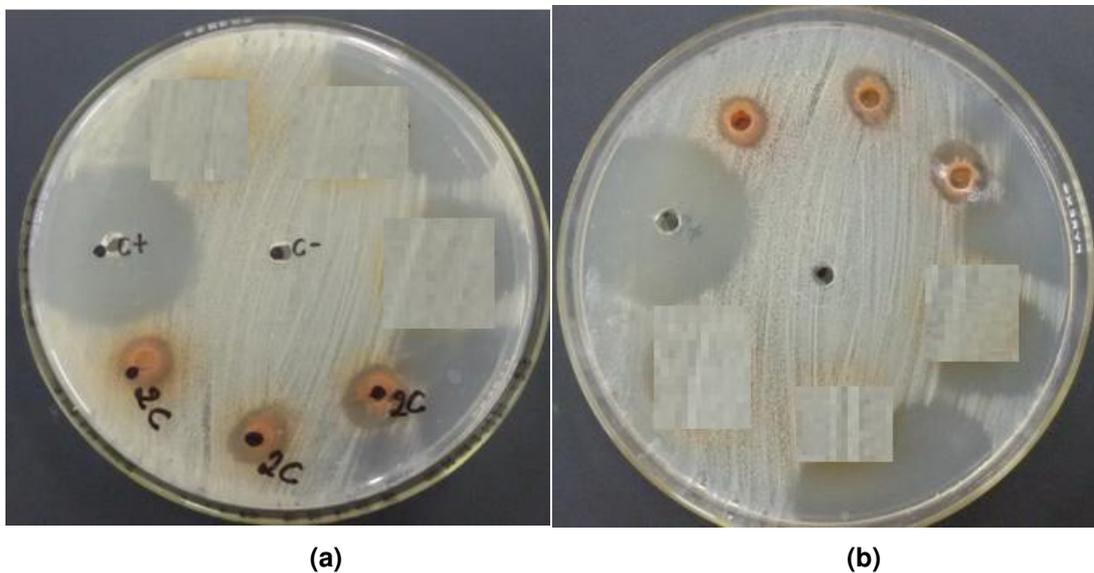


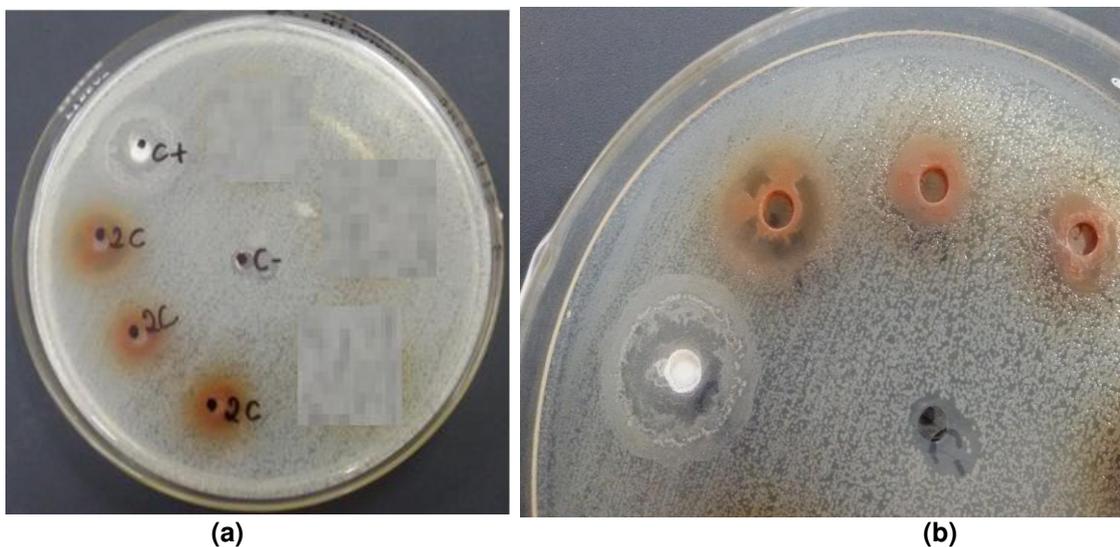
Figura 25:Placa do teste de perfuração para a bactéria *Staphylococcus aureus* 25923. Imagem por fora (a), imagem por dentro (b).

- Isolados clínicos



(a) (b)

Figura 26: Placa do teste de perfuração para a bactéria *Acinetobacter baumannii*. Imagem por fora (a), imagem por dentro (b).



(a)

(b)

Figura 27: Placa do teste de perfuração para o fungo *Candida albicans*. Imagem por fora (a), imagem por dentro com aproximação para atividade antimicrobiana da casca (b).

Utilizou-se os seguintes critérios para a classificação da atividade antimicrobiana (CIMANGA, et al. 2002): halo de inibição ≥ 15 forte inibição, $10 \leq$ halo

de inibição <15 inibição moderada e halo de inibição <10 inativo. Logo, dentre as bactérias utilizadas os resultados demonstraram que as cascas de *Annona tomentosa* apresentou potencial inibitório sobre a bactéria Gram-positiva e os microrganismos clínicos com destaque para *S. aureus* e *A. baumannii* com formação de halo de (20mm) respectivamente. Estudos relatam a atividade antimicrobiana do extrato bruto do caule da espécie *Annona hypoglauca* frente a bactérias Gram positivas, resultado também encontrado pela espécie em estudo na cepa de *S. aureus*.

Pesquisa realizada por (SADER et al, 2001), mostraram que os patógenos mais frequentemente isolados em alguns hospitais brasileiros foram *Staphylococcus aureus* (22,8%) essa é a responsável por metade das infecções hospitalares e mata cerca de 100 mil pacientes a cada ano nos Estados Unidos (DEMAIN e SANCHEZ, 2009), seguidos pela *Escherichia coli* (13,8%) e a *Pseudomonas aeruginosa* (13,3%). As infecções fúngicas, tornaram-se também importantes causas de infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos, ou também por outros fatores predisponentes (MIRANDA et al., 2003).

A bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli* 35218, apresentou resistência frente ao extrato bruto Hidroalcoólico, As bactérias Gram-negativas são citadas por possuírem resistência a muitos dos antibióticos comercializados, sendo a *E. coli* a mais proeminente, essa bactéria é causadora de outra doença infecciosa que ainda mata muitas pessoas é a diarreia.

A complexidade das bactérias Gram-negativas as torna menos suscetíveis aos agentes antimicrobianos (TADEG et al., 2005). A razão para a diferença na sensibilidade entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como observado na Tabela 5, pode estar ligada a diferenças na constituição morfológica desses micro-organismos, parecem diferir da constituição da parede celular bacteriana, composta por peptidoglicano, polímero complexo, além desta estrutura, as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa que confere a este grupo de micro-organismos uma efetiva barreira de permeabilidade, restringindo a penetração de alguns compostos. O conhecimento das diferenças entre as paredes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é da mais alta relevância para o estudo do mecanismo de ação dos quimioterápicos, de

patogenicidade e de outros tantos assuntos relacionados diretamente à composição química e estrutura da parede bacteriana (SCHAECHTER et al., 2002).

Embora nas amostras analisadas, não se possa apontar ainda qual o composto responsável pela atividade antimicrobiana, pois estudos posteriores de isolamento e identificação dos princípios ativos são necessários, é possível indicar estas espécies para estudos químicos e biológicos mais específicos devido à boa ação antimicrobiana observada e pela presença de metabólitos potencialmente ativos.

7 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais utilizadas neste trabalho podemos concluir que:

- ✓ A triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico demonstrou que a espécie testada apresenta metabolitos secundários interessantes dentre eles, os taninos, flavonóides, saponinas e os alcalóides, como consta na literatura.
- ✓ Através da técnica de cromatografia do extrato bruto foi possível confirmar a presença de alcalóides.
- ✓ Os resultados obtidos neste trabalho apontam um grande potencial inibitório sobre a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e o isolado clínico *A. baumannii* com formação de halo de inibição (20mm) respectivamente, O que permite a continuação do estudo e novas possibilidades para a produção de um novo antimicrobiano de origem vegetal.

REFERÊNCIAS

- ALALI, F. Q.; LIU, X.-X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products**, vol. 62, N. 3, P.504-540, 1999.
- ALMEIDA, S.P., C.E.B. PROENÇA, S.M. SANO & J.F. RIBEIRO Cerrado: espécies /vegetais úteis. **Embrapa - CPAC**, Planaltina. 464 p, 1998.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, ano V, n. 12, 2007.
- ALVES, Clayton Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**. Vol. 33, n. 10, 2010.
- ARRUDA, M.B. et al. Ecosistemas Brasileiros. **Ed. IBAMA**. Brasília, 2001.
- BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma** 17: 80- 83. 2005.
- BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, E. E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, 22, 269-303, 2005.
- BLOCK LC, SANTOS ARS, SOUZA MM, SCHEIDT C, YUNES RA, SANTOS MA, MONACHE F, CECHINEL V **Chemical and pharmacological examination of anti-conceptive constituents of Wedelia paludosa**. **J Ethnopharmacol** 61: 85-89, 1998
- BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; JUNEAU, J. P.; BHACCA, N. S.; MUKHERJEE, R. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, 18 (9), 1584-1586, 1979.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. & LIMA, H.C. de Sistemática de Angiospermas do Brasil, v. 3, Universi//Federal de Viçosa, **Imprensa Universitária**, 326p.1991 il.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. 2.ed. Paris: Lavoisier; Secaucus: Intercept**, p.784-799, 1999

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnofarmacology**, v.100, n.1-2, p.131-4, 2005.

CAMARA, Marcos Bispo Pinheiro. **Estudo Fitoquímico da Espécie Vegetal Araticum Bravo***Annona tomentosa*. Monografia. São Luís-MA, 2013.

COLOM, O. A.; NESKE, A.; CHAHBOUNE, N.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARDÓN, A. Tucupenol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *annona Montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. **Chemistry & Bioadiversity**, vol. 6, n. 3, p. 335-340, 2009.

COSTA, E. V.; CRUZ, P. E. O.; LOURENCO, C. C.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; SALVADOR, M. J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, v. 27, p.1002-1006, 2013.

CHANG FR, YANG PY, LIN JY, LEE KH, WU YC. **Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. J Nat Prod 61: 437-439, 1998.**

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, p. 5-40, 2012.

CHEN CH, HSIEH TJ, LIU TZ, CHERN CL, HSIEH PY, CHENCY. Annoglabayin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annomontacin from the fruits of *Annona glabra*. **J Nat Prod** **67**: 1942-1946.10, 2004.

CIMANGA, K. et al., Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology** **79**: 213-220, 2002.

COSTA-LOTUFO LV, CUNHA GM, FARIAS PA, VIANA GS, CUNHA KM, PESSOA C, MORAES MO, SILVEIRA ER, GRAMOSA NV, RAO VSThe cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from **Copaifera langsdorffii oleo-resin**. **Toxicon** **40**: 1231- 1234, 2002

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; VALDEZ, R. H.; NAKAMURA, T. U.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v. **16**, p. 9714-9720, 2011.

COSTA VCO, TAVARES JF, AGRA MF, FALCÃO-SILVA VS, FACANALI R, VIEIRA MAR, MARQUES MOM, SIQUEIRA-JÚNIOR JP, SILVA MS Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Rev Bras Farmacogn** **18**: 245-248, 2008

COWAN, M.M. Plant. **Products as antimicrobial agents**. **Clinical Microbiology Reviews**. v. **12**, n.4, p. 564-582, Oct. 1999.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. *Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections*. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**, ed. 3, edited by V. LORIAN, Willians & Wilkins, Baltimore, ch. 21. 1991.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2^a Ed., **John Wiley & Sons**, Inc., New York, 507 p., 2002.

DINIZ, T. C.; ARAÚJO, C. S.; SILVA, J. C.; OLIVEIRA JUNIOR, R. G.; LIMA-SARAIVA, S. R. G.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; NUNES, X. P.; ALMEIDA, J. R. G. S. Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, p. 2729-2735, 2013.

DESCHNER, E.E. et al. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, London, v. 7, p. 1193-1196, 1991.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. MICROBIAL drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, 62, 5-16, 2009.

FEHLBERG, I.; OLIVEIRA, R. A.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Atividade antibacteriana de flavonóides e triterpenos de *Myrcia guianensis*. **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química** – Fortaleza- CE, 2009.

FRANCO, E.S. & MAIA, M.B.S. Avaliação pré-clínica da toxicidade e atividade cicatrizante de uma formulação semi-sólida do óleo de linha (*Linum usitatissimum* L.). Programa de Pós-Graduação em inovação terapêutica: descortinando a interdisciplinalidade / organizador Galdino, SL [et al.]; Recife: **Ed. Universitária da UFPE**, p134, 2009.

GONÇALVES, A.L. Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais. 209p. **Tese de Doutorado em Ciências Biológicas** – Universidade Paulista, 2007.

HARBONE, J.B. **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 2.ed. London: Chapman and Hall, 288p. 1984.

HARBORNE, J.B. **The Flavonoids**. New York: Chapman and Hall, 676p. 1994.

JORGE, S. S. A. & MORAIS, R. G. Etnobotânica de plantas medicinais. In: Coelho, M. F.B.; Costa Junior, P.; Dombroski, J. L. D. (Org.) Diversos olhares em Etnobotânica, Etnoecologia e Plantas Medicinais. **Anais do I Seminário Mato Grossense de Etnobiologia e Etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Medicinais**. Cuiabá: UNICEN. p.89-98. 2003.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The **phytochemistry of the Annonaceae**. *Phytochemistry*, **21** (12), 2783-2813, 1982.

LIU, X.X., PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Two novel acetogenins, annoglaxin and 27-hydroxybullatacin, from *Annona glabra*. *Journal of Natural Product*, **62**, 848-852, 1999.

LAGE, G. A. Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários das folhas de *Annona crasiflora* Mart. (Annonaceae). **Dissertação em Química (mestrado)** – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; Boaventura, M. A. D. Acetogenins from *Annonacornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*, v. 122, p. 1129-1138, 2010.

LIMA, J. P. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. S.; SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; JARDIM, I. S.; COSTA, E. V. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química*, v. 4, p. 692-702, 2012.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. Ambiente: **Gestão e Desenvolvimento**, 1(1):19-27. 2006.

LOPES, G.K.B.; SCHUMAN, H.M. & HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction complexing ferrous ions. *Biochemical et BiophysicaActa*. 1472:142-152, 1999.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 2002.

LUNA, A. F.; FREITAS, T. M. B.; ALVES, I. C.; PINTO, C. E. M.; LUZ, E. W. M. Atividade fitoquímica e antioxidante da folha *Annona muricata* L. frente ao radical ABTS. **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí**, Campus Teresina -Zona Sul. 2010.

MAAS, P.J.M., RAINER, H. & LOBÃO, A.Q.. Annonaceae. In R.C. Forzza et al. (orgs.) **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, vol. 1, p. 602-614, 2010.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: EUFC, 2009. 125p.

MEYER, B.N. et al. A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MELOT, A.; FALL, D.; GLEYE, C.; CHAMPY, P. Apolar Annonaceous acetogenins from the fruit of *Annona muricata*. **Molecules**, vol 14 n. 11, p. 4387-4395, 2009.

MIRANDA, E.T. et al. Epidemiologia de candidíase hospitalar: importância da identificação específica. **Rev. Ciên. Farm.**, v. 24, n. 1, p. 39-45, 2003.

MOREIRA, D. L.; LEITÃO, S. G.; GONÇALVES, J. L. S.; WIGG, M. D.; LEITÃO, G. G.; **Quim. Nova**, 28, 421, 2005.

NASCIMENTO AA, RIBEIRO EAN, OLIVEIRA JM, MEDEIROS FA, SILVA MS, MEDEIROS IA. Cardiovascular effects induced by the hydroalcoholic extract of the stem of *Xylopiya cayennensis* in rats. **Rev Bras Farmacogn** 16: 17-21, 2006.

OLIVEIRA BH, SANT'ANA AE, BASTOS DZ Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. **Phytochem Anal** 13: 368-371 2002.

PIMENTA, L. P. S. Estudo químico bio-monitorado das sementes de *Annona crassiflora* objetivando o isolamento de acetogeninas tetra-hidrofurânicas. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX – UFM. **Tese de doutorado**, 1995.

PIETTA, Pier G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.** v. 63, n. 7, p. 1035- 1042. 2000.

PADMAJA V, THANKAMANY V, HARA N, FUJIMOTO Y, HISHAM A. Biological activities of *Annona glabra*. **J Ethnopharmacol** 48: 21-24, 1995

PAGE JE, BALZA F, NISHIDA T, NEIL TOWERS GH Biologically active diterpenes from *Aspilia mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant. **Phytochemistry** 31: 3437-3439, 1992.

PANIZZA, S.; ROCHA, A.B.; GECCHI, R.; SOUZA, E. & SILVA, R.A.P. Strypnodendron barbadetiman (vellozo) martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, 10:101-106, 1988.

PAIVA LA, GURGEL LA, SILVA RM, TOME AR, GRAMOSA NV, SILVEIRA ER, SANTOS FA, RAO VS. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffi* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascul Pharmacol** 39: 303-307, 2002.

PISCO, L.; KORDIAN, M.; PESEKE, K.; FEIST, H. MICHALIK, D.; ESTRADA, E.; CARVALHO, J.; HAMILTON, G.; RANDO, D.; QUINCOCES, J. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 41, 401-407, 2006.

QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A.; PAULO, M. Q.; FOURNET, A. Pseudo and spinosine, two catecholic berberines from *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, 59, 438-440, 1996.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 906 p. 2007.

RIBEIRO, J.F., M.A. BRITO, E.J.S. JUNIOR & C.E.L. FONSECA. **Araticum (Série Frutas Nativas, 12)**. FUNEP. Jaboticabal. 52 p. 2000.

RIBEIRO LAA, TAVARES JF, ANDRADE NC, SILVA MS, SILVA BA O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopiya langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Rev Bras Farmacogn** **17**: 197-203, 2007.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacol.** **23**, 127-149, 1988.

RICE-EVANS, Catherine; MILLER, Nicholas J.; PAGANGA, George. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

SADER, H.S. et al. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros – Resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **J. Pneumol**, v. **27**, n. 2, 2001.

SARTORI, M.R.K.; PRETTO, J.B.; CRUZ, A.B.; BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.A.; CECHINEL FILHO, V., Antifungal Activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (Acmela brasiliensis) (ASTERACEAE), **Pharmazie**, v. **58**, n. 8, p. 567-9, 2003

SANTOS, A.S., E.H.A. ANDRADE, M.G.B. ZOGHBI & J.G.S. MAIA. Volatile constituents of fruits of *Annona glabra* L. from **Brazil**. **Flavour and Fragrance Journal**, **13**: 148-150, 1998.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. **55**, n. 6, p. 567-573, 2000.

SANTOS, L. P., M.A. SUN, N.J. BOAVENTURA, J.M. CASSADY & A. B. OLIVEIRA. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona Crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, **42**: 705-707.13, 1996.

SANTOS PIMENTA, L. P.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F. E., Boaventura, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plantas using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, **10**, 209-212, 2003

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

SANTOS, P. R. D.; MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dióica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **14** (3), 369-400, 2003.

SCHNEIDER, G. & WOLFLING, J. Synthetic cardenolides and related compounds. **Current Organic Chemistry**, 8(14):1381-1403, 2004.

SIEBRA, C.A.; NARDIN, J.M.; FLORÃO, A.; ROCHA, F.H.; BASTOS, D.Z.; OLIVEIRA, B.H.; WEFFORT-SANTOS, A.M. Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(1): 82-88, 2009.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora da Universidade-UFRGS. 5 ed. 1102p, 2004.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M. & ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.618-626, 2008.

SILVA, R.; MAIA, S. S. S.; CARDOSO, M.G.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Rendimento de extratos e triagem fitoquímica de ponta livre (*Wedelia paludosa* D. C). Disponível em:

http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/44_148.pdf

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis, Ed. da UFSC, 2004.

SLIMESTRAD R, MARSTON A, MAVI S, HOSTETTMANN K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. **Planta Med** **61**: 562-563, 1995.

TADEG, H. et al. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. **J. Ethnopharmacol.**, v. **100**, p. 168-175, 2005.

TIRAPELLI CR, AMBROSIO SR, DA COSTA FB, COUTINHO ST, DE OLIVEIRA DC, DE OLIVEIRA AM. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **Eur J Pharmacol** **492**: 233-241, 2004.

VALTER JL, ALENCAR KMC, SARTORI ALB, NASCIMENTO EA, CHANG R, MORAIS SAL, LAURA VA, NÍDIA YOSHIDA NC, CAROLLO CA, SILVA DB, GRASSI RF, FABRI JR, SIQUEIRA JM. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Rev Bras Farmacogn** **18**: 373-378, 2008.

VEIGA JVF; PINTO AC. **Química Nova**, **25**, 273, 2002.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.464-71, 2008.

VELIKOVA M, BANKOVA V, TSVETKOVA I, KUJUMGIEV A, MARCUCCI MC. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia** **71**: 693-696, 2000.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C. & PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quim. Nova**, **28**(1): 85-94, 2005.

VIEIRA HS, TAKAHASHI JA, Boaventura MA. Novel derivatives of ent-17,19-dihydroxy-16,βHkaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. **J Agric Food Chem** **50**: 3704-3707, 2002.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**.Chapecó, Argos. 120p. 2001.

ZHANG YH, PENG HY, XIA GH, WANG MY, HAN Y Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* Linn.**Acta Pharmacol Sin** 25: 937-942, 2004.

ANEXO :

REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS NA PROSPECÇÃO DOS CONSTITUINTES FITOQUÍMICOS.

- ✧ **Cloreto Férrico:** Dissolva 9 g de cloreto férrico em cerca de 50 mL de água e 2 mL de ácido clorídrico 3N e dilua com q.s. de álcool etílico para obter 100 mL.
- ✧ **Ácido Clorídrico (3N):** Dilua 33,3 mL de HCl concentrado com água até obter 100 mL. Esta solução é correspondente a 10% p/v de HCl.
- ✧ **Hidróxido de Amônio concentrado:** Separe e reacondicione porções de 100 mL em frascos de tampa rosqueada. CUIDADO: evite aspirar os vapores e o contato com os olhos, pele e Mucosas.
- ✧ **Anidrido Acético:** Meça 250 mL de anidrido acético, “pro análise” transfira rapidamente para um frasco de tampa rosqueada.
- ✧ **Mistura Éter-clorofórmio (3 + 1):** Em uma proveta de 1000 mL colocar 770 mL de éter etílico e adicionar 330 mL de clorofórmio. Transfira para um frasco de tampa segura. Conservar longe do calor. CUIDADO: vapores tóxicos e inebriantes. Evite aspirar os vapores.
- ✧ **Reagente de Dragendorff (Iodobismutado de Potássio):** Junte 50 cm³ de água a 5 g de carbonato de bismutila, adicione 12 cm³ de HCl e agite até sua quase dissolução; junte, aos poucos e agitando sempre, 25 g de iodeto de potássio e, após dissolução, complete com água até obter 100 mL.
- ✧ **Reagente de Dragendorff Modificado (reagente de pulverização de cromatoplacas ou papel):** Em um balão de 100 mL, junte a 25 mL do reagente de Dragendorff, 18 mL de ácido acético e complete os 100 mL com água destilada.
- ✧ **Reagente de Hager (solução saturada de ácido pícrico):** Dissolva 12 g de ácido pícrico em 100 mL de água quente. Deixe esfriar e filtre. Conserve em frasco de tampa esmerilhada.
- ✧ **Reagente de Mayer (Iodomercurato de potássio):** Dissolva 1,35 g de cloreto de mercúrio em 60 mL de água e 5 g de iodeto de potássio em 20 mL de água. Misture as duas soluções e dilua com água até obter 100 mL.