



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

**AGLAETE DE ARAÚJO PINHEIRO**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
CITOTÓXICA DA ENTRECASCA DO CAULE DE *Annona tomentosa* R. E. Fr.**

**São Luís**

**2019**

AGLAETE DE ARAÚJO PINHEIRO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
CITOTÓXICA DA ENTRECASCA DO CAULE DE *Annona tomentosa* R. E. Fr.**

Monografia apresentada ao curso de Química Licenciatura da Universidade Federal do Maranhão como requisito à obtenção do grau de Licenciada em Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Quintino da Rocha.

**São Luís**

**2019**

Pinheiro, Aglaete de Araújo.

Caracterização química, atividade antimicrobiana e citotóxica da entrecasca do caule de *Annona tomentosa* R. E. Fr / Aglaete de Araújo Pinheiro. - 2019.  
45 f.

Orientador(a): Cláudia Quintino da Rocha.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, 2019.

1. Alcaloides. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Toxicidade. I. Rocha, Cláudia Quintino da. II. Título.

AGLAETE DE ARAÚJO PINHEIRO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
CITOTÓXICA DA ENTRECASCA DO CAULE DE *Annona tomentosa* R. E. Fr.**

Monografia apresentada ao curso de Química Licenciatura da Universidade Federal do Maranhão como requisito à obtenção do grau de Licenciada em Química.

Aprovada em: 28/06/2019

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Quintino da Rocha (Orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carla Janaína Rebouças Marques do Rosário  
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Iranaldo Santos da Silva  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

*Aos meus pais, Aglaete e Marcos, a minha  
irmã, Joana Caroline, ao meu companheiro,  
Lucas Queiroz e ao fiel amigo, Téo, por toda  
confiança, amor, apoio e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor, força, bênção e infinita sabedoria. Por ser o maior e melhor guia em todos os momentos.

A minha família, pelo esforço, carinho, investimento e orações. Em especial aos meus avós, Alzerina Bezerra e Domingos de Araújo, pelo amor puro e palavras de apoio, ao meu primo, Juninho (*in memoriam*), que sempre acreditou em mim e a minha tia, Aglaer Araújo, pelas madrugadas de estudo dedicadas ao meu aprendizado.

A minha orientadora, Dra. Cláudia Rocha, pela confiança, conhecimento, disposição e incentivo.

Ao Prof. Ms. Marcos Camara, pelo exemplo, amizade, paciência, carinho, dedicação e valiosos ensinamentos.

A todos os professores que tive ao longo de minha vida, pela contribuição na minha formação pessoal e profissional.

A todos os alunos e professores do Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos, pelo conhecimento compartilhado, amizade e cooperação para a realização deste trabalho.

Ao secretário da coordenação do curso de Química e amigo, Igor Santos, pelos conselhos, auxílio, generosidade e carinho de sempre.

A Profa. Dra. Ana Paula dos Santos e a doutoranda Sulayne Guimarães do Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer da Universidade Federal do Maranhão, pelas contribuições nos ensaios antitumorais.

Ao Prof. Dr. Luís Cláudio da Silva, a Ma. Maria Maia, aos alunos Deivid Santos e Alexander Carvalho do Laboratório de Imunologia das Doenças Infeciosas e Parasitárias da Universidade CEUMA, pela colaboração nos ensaios antimicrobianos.

Aos amigos Luiz Fernando, Mateus Felipe, Regina Ferreira, Marcos Thiago, Thaynara Thereza e Débora Evelyn, que sempre se fizeram presentes de alguma forma e se colocaram à disposição para compartilhar momentos de alegria, tristeza e ansiedade.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes. ”*

*(Marthin Luther King)*

## RESUMO

A resistência antimicrobiana é a capacidade de um microrganismo em resistir aos efeitos dos medicamentos utilizados anteriormente para o seu combate, sendo responsável pelo grande percentual de mortalidades em diversos países. Pesquisas recentes relatam o aumento de microrganismos resistentes e a escassez na descoberta de novos fármacos antimicrobianos. Dessa forma, uma das principais alternativas tem sido o uso de produtos naturais para a descoberta de moléculas bioativas no controle de infecções. Nessa perspectiva, o presente estudo avaliou o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato hidroetanólico e fração alcaloídica de *A. tomentosa*. Os resultados do teste biológico indicaram que o extrato de *A. tomentosa* apresentou baixa atividade para *S. aureus* enquanto a fração foi moderadamente ativa frente à *S. aureus*, *E. faecalis* e *S. typhimurium*. Além disso, o extrato não apresentou efeitos citotóxicos quando comparado com o grupo controle (MRC 5), mas demonstrou significativa citotoxicidade para as células tumorais HeLa, DU 145 e MCF 7. Por meio da avaliação da composição química constatou-se a presença de alcaloides, substâncias que podem estar associadas a tais atividades. Até o momento, este é o primeiro relato de caracterização química, investigação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo e citotoxicidade pelo método de redução do MTT para entrecasca do caule de *A. tomentosa*, uma espécie de poucos estudos descritos na literatura.

**Palavras-chave:** Resistência antimicrobiana. Toxicidade. Alcaloides.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is the ability of a microorganism to withstand the effects of previously used drugs for its treatment, accounting for the large percentage of mortalities in several countries. Recent research reports the increase in resistant microorganisms and the scarcity of new antimicrobial drugs. Thus, one of the main alternatives has been the use of natural products for the discovery of bioactive molecules in the control of infections. In this perspective, the present study evaluated the antimicrobial potential in vitro of the hydroethanolic extract and alkaloid fraction of *A. tomentosa*. The results of the biological test indicated that the extract of *A. tomentosa* showed low activity for *S. aureus* while the fraction was moderately active against *S. aureus*, *E. faecalis* and *S. typhimurium*. In addition, the extract showed no cytotoxic effects when compared to the control group (MRC 5), but demonstrated significant cytotoxicity for HeLa, DU 145 and MCF 7 tumor cells. The presence of alkaloids, substances that may be associated with these activities, was observed through the evaluation of the chemical composition. To date, this is the first report of chemical characterization, investigation of antimicrobial activity by the broth microdilution method and cytotoxicity by the MTT reduction method for *A. tomentosa* stem bark, a species of few studies described in the literature.

**Keywords:** Antimicrobial resistance. Toxicity. Alkaloids.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Espécie <i>Annona tomentosa</i> .....	19
<b>Figura 2</b> – Início da floração (A), Pétalas externas (B), Pétalas internas (C), após a queda das pétalas (D) e pequenos frutos (E) de <i>Annona tomentosa</i> .....	20
<b>Figura 3</b> – Alcaloides isolados de espécies de <i>Annona</i> .....	21
<b>Figura 4</b> – Acetogeninas isoladas de <i>Annona squamosa</i> .....	21
<b>Figura 5</b> – Diterpenos ent-kauranos isolados de espécies de <i>Annona</i> .....	22
<b>Figura 6</b> – Flavonoides isolados de espécies de <i>Annona</i> .....	22
<b>Figura 7</b> – Estruturas químicas de alcaloides isolados de <i>Annona</i> .....	23
<b>Figura 8</b> – Alcaloides das espécies <i>G. velutinus</i> e <i>Z. stelligerum</i> .....	24
<b>Figura 9</b> – CCD da fração clorofórmica utilizando sistema de eluição DCM/MeOH (9:1)....	29
<b>Figura 10</b> – Cromatograma de íons totais do extrato hidroetanólico de <i>A. tomentosa</i> .....	30
<b>Figura 11</b> – Perfil cromatográfico e espectros no UV para os picos representativos da fração alcaloídica de <i>A. tomentosa</i> .....	31
<b>Figura 12</b> – Íon extraído e espectro de fragmentação para anonaina .....	33
<b>Figura 13</b> – Íon extraído e espectro de fragmentação para assimilobina.....	34
<b>Figura 14</b> – Íon extraído e espectro de fragmentação para norushinsunina .....	35
<b>Figura 15</b> – Íon extraído e espectro de fragmentação da quercetina- <i>O</i> -glucosídeo .....	36
<b>Figura 16</b> – Proposta de fragmentação para quercetina- <i>O</i> -glucosídeo.....	37
<b>Figura 17</b> - Viabilidade celular do extrato de <i>A. tomentosa</i> frente às células MRC 5, HeLA, DU 145 e MCF 7 .....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Taxonomia da planta.....	18
<b>Tabela 2</b> – Resultados das extrações do extrato bruto e fração alcaloídica.....	29
<b>Tabela 3</b> – Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e fração de <i>A. tomentosa</i> .....	38

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BHI – Meio de cultura *Brain Heart Infusion*
- C18 – Sílica ligada à cadeia de carbono octadecil
- CCD – Cromatografia de Camada Delgada
- CFM – Concentração Fungicida Mínima
- CH<sub>2</sub>O – Formaldeído
- CH<sub>3</sub>OH – Metanol
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CN – Controle Negativo
- CO – Monóxido de Carbono
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono
- CP – Controle Positivo
- DCM – Diclorometano
- DMEM – Meio de cultura celular Dulbecco MEM
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DU 145 – Célula humana tumoral epitelial de tumor metastático na próstata
- ELISA – Leitora de microplacas
- ESI – Fonte de Ionização Eletrospray
- FIA – Análise por Injeção em Fluxo
- HCl – Ácido clorídrico
- HeLa – Célula humana tumoral epitelial de cólon do útero
- HPLC-PDA – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à detecção de Arranjo de Diodos
- HPLC-UV-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à detecção Ultravioleta e Espectrometria de Massas
- IT – Analisador de Armadilha de Íons
- m/z* – Relação massa/carga
- MCF 7 – Célula humana tumoral epitelial de tumor metastático na glândula mamária

MRC 5 – Fibroblastos derivados de tecido pulmonar

MS/MS – Dois estágios de espectrometria de massas

MTT – Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio

N<sub>2</sub> – Dinitrogênio

NH<sub>3</sub> – Amônia

NH<sub>4</sub>OH – Hidróxido de amônio

PBS – Solução tampão fosfato

pH – potencial Hidrogeniônico

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SPE – Extração em Fase Sólida

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Detector Ultravioleta e Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1	Geral .....	17
2.2	Específicos .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1	Família Annonaceae .....	18
3.2	Gênero <i>Annona</i> .....	18
3.3	<i>Annona tomentosa</i> .....	19
3.4	Metabólitos secundários frequentes em <i>Annona</i> .....	20
3.5	Potencial antimicrobiano de alcaloides .....	23
<b>4</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>25</b>
4.1	Coleta e Preparo do Extrato .....	25
4.2	Extração Ácido-Base .....	25
4.3	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	25
4.4	Identificação dos constituintes químicos de <i>Annona tomentosa</i> .....	26
4.4.1	HPLC-PDA .....	26
4.4.2	HPLC-UV-MS .....	26
<b>4.5</b>	<b>Ensaio <i>in vitro</i></b> .....	<b>27</b>
4.5.1	Citotoxicidade pelo método de redução do MTT .....	27
4.5.2	Atividade Antimicrobiana .....	28
4.5.2.1	Microrganismos utilizados .....	28
4.5.2.2	Padronização das suspensões bacterianas e fúngicas .....	28
4.5.2.3	Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e fração alcaloídica .....	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
5.1	Rendimento do Extrato Bruto e Fração Alcaloídica de <i>Annona tomentosa</i> .....	29
5.2	Detecção de alcaloides por Cromatografia em Camada Delgada.....	29
5.3	Identificação das substâncias do extrato e fração alcaloídica da entrecasca do caule de <i>Annona tomentosa</i> .....	30
5.4	Avaliação da citotoxicidade pelo método de redução do MTT para o extrato hidroetanólico da entrecasca do caule de <i>Annona tomentosa</i> .....	37

5.5 Atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico e fração alcaloídica de <i>Annona tomentosa</i> por microdiluição .....	38
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O surgimento e a disseminação da resistência antimicrobiana crescem a cada dia (MALIK et al., 2017). Nos últimos anos, esta vem apresentando desafios substanciais no tratamento de doenças infecciosas, atingindo cerca de 700.000 vidas por ano. Desse modo, se as previsões forem verídicas, a resistência antimicrobiana ultrapassará o câncer como a principal causa de morte e será a responsável direta por enormes perdas econômicas em todo o mundo nos próximos 30 anos (SEMRET; HARAOU, 2018).

Acredita-se que uma forma de lidar com essa ameaça é através do reabastecimento do fluxo decrescente de antimicrobianos, focando em novos mecanismos de ação. É nessa área, em especial, que os produtos naturais apresentam elevado potencial, já que constituem uma fonte promissora de compostos ativos a partir dos quais novos anti-infecciosos podem ser elaborados (SALAM; QUAVE, 2018).

Diante desse cenário, pesquisas estão sendo realizadas para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas frente a microrganismos patogênicos (NATARAJAN; SRINIVASAN; SHIVAKUMAR, 2014). Entre as famílias botânicas como fonte de substâncias microbicidas, destaca-se a Annonaceae. Estudos químicos de espécies desta família demonstram metabólitos secundários com importantes atividades farmacológicas (bactericida, antifúngica, citotóxicas, antitumoral...), como alcaloides, terpenos, acetogeninas, flavanonas, diterpenos e alcaloides (MARTINS, 1996; MOREIRA, 2003).

Os gêneros mais comuns de Annonaceae são *Annona*, *Guatteria*, *Xylopia* e *Rollini* (RINALDI, 2007). O gênero *Annona*, em especial, se evidencia pelas diferentes substâncias bioativas presentes em suas espécies, com ênfase nos alcaloides aporfínicos, flavonoides glicosilados e acetogeninas (LAGE, 2011), encontrados principalmente em raízes, folhas, cascas, sementes e frutos (CARBALLO et al., 2010).

Dentre os produtos naturais de *Annona*, muitos alcaloides são ressaltados por apresentarem potencial antimicrobiano. Simeon; Rios; Villar (1989) descreveram vários alcaloides aporfínicos do gênero com tal atividade, tais como: anolobina, anonaina, assimilobina, coridina, glaziovina, isocoridina, lanuginosina, etc.

Portanto, considerando a riqueza da família Annonaceae devido a presença dos metabólitos já mencionados, dos estudos que comprovam as propriedades farmacológicas dessas substâncias e que a espécie em questão é de fácil cultivo, o presente estudo realizou a caracterização química e investigação citotóxica do extrato, além de avaliar a atividade antimicrobiana do extrato e fração alcaloídica da entrecasca do caule de *Annona tomentosa*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Caracterizar os metabólitos secundários do extrato hidroetanólico, avaliar a citotoxicidade e o potencial antimicrobiano do extrato e fração alcaloídica da entrecasca do caule de *A. tomentosa*.

### 2.2 Específicos

- Caracterizar quimicamente o extrato hidroetanólico da entrecasca do caule de *A. tomentosa*;
- Investigar a composição química da fração alcaloídica de *A. tomentosa*;
- Verificar a citotoxicidade *in vitro* do extrato de *A. tomentosa*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroetanólico e fração alcaloídica de *A. tomentosa*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae compreende aproximadamente 130 gêneros e 2400 espécies agrupadas em quatro subfamílias (Anaxagoreoideae, Ambavioideae, Annonoideae e Malmeoideae) e 14 tribos. (CHATROU et al., 2012). No Brasil ocorrem 29 gêneros desta família, sendo 3 endêmicos, e 392 espécies, sendo 162 endêmicas (MAAS et al., 2016).

Espécies de Annonaceae encontram-se principalmente em regiões tropicais, em ambientes como matas primárias e secundárias de terra firme, matas alagadas, restingas, regiões montanhosas, caatinga, savana (OLIVEIRA et al., 2007). Além de serem encontradas também nas Américas, África e Sudeste Asiático, constituindo-se como fonte de frutos comestíveis, óleos perfumados e diversas drogas empregadas na medicina popular (JOSSANG et al., 1991). Na tabela 1, encontra-se descrita a taxonomia da planta.

**Tabela 1** – Taxonomia da planta

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>Divisão</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>Subdivisão</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Subclasse</b>	<i>Magnoliidae</i>
<b>Ordem</b>	<i>Magnoliales</i>
<b>Família</b>	<i>Annonaceae</i>
<b>Gênero</b>	<i>Annona</i>
<b>Espécie</b>	<i>Annona tomentosa</i>

Fonte: APG, 2003; Barroso, 1991.

#### 3.2 Gênero *Annona*

O gênero *Annona* compreende cerca de 140 espécies tropicais com várias dessas nativas. As espécies mais comuns no Brasil são *A. muricata*, *A. cherimola*, *A. coriacea*, *A. reticulata*, *A. tenuiflora* e *A. squamosa* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2003), que são de grande importância econômica como fonte de frutos comestíveis e nutritivos, sendo amplamente cultivadas e comercializadas. Seus frutos são usados *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (LORENZI; MATOS, 2002).

Espécies do gênero são muito reconhecidas por suas propriedades medicinais, como é o caso dos frutos de *A. spinescens*, popularmente conhecida como araticum-do-rio ou araticum-do-alagadiço, que é usado no tratamento de úlceras (MAAS; WESTRA, 1984), ou de *A. muricata* (“graviola”), cujo decocto das folhas é utilizado no tratamento de diarreia e espasmos, e seu chá é empregado como agente emagrecedor (BARATA et al., 2009).

Investigações sobre a ação biológica de algumas espécies indicam ainda atividades como citotoxicidade contra várias linhagens de células tumorais, potencial

antimicrobiano, antioxidante e antiplaquetário, além de propriedades antiparasitárias, em particular contra a *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi* (COSTA et al., 2011). Dentre essas espécies, com potencial químico e biológico, destaca-se *Annona tomentosa*.

### 3.3 *Annona tomentosa*

*Annona tomentosa* (Figura 1), popularmente conhecida como “araticum rasteiro” ou “araticum da moita”, é uma espécie nativa e não endêmica no Brasil, aparecendo nos campos abertos, no cerrado e no cerradão, onde a vegetação é mais densa, e com ocorrência desde Goiás, Tocantins e Maranhão até o estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul (RIOS; RECIO; VILAR, 1988).

**Figura 1** - Espécie *Annona tomentosa*



Fonte: Camara (2013)

O Araticum destaca-se pelas suas propriedades farmacológicas que incluem a utilização por populações regionais no tratamento de picadas de cobras, e em afecções parasitárias no couro cabeludo (ALMEIDA et al., 1998), sendo empregada ainda no tratamento de diarreias, estomatites, cefaleias, furúnculos e úlceras.

Estudos realizados por MOTA (2016) relatou a presença de vários metabólitos secundários, como taninos, flavonoides, saponinas e alcaloides, além de demonstrar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroetanólico da entrecasca do caule de *Annona tomentosa*. A figura 2 apresenta o desenvolvimento da espécie.

**Figura 2** – Início da floração (A), Pétalas externas (B), Pétalas internas (C), após a queda das pétalas (D) e pequenos frutos (E) de *Annona tomentosa*



(A)



(B)



(C)



(D)

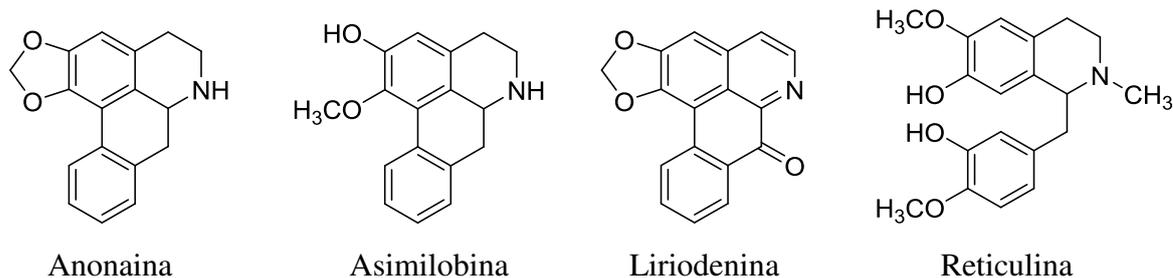


(E)

Fonte: Camara (2013)

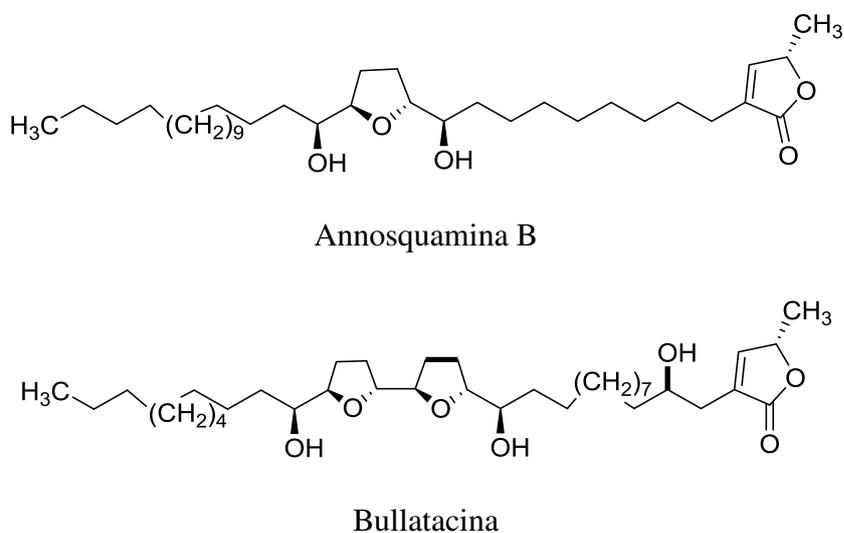
### 3.4 Metabólitos secundários frequentes em *Annona*

Dados químicos e biológicos de Annonaceae reportam a presença de flavonoides, terpenos, acetogeninas e mais de 130 alcaloides (COSTA et al., 2009; MOREIRA et al., 2013; SILVA et al., 2015), sobretudo no gênero *Annona*. Anonaina, asimilobina, liriodenina e reticulina (Figura 3) são alguns exemplos de alcaloides descritos em muitas espécies desse gênero, podendo ser considerados como marcadores quimiotaxonômicos (CRUZ et al., 2011).

**Figura 3** – Alcaloides isolados de espécies de *Annona*

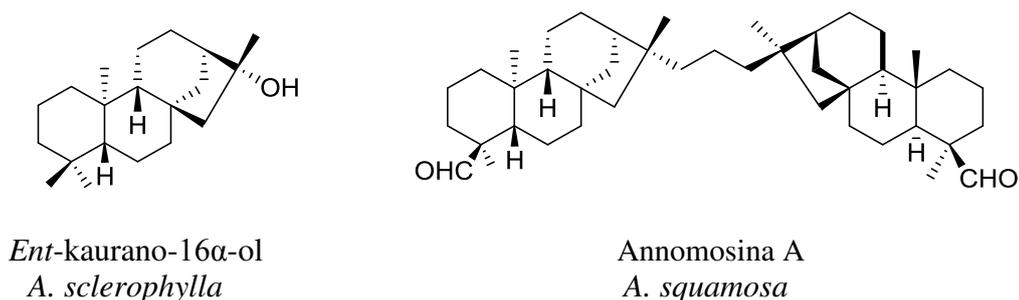
Fonte: Cruz et al (2011)

As acetogeninas (ACG) são substâncias naturais encontradas exclusivamente na família Annonaceae, sendo que o gênero *Annona* constitui-se como a principal fonte desta classe de compostos, uma vez que, das 417 acetogeninas conhecidas até 2004, 289 foram isoladas a partir de 20 espécies deste gênero (BERMEJO et al., 2005). Alguns exemplos de acetogeninas de anonáceas são annosquamina B e bullatacina (Figura 4), isoladas de *Annona squamosa* (CHEN et al., 2013).

**Figura 4** – Acetogeninas isoladas de *Annona squamosa*

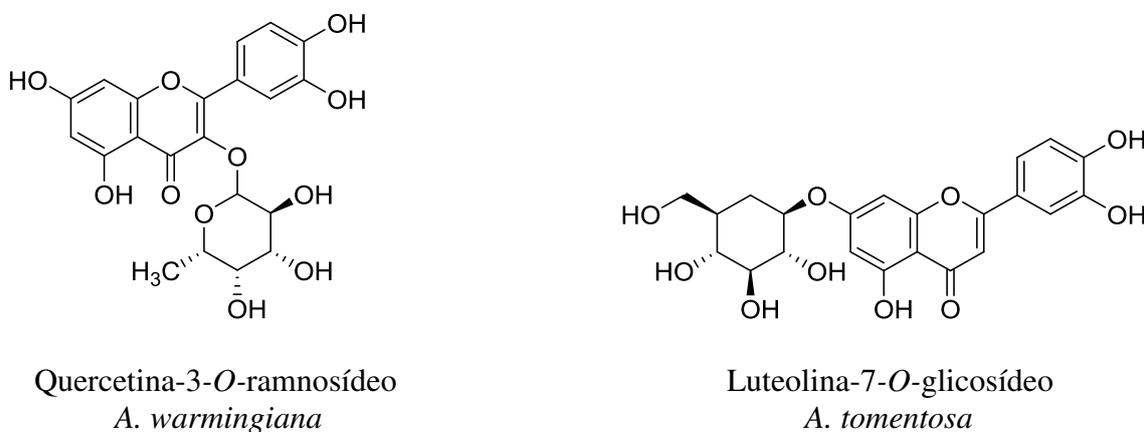
Fonte: Chen et al (2013)

Os diterpenos frequentemente encontrados em espécies do gênero *Annona* são do tipo *ent*-kaurano (Figura 5) e também podem ser considerados seus marcadores quimiotaxonômicos (CRUZ, 2011).

**Figura 5** – Diterpenos *ent*-kauranos isolados de espécies de *Annona*

Fonte: Cruz (2011)

As classes de flavonoides predominantes no gênero são os flavonóis e seus derivados glicosilados (*O*-glicosídeos e *C*-glicosídeos) (SANTOS; SALATINO, 2000). Estudos comprovam a presença de flavonas (luteonina) e flavonóis (canferol, quercetina, ramnetina, rutina e isoramnetina) em diversas espécies de *Annona*, inclusive em *A. tomentosa*, (SANTOS; SALATINO, 2000; RINALDI, 2007; VEGA et al., 2007). Exemplos destes flavonoides isolados são mostrados na Figura 6.

**Figura 6** – Flavonoides isolados de espécies de *Annona*

Fonte: Santos; Salatino, 2000; Rinaldi, 2007; Vega et al 2007.

Essas substâncias são as principais responsáveis pelo crescimento do interesse no potencial farmacológico de espécies de anonáceas. Até o momento, já foram isolados cerca de 400 compostos relacionados a essa família (JOHNSON et al., 2000), entre os quais, destacam-se os alcaloides, compostos secundários mais abundantes em espécies de *Annona*, com ações antimicrobiana e anticâncer promissoras.

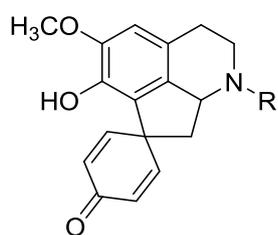
### 3.5 Potencial antimicrobiano de alcaloides

Ao longo dos anos, vários estudos têm descrito alcaloides com atividade antimicrobiana. Seu modo de ação pode ser atribuído à capacidade que possuem de interagir com o DNA (PHILLIPSON, 2001). Alcaloides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos (LEBOEUF et al., 1982), e uma classe de compostos predominante na família Annonaceae.

Entre os alcaloides já isolados no gênero *Annona*, a anonaina (Fig. 3, pág. 21) e a estefarina (Figura 7) apresentaram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e a glaziovina (Figura 7), sobre *Escherichia coli*. A anolobina, nornantenina e a lanuginosina (Figuras 7), também do mesmo gênero, apresentaram atividade sobre a bactéria *Salmonella typhimurium* (RIOS; RECIO; VILAR, 1988).

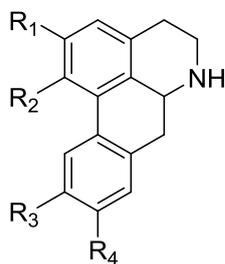
**Figura 7** – Estruturas químicas de alcaloides isolados de *Annona*

#### a) estefarina e glaziovina



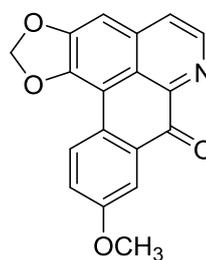
R	Alcaloide
H	estefarina
CH <sub>3</sub>	glaziovina

#### b) anolobina e nornantenina



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Alcaloide
OCH <sub>2</sub> O		H	OH	anolobina
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> O		nornantenina

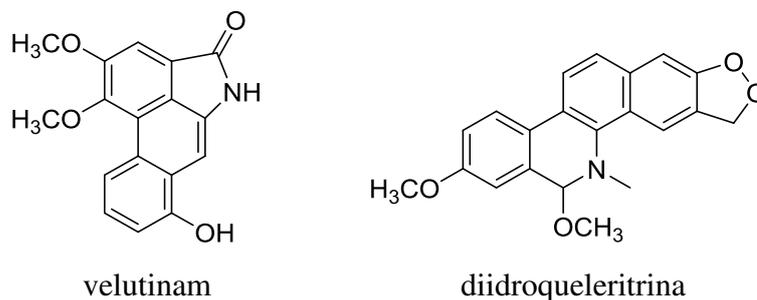
#### c) lanuginosina



Fonte: Rios; Recio; Vilar (1988).

Iqbal et al (2018), em experimentos com a espécie *Goniothalamus velutinus* (família Annonaceae), isolaram o alcaloide velutinam (Figura 8), que inibiu a formação de biofilme de *Streptococcus mutans* e *Proteus mirabilis* até 41,3 e 78,9%, respectivamente. Já o alcaloide diidroqueleritrina (Figura 8), de *Zanthoxylum stelligerum* (família Rutaceae), exibiu um espectro de ação antimicrobiana mais amplo que o perfil do extrato metanólico da raiz que o originou contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e isolados clínicos *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus Grupo C* e *Rhodococcus equi* (SILVA et al., 2010).

**Figura 8** – Alcaloides das espécies *G. velutinus* e *Z. stelligerum*



Fonte: Iqbal et al (2018); Silva et al (2010).

Em virtude desses relatos, faz-se necessário a intensificação de estudos relacionados aos alcaloides, possibilitando, dessa forma, a descoberta de novas moléculas que possam ser utilizadas na elaboração de fármacos antimicrobianos potenciais.

## **4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1 Coleta e Preparo do Extrato**

A entrecasca do caule de *Annona tomentosa* foi coletada em dezembro de 2017 no povoado Morro Grande, município de Vargem Grande, Maranhão, Brasil. A localização foi registrada através de GPS e encontra-se sob às coordenadas 3°32'06.6"S 43°56'51.5"W. A planta foi identificada no Herbário Rosa Mochel da Universidade Estadual do Maranhão, pela professora Ana Maria Maciel Leite, e está catalogada com o número 3773. O cadastro de acesso ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) foi registrado sob o código A039D1F.

A amostra foi seca a 50 °C em estufa por 72 h e triturada em moinho de facas, em malha de 1 mm. O pó obtido foi extraído com etanol/água (7:3) pelo método de maceração exaustiva. Posteriormente, o líquido extrator foi evaporado sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 40 °C. O extrato foi, então, transferido para frascos de vidros e liofilizado para completa remoção do solvente.

### **4.2 Extração Ácido-Base**

O extrato hidroetanólico 70% foi dissolvido em água/metanol (8:2) e acidificado com solução de HCl 37 % até pH 2. Logo após, a solução foi particionada 5 vezes com éter; em seguida, concentrou-se a fase etérea em evaporador rotativo para recuperação do solvente. A fase aquosa remanescente contendo a massa do extrato foi basificada até pH 11 com solução de NH<sub>4</sub>OH e particionada 5 vezes com clorofórmio. Ao final, a fase clorofórmica (alcaloídica) foi concentrada em evaporador rotativo e liofilizada para remoção de solventes. Para verificação de alcaloides, realizou-se a cromatografia em camada delgada com o pó obtido da fase clorofórmica.

### **4.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Para realização deste método foram utilizadas placas de vidro recobertas com uma suspensão de sílica gel 60 G em água destilada (1:2): 0,25 mm de espessura, ativadas a 100 °C em estufa. A eluição foi feita em diclorometano/metanol (9:1) e as placas foram reveladas com o reagente de Dragendorff (solução de iodeto de bismuto e potássio).

#### 4.4 Identificação dos constituintes químicos de *Annona tomentosa*

##### 4.4.1 HPLC-PDA

A fração alcaloídica de *Annona tomentosa* foi analisada por HPLC-PDA. Para isso, realizou-se uma etapa de limpeza para remover quaisquer contaminantes. A solução passou por uma extração em fase sólida (SPE) utilizando cartucho Phenomenex Strata C18 (500 mg de fase estacionária) que foi previamente ativado com 5 mL de MeOH e equilibrado com 5 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). Os compostos foram eluídos do cartucho utilizando 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) com um volume final de 5 mL. A amostra foi então filtrada através de um filtro PTFE de 0,22 µm e seca posteriormente. A fração seca foi dissolvida para 5 mg/mL em MeOH grau HPLC. Alíquota de 10 µL foi injetada diretamente no HPLC-PDA com varredura de 190 a 800 nm.

Foi utilizado um sistema HPLC modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Quioto, Japão), constituído por um módulo de injeção de solvente com uma bomba binária, e detector PDA (SPA-20A). A coluna utilizada foi uma Luna 5 µm C18 100 A (150 µm x 4,6 µm). Os solventes de eluição utilizados foram A (ácido fórmico a 0,01% em água) e B (ácido fórmico a 0,01% em metanol). A fração foi eluída de acordo com o seguinte gradiente: 5% a 100% de B em 50 minutos. O fluxo foi de 1 mL/min. Os dados foram recolhidos e processados utilizando o software LC Solution (Shimadzu).

##### 4.4.2 HPLC-UV-MS

O extrato bruto foi analisado por LC-MS em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific<sup>®</sup>. A separação por HPLC foi realizada utilizando coluna cromatográfica Kinetex<sup>®</sup> C18 100 Å com poros de 5µm, e dimensões de 4,6 x 100 mm. A fase móvel utilizada consistiu em água, ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila mais ácido fórmico 0,1% (B), em gradiente exploratório, iniciando com 10% a 100% de B em 10 minutos, com um fluxo de 1,0 mL/min.

O espectro de massa foi obtido no espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific<sup>®</sup>, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi ionizada por electrospray (ESI) e as fragmentações foram obtidas em dois estágios (MS/MS), em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para o extrato bruto para a geração e análise dos espectros. As condições experimentais foram: voltagem do capilar -35 V, voltagem do spray -5000 V, temperatura do capilar a 350°C, gás de arraste (N<sub>2</sub>) e fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa

de aquisição foi de  $m/z$  100-2000, com dois ou mais eventos de varredura que foram realizados simultaneamente no espectro.

A identificação dos diferentes compostos do extrato hidroetanólico foi feita comparando com a literatura seus tempos de retenção, espectros no UV e fragmentos obtidos na Espectrometria de Massas.

## **4.5 Ensaios *in vitro***

### **4.5.1 Citotoxicidade pelo método de redução do MTT**

Para o ensaio de MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio) foram utilizadas as células de MRC-5 (fibroblastos derivados de tecido pulmonar), HeLa (célula humana tumoral epitelial de cólon do útero), DU145 (célula humana tumoral epitelial de tumor metastático na próstata) e MCF-7 (célula humana tumoral epitelial de tumor metastático na glândula mamária) e plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^5$  por poço no volume de 100  $\mu$ L de DMEM completo (10% de Soro Fetal Bovino (SFB)). Em seguida, as células foram incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%.

O tratamento de interesse foi realizado: Preparou-se uma solução mãe do extrato (10 mg/mL) em DMSO 0,5 %. A solução foi diluída para 2 mg/mL e com um filtro de 20  $\mu$ m, filtrou-se a solução. Retirou-se os 100  $\mu$ L de meio da placa de 96 poços já com as células aderidas e adicionou-se 100  $\mu$ L da diluição realizada e dos controles positivo (DMSO 20% e meio DMEM) e negativo (meio DMEM e SFB 1%). A placa foi levada a estufa de CO<sub>2</sub> a 5% à 37°C por 24 horas.

Logo após o tempo de incubação, uma solução de 0,5 mg/mL de MTT foi adicionada. Retirou-se os 100  $\mu$ L de todos os poços adicionados e pipetou-se, primeiramente, 100  $\mu$ L do meio incompleto, e depois, 10  $\mu$ L da solução de MTT para cada 100  $\mu$ L de meio presente nos poços. Posteriormente, a placa foi incubada na estufa de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Foi acrescentado 100  $\mu$ L de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% contendo HCl, para solubilização dos cristais de formazan. A placa foi agitada cuidadosamente e em seguida a leitura da absorbância foi medida em um aparelho ELISA com detecção a 540 nm.

Os tratamentos foram realizados em triplicata. As análises do ensaio foram realizadas no Excel® a partir dos dados obtidos, subtraindo a absorbância do meio (branco) de todos os dados e fazendo a média aritmética dos poços contendo apenas as células (controle negativo, viabilidade de 100%).

## **4.5.2 Atividade Antimicrobiana**

### **4.5.2.1 Microrganismos utilizados**

Para a realização dos testes foram utilizadas cepas padrão (ATCC) de bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* 6538 e *Enterococcus faecalis* 03, de bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* 042, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 e *Salmonella typhimurium* 14028 e fungo *Candida albicans* 18809.

### **4.5.2.2 Padronização das suspensões bacterianas e fúngicas**

Os microrganismos foram inicialmente reativados a partir das suas culturas originais e mantidos em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) em estufa à 37°C por 24 horas para bactérias e até 48 horas para fungo. Posteriormente, as bactérias foram cultivadas em placas de Ágar Mueller-Hinton, e o fungo, em Ágar Sabouraud a 37°C sob o tempo de incubação relatado anteriormente. Colônias isoladas foram, então, ressuspensas em 3 mL de PBS estéril até atingir uma turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

### **4.5.2.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto e fração alcaloídica**

A CIM foi obtida através da técnica de microdiluição (CLSI, 2011). Diluições seriadas de cada amostra (concentração inicial: 50 mg/mL) foram realizadas em caldo Mueller Hinton para bactérias e caldo RPMI para fungo, em microplacas de 96 poços. Em seguida, 10 µL de suspensões bacterianas e fúngica (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foram adicionadas a microplacas, que foram incubadas a 37 ° C para bactérias por 24 h e a 35° para fungo, por 48 h. Para identificar a presença de crescimento microbiano, adicionou-se 15 µL de solução de resazurina 0,01% e verificou-se então qualquer mudança de coloração de roxo para rosa. Para bactérias, a alteração de cor foi visualizada com 40 min de incubação; para o fungo, 24 h depois. A concentração mais baixa, em que nenhuma mudança de cor ocorreu, foi considerada como a CIM.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rendimento do Extrato Bruto e Fração Alcaloídica de *Annona tomentosa*

A tabela a seguir apresenta os dados de massas e os rendimentos do extrato bruto e fração alcaloídica da espécie em questão.

**Tabela 2** – Resultados das extrações do extrato bruto e fração alcaloídica

Amostra	Massa inicial (g)	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	200	37,3	18,65
Fração Alcaloídica	30	1,3	4,33

Fonte: Autora (2019)

Os rendimentos foram considerados bons em comparação a outros estudos do gênero. Estudo anterior realizado por Mota (2016) apresentou rendimento de 17% para o extrato hidroetanólico da casca do caule de *A. tomentosa*. Lima (2017), utilizando também a técnica de maceração, obteve um rendimento do extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* de 14%, partindo de 668 g do material vegetal. Em relação ao rendimento da fração, a partir de pesquisa realizada com o extrato metanólico das folhas de atemoia (*A. cherimola* x *A. squamosa*), Rabêlo (2014) obteve um rendimento de 0,60% através da partição de 108 g do extrato.

### 5.2 Detecção de alcaloides por Cromatografia em Camada Delgada

A partir do plaqueamento da fração alcaloídica (Figura 9) foi possível verificar a presença de pelo menos 6 alcaloides por meio do aparecimento de manchas vermelho alaranjadas características dessas substâncias após revelação com reagente de Dragendorff.

**Figura 9** – CCD da fração clorofórmica utilizando sistema de eluição DCM/MeOH (9:1)

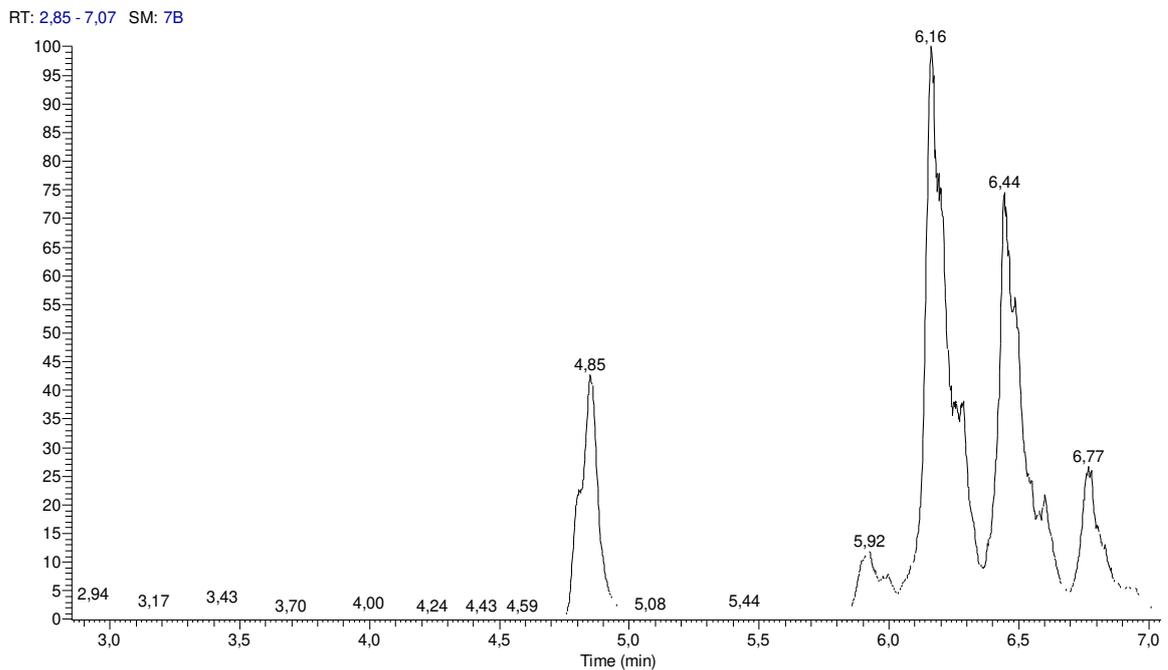


Fonte: Autora (2019)

### 5.3 Identificação das substâncias do extrato e fração alcaloídica da entrecasca do caule de *Annona tomentosa*

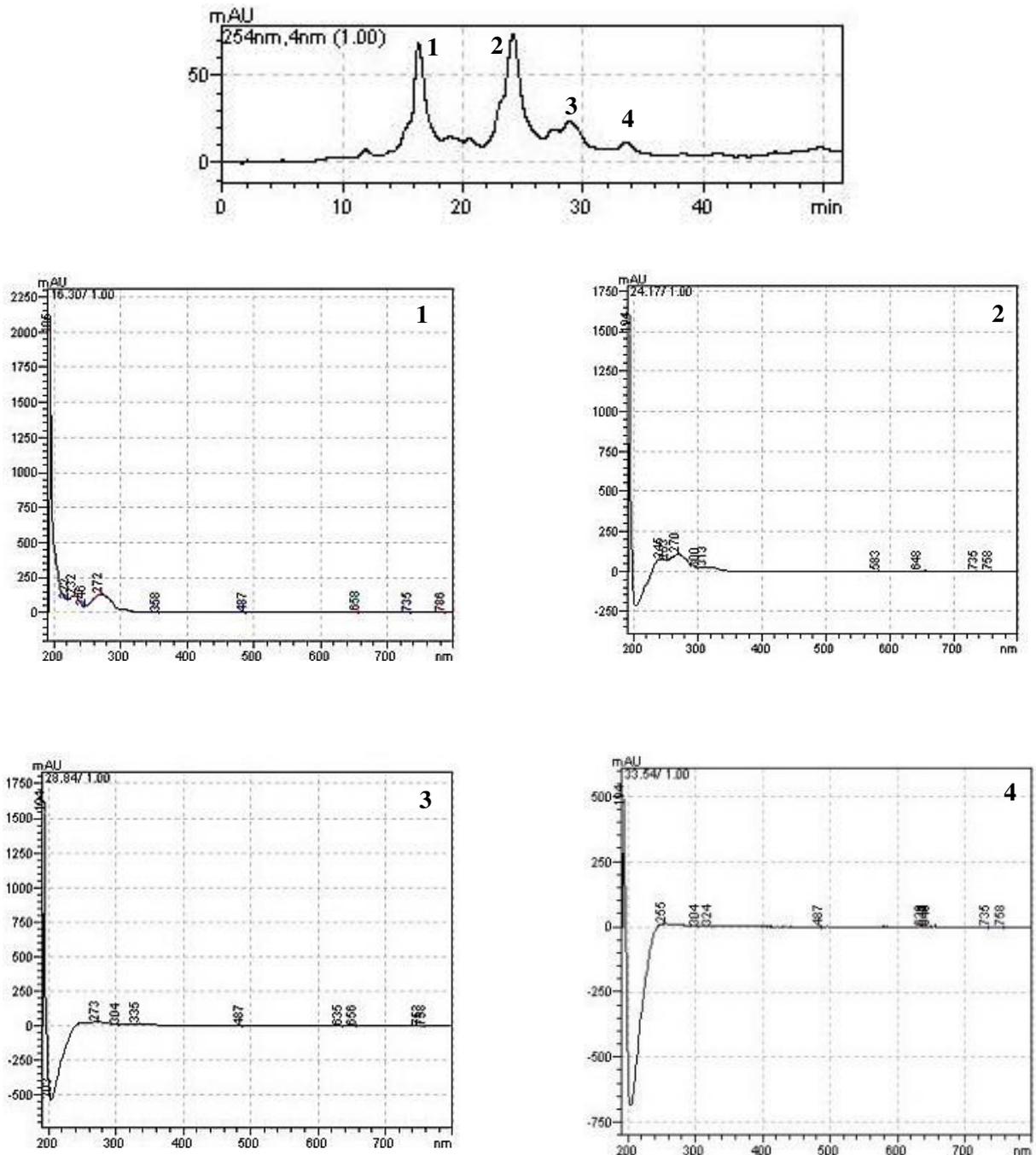
Para avaliar a composição química e identificar as substâncias de *A. tomentosa* foi realizada uma análise por HPLC-UV-MS para o extrato hidroetanólico e HPLC-PDA para a fração alcaloídica. As figuras 10 e 11 apresentam os perfis cromatográficos para o extrato e fração alcaloídica, respectivamente.

**Figura 10** – Cromatograma de íons totais do extrato hidroetanólico de *A. tomentosa*



Fonte: Autora (2019)

**Figura 11** – Perfil cromatográfico e espectros no UV para os picos representativos da fração alcaloídica de *A. tomentosa*



Fonte: Autora (2019)

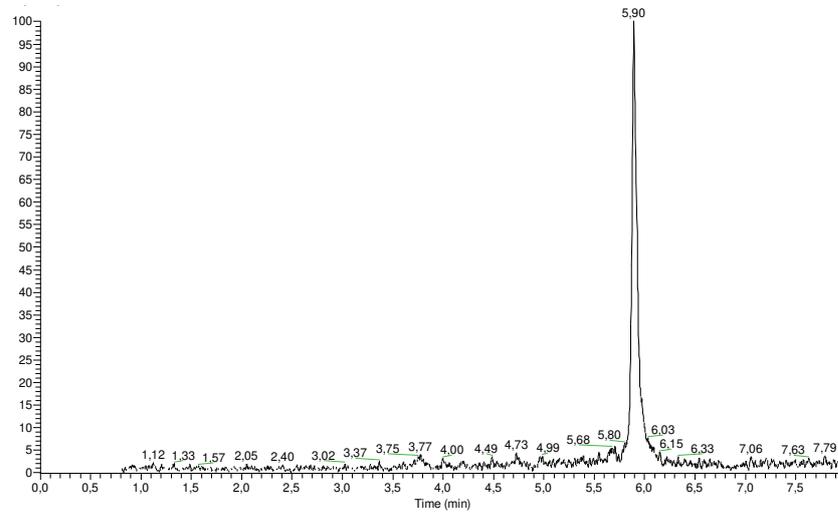
A partir da extração de íons e dos espectros de segunda ordem obtidos por HPLC-ESI-IT-MS foi possível identificar alguns compostos (alcaloides e flavonoide) do extrato hidroetanólico de *A. tomentosa* e comparar as fragmentações com a literatura.

Dessa maneira, tendo por base estudos realizados por Silva et al (2012), filtrou-se as massas dos alcaloides anonaina (Figura 12), assimilobina (Figura 13) e norushinsunina

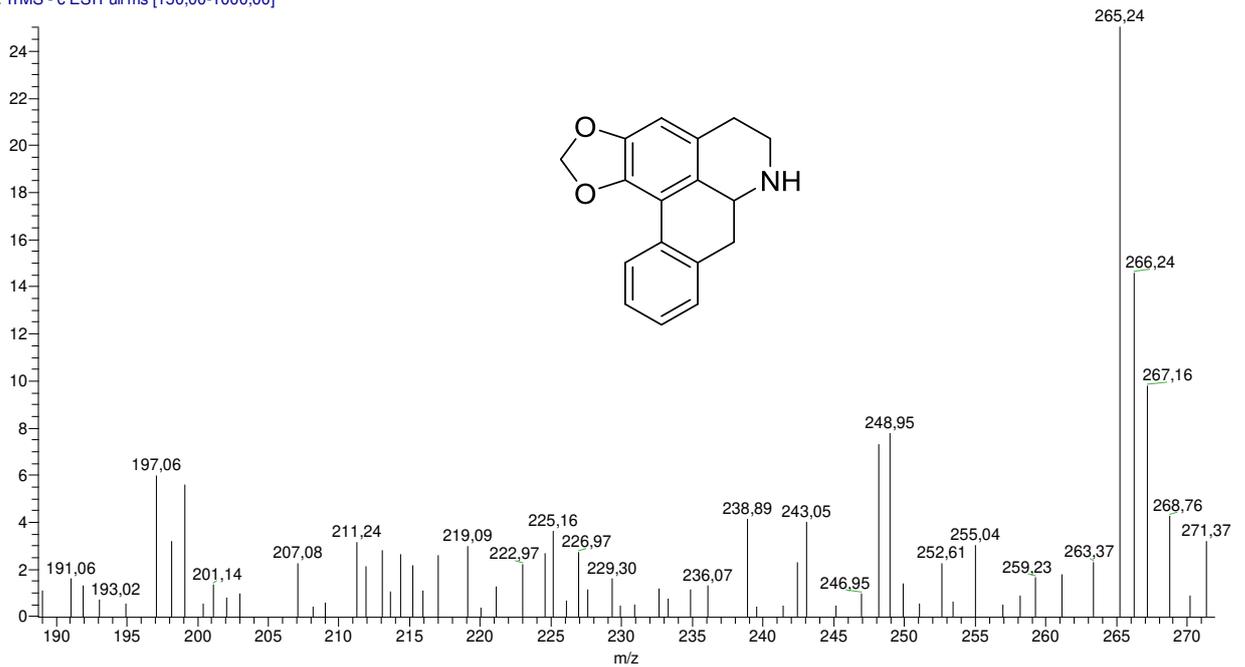
(Figura 14) do cromatograma do extrato da espécie em questão e, a partir dos espectros de massas, foi verificado que todos os alcaloides apresentaram perda neutra, o que pode estar associado ao modo utilizado para geração de espectros, já que o modo negativo desestabiliza moléculas de alcaloides. Devido a inconvenientes instrumentais, não foi possível o experimento no modo positivo.

Os espectros de massas HPLC-ESI-MS mostraram os íons  $[M-H]^-$   $m/z$  265,24, que está em conformidade com a fórmula molecular  $C_{17}H_{15}NO_2$  da anonaina (Figura 12); para assimilobina (Figura 13),  $[M-H]^-$   $m/z$  267,20, que está de acordo com a fórmula molecular  $C_{17}H_{17}NO_2$ , e para norushinsunina (Figura 14),  $[M-H]^-$   $m/z$  281,37, que está de acordo com a fórmula molecular  $C_{17}H_{15}NO_3$ .

A análise de fragmentação foi feita então a partir do íon molecular. Observou-se para anonaina,  $m/z$  265,24 ( $[M-H]^-$ ), os fragmentos  $m/z$  248,95,  $m/z$  219,09 e  $m/z$  191,06, representando a perda inicial do grupo amina e sucessivas perdas dos grupos substituintes,  $CH_2O$  e  $CO$ . Para assimilobina,  $m/z$  267,20 ( $[M-H]^-$ ), verificou-se as fragmentações  $m/z$  249,97,  $m/z$  217,12,  $m/z$  219,29 e  $m/z$  191,07 indicando provável perda de  $NH_3$ ,  $CH_3OH$  e  $CO$ . A norushinsunina,  $m/z$  281,37 ( $[M-H]^-$ ), apresentou os fragmentos  $m/z$  264,02,  $m/z$  265,75,  $m/z$  237,24 e  $m/z$  207,44, demonstrando possíveis perdas de  $NH_3$ ,  $CO$  e  $CH_2O$ . Essas fragmentações mostraram-se semelhantes às dos alcaloides aporfínicos anonaina, assimilobina e norushinsunina encontrados no extrato hidroetanólico das folhas de *A. exsucca* por GOMES (2017). Um padrão de fragmentação seria melhor observado realizando uma análise de injeção de fluxo direto com fragmentações em múltiplos estágios, no modo positivo.

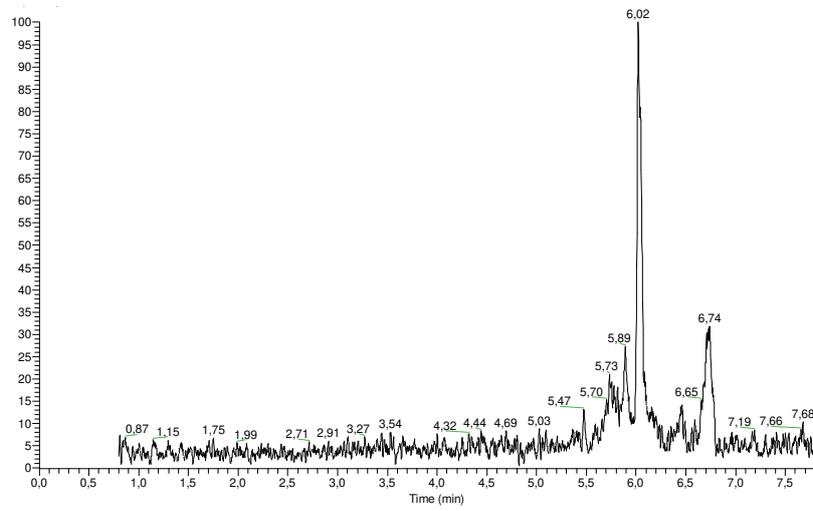
**Figura 12** – Íon extraído e espectro de fragmentação para anonaina

EBMA\_10ppm\_contam\_20uL\_#2292 RT: 5,90 AV: 1 NL: 2,15E4  
T: ITMS - c ESIFull.ms [150,00-1000,00]

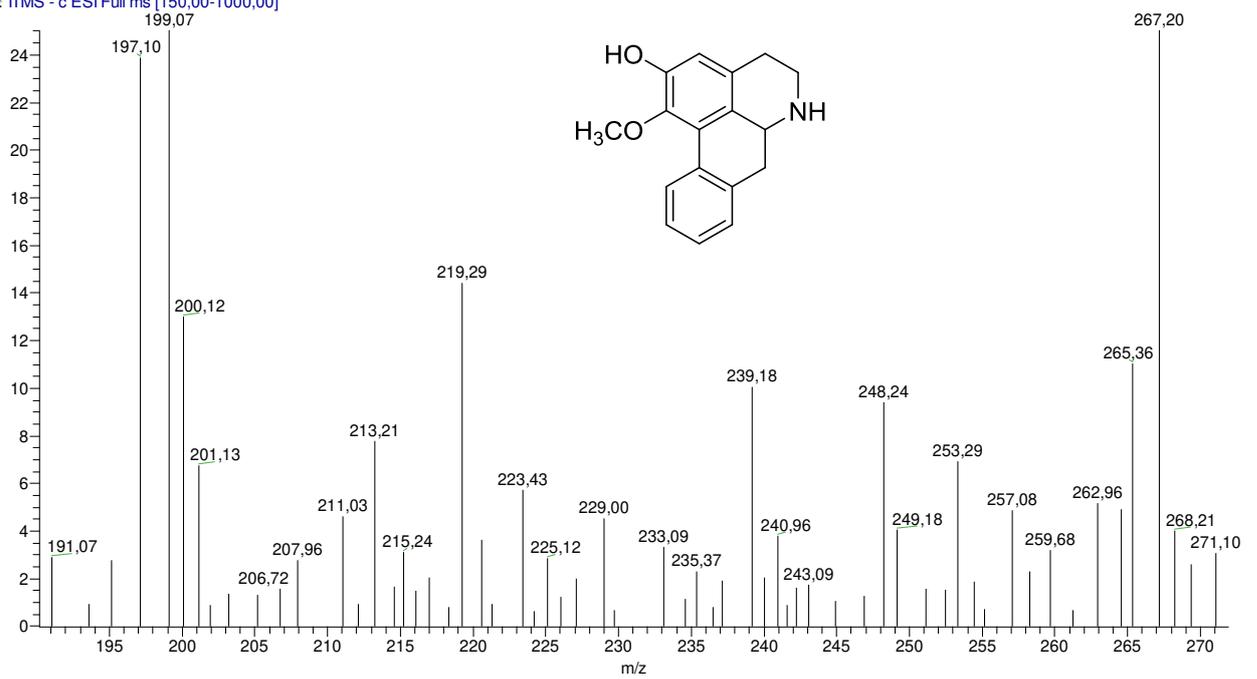


Fonte: Autora (2019)

**Figura 13** – Íon extraído e espectro de fragmentação para assimilobina

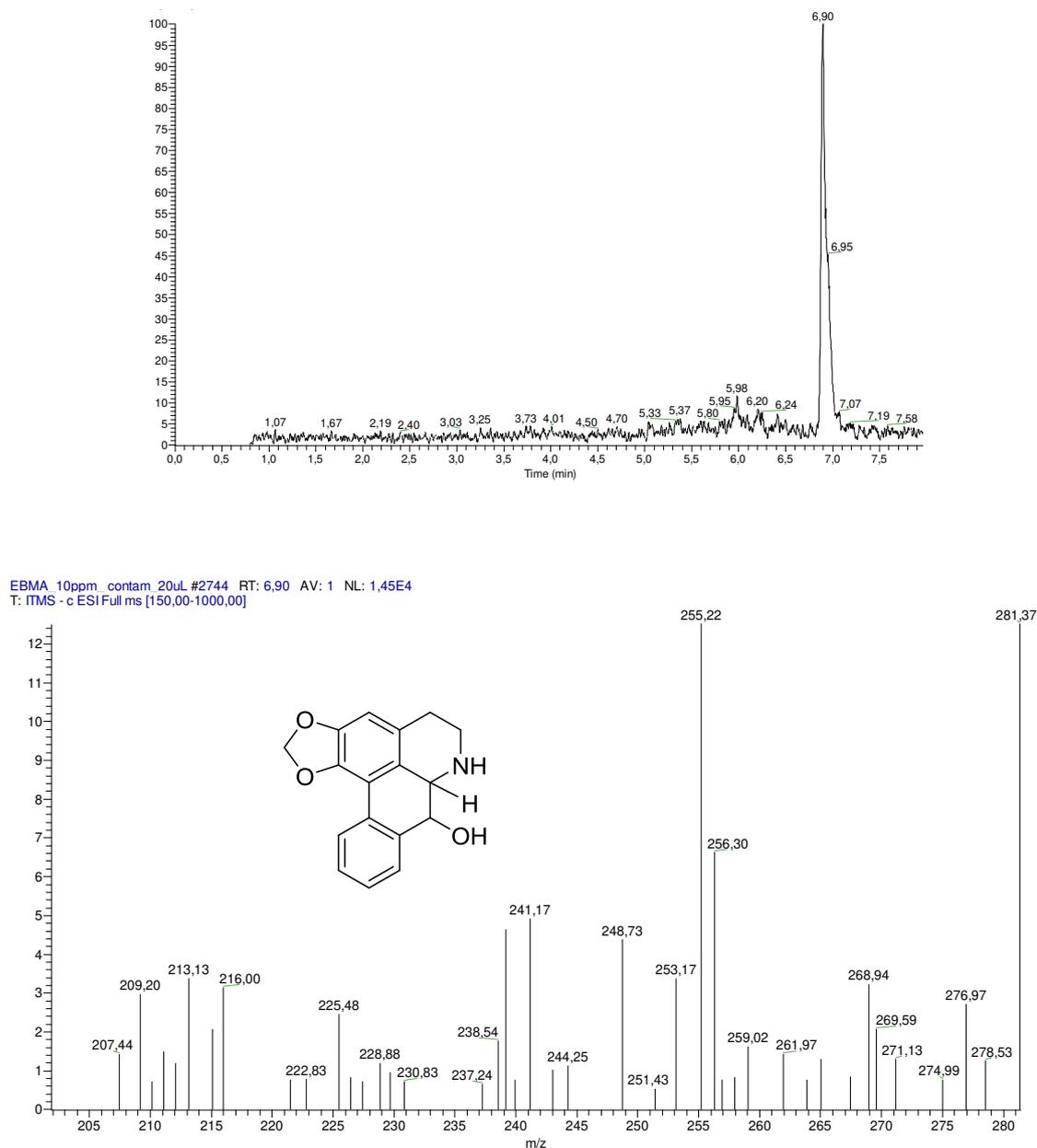


EBMA\_10ppm\_contam\_20uL #2347 RT: 6.02 AV: 1 NL: 1,26E4  
T: ITMS - c ESI Full ms [150,00-1000,00]



Fonte: Autora (2019)

**Figura 14** – Íon extraído e espectro de fragmentação para norushinsunina

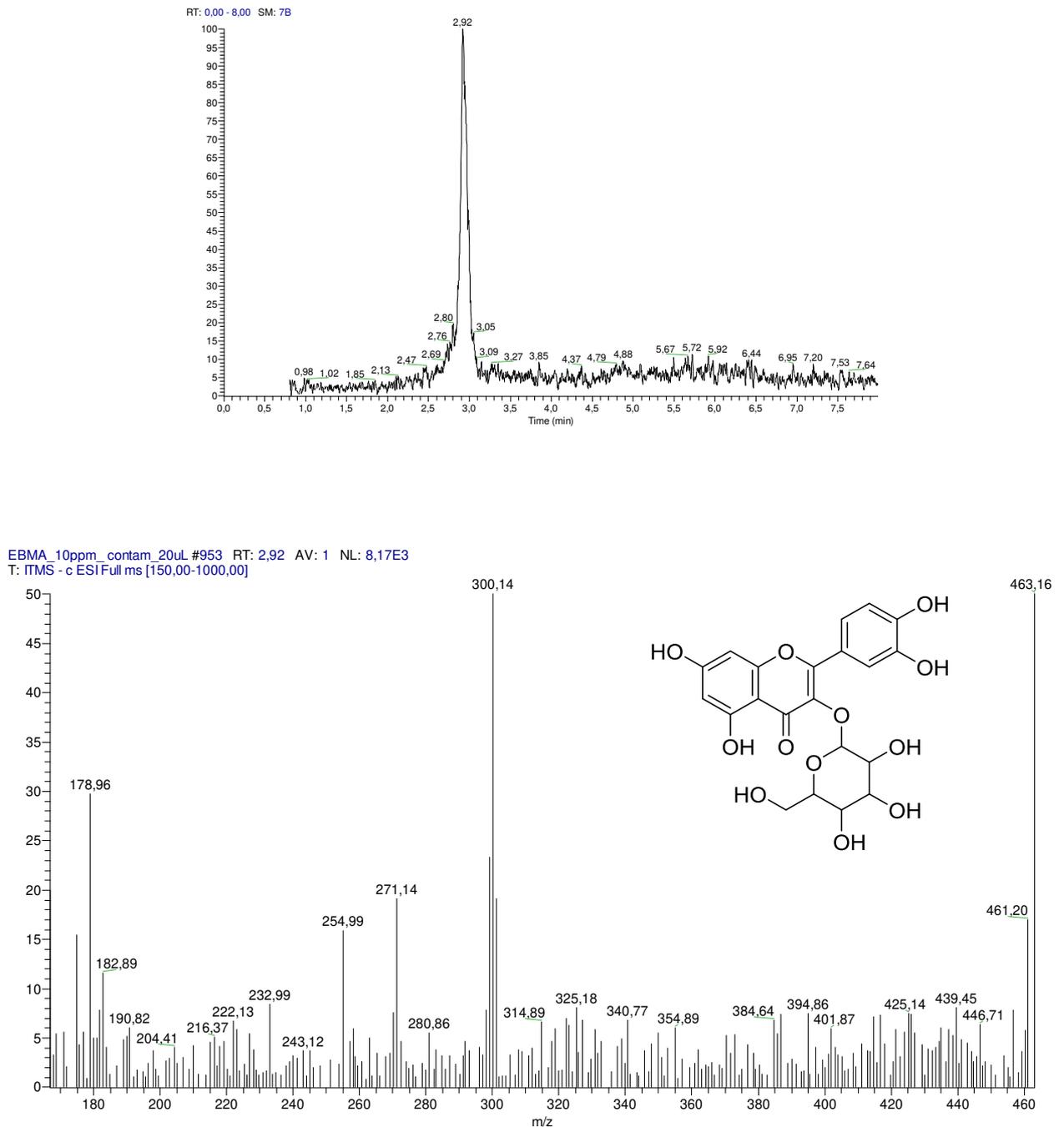


Fonte: Autora (2019)

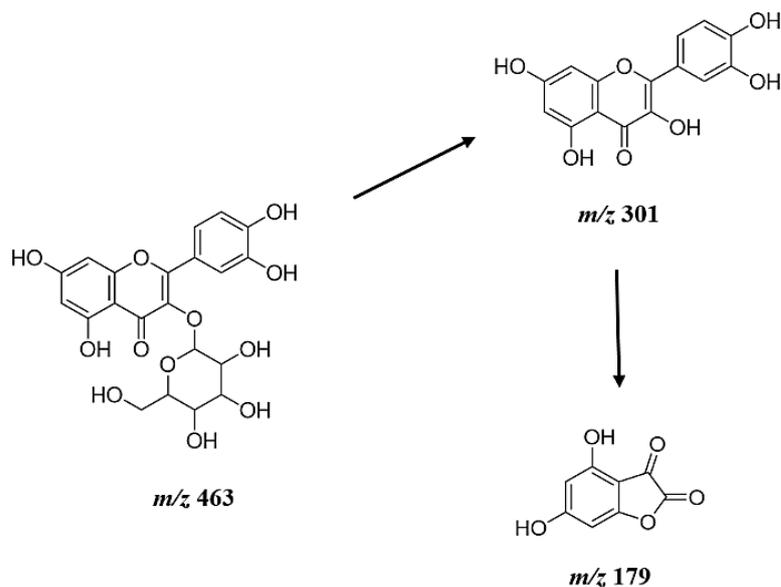
Além de alcaloides aporfínicos, foi possível também identificar a presença de flavonoide no extrato de *A. tomentosa*. A fragmentação do íon molecular  $m/z$  463,16  $[M-H]^-$  e seu espectro de massas HPLC-ESI-MS mostrou os íons produto  $m/z$  301,12 e  $m/z$  178,96, que são provenientes de um resíduo de perda de hexose, confirmando assim a estrutura da quercetina-*O*-glucosídeo ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ) (Figura 15). A proposta de fragmentação é apresentada na figura 16. Esse composto havia sido isolado e identificado anteriormente nas folhas de *A.*

*tomentosa* por Santos; Salatino (2000), mas é relatado pela primeira vez na entrecasca do caule da espécie.

**Figura 15** – Íon extraído e espectro de fragmentação da quercetina-*O*-glucosídeo



Fonte: Autora (2019)

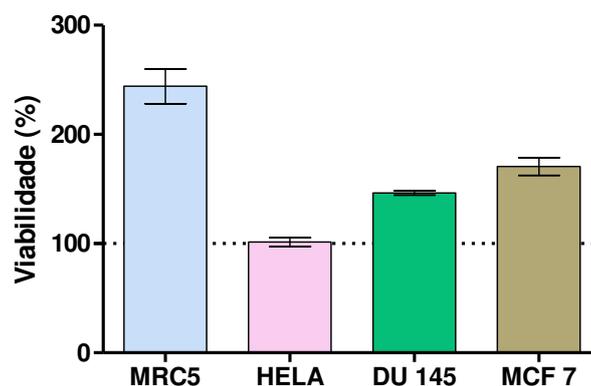
**Figura 16** – Proposta de fragmentação para quercetina-*O*-glucosídeo

Fonte: Bastos et al (2019)

#### 5.4 Avaliação da citotoxicidade pelo método de redução do MTT para o extrato hidroetanólico da entrecasca do caule de *Annona tomentosa*

A investigação dos efeitos citotóxicos de extratos e compostos de origem vegetal são essenciais para reduzir os possíveis riscos desses agentes à saúde. Tendo em vista os diversos relatos sobre a elevada toxicidade de alcaloides, fez-se necessário a realização de ensaios para avaliar os potenciais efeitos tóxicos dessas substâncias a nível celular.

Desse modo, após tratamento com duração de 24 horas, em única concentração (1mg/mL), verificou-se que o extrato de *A.tomentosa* não foi citotóxico, comparando-se com a célula não neoplásica (MRC 5), considerada como 100% de viabilidade. O extrato, além de aumentar a viabilidade de MRC 5 em até 244%, demonstrou ainda importante potencial anticâncer, visto que reduziu a viabilidade da célula tumoral de cólon do útero (HeLA) em 101%, de tumor metastático de próstata (DU 145) em 146% e de tumor metastático na mama (MCF 7), em 171% (Figura 17).

**Figura 17** - Viabilidade celular do extrato de *A. tomentosa* frente às células MRC 5, HeLA, DU 145 e MCF 7

Fonte: Autora (2019)

Este é o segundo relato de avaliação da citotoxicidade na espécie, mas o primeiro na entrecasca do caule. CAMARA (2013) investigou a citotoxicidade do extrato hidroetanólico das folhas de *A. tomentosa* por meio da atividade hemolítica em eritrócitos isolados de rato. Na concentração de 100 µg/mL, o extrato apresentou baixa atividade hemolítica ( $P < 20\%$ ), correspondendo então a baixo efeito citotóxico.

### 5.5 Atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico e fração alcaloídica de *Annona tomentosa* por microdiluição

A atividade antimicrobiana de *A. tomentosa* apresentou diferenças significativas em relação ao extrato e fração alcaloídica. A fração mostrou-se mais eficaz que o extrato, exibindo maior espectro de inibição para bactérias gram-positivas e gram-negativas. Os valores da CIM são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3** – Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e fração de *A. tomentosa*

Microrganismos	Extrato	Fração	CN
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,78	0,19	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 03	1,56	0,19	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 042	12,5	12,5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12,5	6,25	0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	25	0,39	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 18809	6,25	3,12	0

Valores em mg/mL; CN: Controle Negativo (caldos Mueller-Hinton e RPMI)

Fonte: Autora (2019)

De acordo com Holetz et al (2002), amostras com alta atividade antimicrobiana apresentam CIM < 100 µg/mL; com atividade moderada, entre 100 a 500 µg/mL.; com baixa atividade, entre 500 a 1000 µg/mL e são consideradas inativas quando a CIM é > 1000

µg/mL. Com base nessa classificação, o extrato hidroetanólico de *A. tomentosa* apresentou baixa atividade para *S. aureus* e foi inativo para as outras cepas. Enquanto a fração expressou atividade moderada para *S. aureus*, *E. faecalis* e *S. typhimurium* e inatividade para os demais microrganismos.

A razão para as diferenças nas CIM de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como observado na Tabela 3, pode estar relacionada à constituição morfológica desses microrganismos. As bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa que confere a este grupo uma efetiva barreira de permeabilidade, restringindo a penetração de alguns compostos antimicrobianos. O conhecimento das diferenças entre as paredes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é de alta relevância para estudos do mecanismo de ação dos quimioterápicos e de patogenicidade (SCHAECHTER et al., 2002).

Estudo anterior realizado por Mota (2016), pela técnica de perfuração em Ágar Mueller-Hinton, o extrato hidroetanólico da entrecasca do caule da espécie demonstrou forte inibição para cepa padrão de *S. aureus*, para os isolados clínicos de *C. albicans* e *A. baumanni*, não corroborando com o atual resultado pela técnica de microdiluição. As divergências podem estar associadas a maior resistência das cepas e ao método utilizado.

Em experimentos com a espécie *Annona hypoglauca*, Rinaldi et al (2017) demonstraram que o extrato bruto obtido do caule apresentou inibição > 100 µg/mL para as cepas padrão *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*; a fração alcaloídica exibiu CIM de 60 µg/mL para *S. aureus* e 50 µg/mL para *E. faecalis* e > 100 µg/mL para *E. coli*. e as frações de coluna obtida dos alcaloides totais contendo os alcaloides isoboldina, normuciferina e anonaina, e a outra contendo actinodaphnina, apresentaram CIM de 70 µg/mL para *S. aureus*; 40 µg/mL para *E. faecalis* e para *E. coli*, > 100 µg/mL e 90 µg/mL, respectivamente. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) também foi avaliada e as frações contendo os alcaloides isolados obtiveram os melhores resultados.

Com base nos ensaios antimicrobianos e de citotoxicidade, os autores relataram que a partir da espécie *A. hipoglauca* foi possível selecionar pelo menos dois alcalóides de aporfina, anonaina e actinodaphnina, que contêm os requisitos estruturais suscetíveis de serem os responsáveis pelos resultados observados. Estudos relacionados à relação estrutura-atividade são necessários para elucidar as diferenças na atividade biológica relacionada aos alcaloides de *Annona*.

Dessa forma, tendo em vista que a atividade antimicrobiana em estudo de *A. hypoglauca* foi mais satisfatória com as frações enriquecidas de alcaloides específicos e que a fração alcaloídica de *A. tomentosa* do presente estudo exibiu maior efetividade frente ao

extrato, verifica-se então que CIM mais baixas poderiam ser obtidas se fossem testados os alcaloides isolados a partir da fração de alcaloides totais. Investigações sobre a CBM e CFM (Concentração Fungicida Mínima) também devem ser realizadas para resultados mais conclusivos em relação as propriedades antimicrobianas da espécie.

## 6 CONCLUSÃO

Foi possível obter uma fração de alcaloides totais de *A. tomentosa* com rendimento satisfatório. A presença desses compostos foi observada com eficaz separação.

Os perfis de fragmentações para o extrato hidroetanólico evidenciaram moléculas de 3 alcaloides: anonaina, asimilobina e norushinsunina, e 1 flavonoide: quercetina-*O*-glicosídeo, relatados pela primeira vez na entrecasca do caule da espécie.

O ensaio de citotoxicidade demonstrou que o extrato não foi citotóxico em células não neoplásicas na concentração de 1mg/mL e apresenta amplo potencial anticâncer frente as células tumorais HeLa, DU 145 e MCF 7. Novos estudos *in vitro* devem ser realizados, como perspectivas de trabalhos futuros, para a comprovação dos resultados observados preliminarmente, investigando a dose-dependência e tempo-dependência.

A análise da atividade antimicrobiana revelou que o extrato hidroetanólico de *A. tomentosa* apresentou baixa atividade frente a *S. aureus* e inatividade frente aos outros microrganismos. Enquanto a fração alcaloídica exibiu atividade moderada para *S. aureus*, *E. faecalis* e *S. typhimurium*. Investigações com a fração de alcaloides totais e/ou alcaloides isolados associados a antimicrobianos comerciais devem ser feitas para verificar a potencialização da atividade antimicrobiana desses compostos da espécie diante desses microrganismos.

Logo, considerando o potencial farmacológico de *A. tomentosa*, e que a planta é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, este trabalho abre perspectivas para exploração e valorização desse bioma que apresenta vasta riqueza em metabólitos secundários, incentivando assim a procura por novas moléculas ativas de origem natural como fontes promissoras de produtos biotecnológicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, SP de et al. Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: Embrapa-CPAC**, v. 464, 1998. APG. Disponível em: <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>>. Acesso em: 6 mar. 2019.
- BARATA, L. E. S. et al. Plantas Medicinais Brasileiras. IV. *Annona muricata* L. (Graviola). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 4, 2009.
- BARROSO, Graziela Maciel. Sistemática de angiospermas no Brasil. Universidade Federal de Viçosa, **Imprensa Universitária**, 1991.
- BASTOS, R. G. et al. Phytochemical composition, antioxidant and in vivo antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 317-332, 2019.
- BERMEJO, Almudena et al. Acetogenins from Annonaceae: recente progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 2, p. 269-303, 2005.
- CAMARA, Marcos Bispo Pinheiro. Estudo Fitoquímico da Espécie Vegetal Araticum Bravo *Annona tomentosa*. 2013.
- CARBALLO, Azucena I. et al. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 95, n. 1, p. 6-12, 2010.
- CHATROU, Lars W. et al. 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, n. 1, p. 5-40, 2012.
- CHEN, Yong et al. Antitumor activity and toxicity relationship of Annonaceous acetogenins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 394-400, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts**. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2011.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2011.
- COSTA, Emmanoel Vilaça et al. Trypanocidal Activity of Oxoaporphine and Pyrimidine- $\beta$ Carboline Alkaloids from the Branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, p. 9714-9720, 2011.
- COSTA, Emmanoel Vilaça et al. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 78-81, 2009.
- CRUZ, Pedro Ernesto Oliveira da et al. Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 4, p. 872-875, 2011.

DI STASI, Luiz Claudio; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora Unesp, 2002.

GIBBONS, Simon. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 2, p.263-277, 2004.

GOMES, Nayara de Freitas. Triagem fitoquímica e identificação de metabólitos por lc-ms do extrato hidroalcolólico das folhas da espécie vegetal *Annona exsucca* DC. 2017.

HOLETZ, Fabíola Barbiéri et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

IQBAL, Erum et al. Isolation and characterization of aristolactam alkaloids from the stem bark of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) and their biological activities. **Journal of King Saud University-Science**, v. 30, n. 1, p. 41-48, 2018.

JINDAL, A. K.; PANDYA, Kapil; KHAN, I. D. Antimicrobial resistance: A public health challenge. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 2, p. 178-181, 2015.

JOHNSON, Holly A. et al. Thwarting resistance: annonaceous acetogenins as new pesticidal and antitumor agents. **Biologically Active Natural Products. Pharmaceuticals. CRC Press, Washington, DC**, p. 173-183, 2000.

JOSSANG, Akino et al. Annomontacine: une nouvelle acétogénine  $\gamma$ -lactone-monotetrahydrofurannique cytotoxique de l'*Annona montana*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 4, p. 967-971, 1991.

KRIEF, Sabrina et al. Novel antimalarial compounds isolated in a survey of self-medicative behavior of wild chimpanzees in Uganda. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3196-3199, 2004.

LAGE, Gisele Avelar. Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. 2011.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LIMA, Uatyla de Oliveira et al. Avaliação da atividade inseticida dos extratos de *Annona mucosa* (Jacq.)(Annonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). 2017.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

MAAS, P. et al. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110631>>. Acesso em: 6 Mar. 2019.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. T. Studies in Annonaceae. II - A monograph of the genus *Anaxagorea* A. St. Hil.- Part 1. **Botanische Jahrbuecher fuer Systematik**, v. 105, p. 73-134, 1984.

- MALIK, Tauseef Ahmad et al. Breaking the resistance of *Escherichia coli*: Antimicrobial activity of *Berberis lycium* Royle. **Microbial pathogenesis**, v. 102, p. 12-20, 2017.
- MARTINS, D. Alcalóides, flavonóides e terpenóides de *Xylopiá aromática*. São Paulo, 134p. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1996.
- MOREIRA, Isabel C. et al. Antifungal aromadendrane sesquiterpenoids from the leaves of *Xylopiá brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 5, p. 828-831, 2003.
- MOREIRA, Isabel C. et al. Genus *Xylopiá* (Annonaceae): chemical and biological aspects. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 11, p. 1921-1943, 2013.
- MOTA, Ana Cristina Costa. Prospecção Fitoquímica e Atividade Biológica da casca do caule da espécie vegetal Araticum bravo (*Annona tomentosa* RE Fr.). 2016.
- NATARAJAN, D.; SRINIVASAN, R.; SHIVAKUMAR, M. S. *Phyllanthus wightianus* Müll. Arg.: A potential source for natural antimicrobial agents. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- OLIVEIRA, Marcelo Souza Silva et al. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 326-331, 2007.
- PHILLIPSON, J. David. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.
- RABÊLO, S. V. **Revisão de alcalóides do gênero annona, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*)**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Vale do São Francisco.
- RINALDI, Maria VN et al. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 77-83, 2017.
- RINALDI, Maria Valeria Nani. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.** 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.
- SALAM, Akram M.; QUAVE, Cassandra L. Opportunities for plant natural products in infection control. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 189-194, 2018.
- SANTOS, Deborah Yara Alves Cursino dos; SALATINO, Maria Luiza Faria. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 567-573, 2000.
- SCHAECHTER, Moselio et al. Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 2002.

SILVA, F. M. A. et al. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. **Quím. nova**, v. 35, n. 5, p. S1-S5, 2012.

SEMRET, Makeda; HARAOU, Louis-Patrick. Antimicrobial Resistance in the Tropics. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, Issue 1, 2019.

SILVA, Cinara Vasconcelos da et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. 2010.

SILVA, L. E. et al. Plantas do gênero *Xylopia*: composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 814-826, 2015.

SIMEON, S.; RIOS, J. L.; VILLAR, A. Alkaloids from *Annona cherimolia* (Mill.) stem bark. **Plantes Medicinales et Phytotherapie (France)**, 1989.

VEGA, Maria RG et al. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1554-1559, 2007.