



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

AGLAETE DE ARAÚJO PINHEIRO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE,
HIPOGLICEMIANTE E ANTIMICROBIANO DE *Annona tomentosa* R. E. Fr.
(ANNONACEAE)**

SÃO LUÍS – MA

2022

AGLAETE DE ARAÚJO PINHEIRO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE,
HIPOGLICEMIANTE E ANTIMICROBIANO DE *Annona tomentosa* R. E. Fr.
(ANNONACEAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

SÃO LUÍS – MA

2022

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

Pinheiro, Aglaete de Araújo.

Caracterização química, avaliação do potencial antioxidante, hipoglicemiante e antimicrobiano de *Annona tomentosa* R. E. Fr. Annonaceae / Aglaete de Araújo Pinheiro. - 2022.

84 f.

Coorientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.

Orientador(a): Cláudia Quintino da Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, 2022.

1. Flavonoides. 2. Alcaloides. 3.

Potencial biológico. 4. Toxicidade.

I. Rocha, Claudia Quintino . II. Santos, Ana Paula Silva de Azevedo. III. Título.

AGLAETE DE ARAÚJO PINHEIRO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE,
HIPOGLICEMIANTE E ANTIMICROBIANO DE *Annona tomentosa* R. E. Fr.
(ANNONACEAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 23/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha
(Orientadora – PPGQuim/UFMA)

Profa. Dra. Joyce Kelly do Rosário da Silva
(Membro – PPGBIOTEC/PPGQ/UFPA)

Prof. Dr. Iranaldo Santos da Silva
(Membro – PPGQuim/UFMA)

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Aglaete de Araújo Pinheiro

Naturalidade: São Luís - MA

Nacionalidade: Brasileira

Formação Acadêmica

Licenciada em Química pela Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus Universitário do Bacanga.

Pós-Graduação: Mestrado (2020-2022)

Mestrado em Química com área de concentração em Química, realizado no Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQuim) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), sob orientação da Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

Resumos em congressos

Aglaete de A. Pinheiro, Marcos B. P. Camara, Luna N. Vasconcelos, Josivan R. Farias, Rosane N. M. Guerra, Cláudia Q. da Rocha. **Chemical composition, evaluation of the antimicrobial activity and toxicity of *Annona tomentosa* R. E. Fr.** 8th Brazilian Conference on Natural Product/ XXXIV RESEM. 2021.

Aglaete de A. Pinheiro, Marcos B. P. Camara, Luna N. Vasconcelos, Amanda de J. A. Miranda, Marcelino S. do Rosário, Josivan R. Farias, Rosane N. M. Guerra, Cláudia Q. da Rocha. **Caracterização química e avaliação do potencial biofarmacológico de *Annona tomentosa* R. E. Fr.** XIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia. 2021.

Capítulo de livro publicado

PINHEIRO, A. A.; VASCONCELOS, L. N.; CAMARA, M. B. P.; ROCHA, C. Q.; TELES, A. M.; MIRANDA, A. J. A.; SANTOS, A. P. S. A.; OLIVEIRA, P. R. Aspectos taxonômicos, químicos e potencial farmacológico de *Annona tomentosa* R. E. Fr.: Uma breve revisão. In: LEMOS, J. R. (org.). **Ciências biológicas e da saúde: pesquisas básicas e aplicadas 3**. Rio Branco: Stricto Sensu, 2021. p. 50–64.

*Aos meus pais, Aglaete e Marcos; a minha
irmã, Joana Caroline; ao meu companheiro,
Lucas Queiroz e aos meus amores, Téo e Tiana,
por toda confiança, paciência, 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 e, ao meu primo, Juninho (*in memoriam*), que sempre acreditou em mim.

A minha orientadora, Dra. Cláudia Rocha, pela confiança, conhecimento, disposição e incentivo durante todo este processo, desde a monografia.

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

A todos os alunos e professores do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da UFMA, ao qual faço parte, pelo conhecimento compartilhado, amizade e cooperação para a realização deste trabalho. Dedico, em especial, aos amigos Marcos Camara, Luna Vasconcelos e Amanda Miranda, por fazerem parte de forma integral do mesmo.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Ana Paula dos Santos, do Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer da UFMA, pelas contribuições nos experimentos.

A Profa. Dra. Rosane Guerra e ao amigo Josivan Regis, pela colaboração nos ensaios e toda dedicação ofertada.

Aos meus amigos, que sempre se fizeram presentes em meu percurso acadêmico, compartilhando cada etapa, com carinho, amor e orações.

À CNPq, pela bolsa, e, à CAPES, pelo PROCAD-AM.

“O mistério da existência humana não reside apenas em permanecer vivo, mas em encontrar algo por que valha a pena viver.”

(Fiódor Dostoievski)

RESUMO

Annona tomentosa R. E. Fr. é uma Annonaceae não endêmica do Brasil, conhecida popularmente como “araticum” e utilizada tradicionalmente no tratamento de infecções microbianas, parasitárias, dores e inflamações. Contudo, existem poucos estudos reportados acerca de sua composição química e avaliação farmacológica. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico e avaliar o potencial biológico, a partir de testes antioxidante, enzimático, antimicrobiano, citotóxico (*in vitro*) e de toxicidade aguda (*in vivo*) do extrato bruto e frações acetato e alcaloídica da casca do caule de *A. tomentosa*. A análise do extrato metanólico (EM-AT) por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS), levou a identificação de onze compostos pertencentes as classes dos ácidos fenólicos, flavonoides e alcaloides, sendo a maioria deles identificados pela primeira vez na espécie. Na avaliação do potencial antioxidante, pelos métodos de DPPH e ABTS, o EM-AT e a fração acetato de etila (FAC-AT) inibiram os radicais (>50%) na maior concentração avaliada (10,0 µg/mL), de forma dose-dependente e com baixa concentração inibitória média (CI₅₀), nas mesmas concentrações do padrão. Em relação a capacidade de inibição enzimática de α-glicosidase, somente o EM-AT apresentou atividade, exibindo inibição acima de 95%, maior que a da Arcabose, nas concentrações de 52,63 e 26,31 µg/mL. Quanto a atividade antimicrobiana, todas as amostras avaliadas apresentaram resultados promissores. Pelo teste de difusão em ágar, a FAC-AT exibiu halo de inibição (18,0 ± 1,41 mm) maior que o do controle Imipenem (IMP) (16,5 ± 9,0 mm) para *Escherichia coli*, e, por microdiluição, a FAC-AT mostrou concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 10,4 µg/mL, menores que as dos fármacos IMP (12,5 ± 0,00 µg/mL) e Fluconazol (FLZ) (13,3 ± 4,62 µg/mL) para *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Além disso, a fração alcaloídica (FA-AT) também apresentou CIM (12,5 ± 0,00 µg/mL) menor que a do controle FLZ (13,3 ± 4,62 µg/mL) para *C. albicans*. No ensaio do biofilme microbiano, o EM-AT exibiu os melhores resultados. Para *S. aureus*, apresentou redução expressiva em 4×CIM₉₀ (p<0.0001), e para *C. albicans*, mostrou resultados mais significantes (p<0.0001) que o controle positivo FLZ. No ensaio citotóxico em eritrócitos de carneiro e de toxicidade aguda em larvas de *Tenebrio molitor*, os resultados expressaram correlação, em uma faixa de concentração entre 1,0 e 100,0 µg/mL e µg/Kg, respectivamente. O extrato e as frações não apresentaram toxicidade relevante frente ao modelo alternativo de invertebrados. O potencial terapêutico aliado à baixa toxicidade do extrato e frações abrem perspectivas promissoras para exploração da espécie *A. tomentosa*, visando o desenvolvimento de produtos a partir de extratos, frações e/ou moléculas isoladas, que sejam eficazes e menos tóxicos.

Palavras-chave: Flavonoides. Alcaloides. Potencial biológico. Toxicidade.

ABSTRACT

Annona tomentosa R. E. Fr. is a non-endemic Annonaceae from Brazil, popularly known as “araticum” and traditionally used in the treatment of microbial and parasitic infections, pain and inflammation. However, there are few studies reported about its chemical composition and pharmacological evaluation. The objective of this work was to carry out the phytochemical study and evaluate the biological potential, from antioxidant, enzymatic, antimicrobial, cytotoxic (*in vitro*) and acute toxicity (*in vivo*) tests of the crude extract and acetate and alkaloid fractions of the stem bark of *A. tomentosa*. The analysis of the methanolic extract (EM-AT) by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS), led to the identification of eleven compounds belonging to the classes of phenolic acids, flavonoids and alkaloids, most of them identified for the first time in species. In the evaluation of the antioxidant potential, by the DPPH and ABTS methods, EM-AT and the ethyl acetate fraction (FAC-AT) inhibited the radicals (>50%) at the highest concentration evaluated (10.0 µg/mL), of dose-dependent form and with low mean inhibitory concentration (IC₅₀), at the same concentrations as the standard. Regarding the enzymatic inhibition capacity of α-glucosidase, only EM-AT showed activity, exhibiting inhibition above 95%, greater than that of Arcabose, at concentrations of 52.63 and 26.31 µg/mL. As for antimicrobial activity, all samples evaluated showed promising results. By the agar diffusion test, FAC-AT exhibited an inhibition halo (18.0 ± 1.41 mm) greater than the control Imipenem (IMP) (16.5 ± 9.0 mm) for *Escherichia coli*, and, by microdilution, FAC-AT showed minimum inhibitory concentrations (MIC) of 10.4 µg/mL, lower than those of the drugs IMP (12.5 ± 0.00 µg/mL) and Fluconazole (FLZ) (13.3 ± 0.00 µg/mL). 4.62 µg/mL) for *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. In addition, the alkaloid fraction (FA-AT) also presented MIC (12.5 ± 0.00 µg/mL) lower than the FLZ control (13.3 ± 4.62 µg/mL) for *C. albicans*. In the microbial biofilm assay, EM-AT exhibited the best results. For *S. aureus*, it showed a significant reduction in 4×MIC₉₀ (p<0.0001), and for *C. albicans*, it showed more significant results (p<0.0001) than the positive control FLZ. In the cytotoxic assay in sheep erythrocytes and acute toxicity in *Tenebrio molitor* larvae, the results showed correlation, in a concentration range between 1.0 and 100.0 µg/mL and µg/Kg, respectively. The extract and fractions did not show relevant toxicity against the alternative model of invertebrates. The therapeutic potential allied to the low toxicity of the extract and fractions open promising perspectives for the exploration of the species *A. tomentosa*, aiming at the development of products from extracts, fractions and/or isolated molecules, which are effective and less toxic.

Keywords: Flavonoids. Alkaloids. Biological potential. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécie <i>Annona tomentosa</i>	23
Figura 2 – Exsicata de <i>Annona tomentosa</i>	24
Figura 3 – 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>	24
Figura 4 – Alcaloides isolados de espécies de <i>Annona</i>	25
Figura 5 – Acetogeninas isoladas de <i>Annona squamosa</i>	25
Figura 6 – Diterpenos <i>ent</i> -kauranos isolados de espécies de <i>Annona</i>	26
Figura 7 – Flavonoides isolados de espécies de <i>Annona</i>	26
Figura 8 – Alcaloide norushinsunina e acetogenina neoannonina	28
Figura 9 – Perfis cromatográficos do EM-AT (A), FAC-AT (B) e FA-AT (C) obtidos em 254 nm.....	40
Figura 10 – CCD da fração alcaloídica utilizando sistema de eluição DCM/MeOH (9:1).....	41
Figura 11 – Espectro de massas referente à m/z 383 $[2M-H]^-$	43
Figura 12 – Espectro de massas referente à m/z 371 $[M-H]^-$	44
Figura 13 – Espectro de massas referente à m/z 533 $[M-H]^-$	44
Figura 14 – Espectro de massas referente à m/z 683 $[2M-H]^-$	45
Figura 15 – Espectro de massas referente à m/z 371 $[M-H+18]^-$	46
Figura 16 – Espectro de massas referente à m/z 577 $[M-H-Cl]^-$	47
Figura 17 – Espectro de massas referente à m/z 865 $[M-H]^-$	47
Figura 18 – Trímero de procianidina elucidado do extrato metanólico (EM-AT) de <i>Annona tomentosa</i>	48
Figura 19 – Espectro de massas referente à m/z 289 $[M-H]^-$	49
Figura 20 – Espectro de massas referente à m/z 303 $[M-H]^-$	50
Figura 21 – Espectro de massas referente à m/z 266 $[M-H]^+$	52
Figura 22 – Espectro de massas referente à m/z 268 $[M-H]^+$	52
Figura 23 – Gráficos da atividade antioxidante (%) do EM-AT (A), da FAC-AT(B) e do padrão quercetina pelos métodos do DPPH e ABTS	53
Figura 24 – Estrutura de composto fenólico com identificação das porções lipofílica (aglicona) e hidrofílica (glicona)	54
Figura 25 – Inibição da atividade enzimática de α -glicosidase pelo extrato metanólico (EM-AT) da casca do caule de <i>Annona tomentosa</i>	56

Figura 26 – Efeitos das concentrações do extrato metanólico (EM-AT) e fração acetato (FAC-AT) de <i>Annona tomentosa</i> na biomassa do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i>	62
Figura 27 – Efeitos das concentrações do extrato metanólico (EM-AT), frações acetato e alcaloídica (FAC-AT e FA-AT) de <i>Annona tomentosa</i> na biomassa do biofilme de <i>Candida albicans</i>	63
Figura 28 – Citotoxicidade do extrato (EM-AT) (A), frações acetato (FAC-AT) (B) e alcaloídica (FA-AT) (C) de <i>Annona tomentosa</i> em eritrócitos de carneiro	65
Figura 29 – Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico (EM-AT) de <i>Annona tomentosa</i> em larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	66
Figura 30 – Avaliação da toxicidade aguda da fração acetato (FAC-AT) de <i>Annona tomentosa</i> em larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	67
Figura 31 – Avaliação da toxicidade aguda da fração alcaloídica (FA-AT) de <i>Annona tomentosa</i> em larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	68

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 1 – Sinopse brasileira para Família Annonaceae	21
Tabela 2 – Taxonomia da planta.....	23
Tabela 3 – Resultados das extrações para o extrato metanólico e frações	39
Tabela 4 – Compostos identificados do extrato metanólico (EM-AT) em modo de ionização negativo	42
Tabela 5 – Alcaloides aporfínicos identificados no extrato metanólico (EM-AT) de <i>Annona tomentosa</i> com as principais fragmentações observadas.....	51
Tabela 6 – Atividade antioxidante do extrato metanólico (EM-AT) e fração acetato (FAC-AT) de <i>Annona tomentosa</i>	53
Tabela 7 – Zonas de inibição (mm) da fração acetato (FAC-AT) de <i>Annona tomentosa</i> e fármacos Imipenem (IMP) e Fluconazol (FLZ)	58
Tabela 8 – Zonas de inibição (mm) da fração alcaloídica (FA-AT) de <i>Annona tomentosa</i> e fármacos Imipenem (IMP) e Fluconazol (FLZ)	58
Tabela 9 – Zonas de inibição (mm) do extrato metanólico (EM-AT) de <i>Annona tomentosa</i> e fármacos Imipenem (IMP) e Fluconazol (FLZ)	59
Tabela 10 – Concentrações inibitórias mínimas do extrato metanólico (EM-AT), frações acetato (FA-AT) e alcaloídica (FAC-AT) de <i>Annona tomentosa</i> e fármacos frente à cepas microbianas.....	59
Tabela 11 – Concentrações dos tratamentos das amostras teste para o biofilme microbiano .	61
Esquema 1 – Proposta de mecanismo de fragmentação para procianidinas elucidadas do EM-AT.....	48
Esquema 2 – Propostas mecanísticas de fragmentação para os alcaloides anonaina (m/z 266) e asimilobina (m/z 268) do extrato metanólico (EM-AT) de <i>Annona tomentosa</i>	51

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABHI-Ágar Infusão de Cérebro e Coração

ABTS-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

AMH-Ágar Muller Hinton

ASD-Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC-*American Type Culture Collection*

BHI-*Brain Heart Infusion*

C18-Cadeia de carbono octadecil ligada à sílica

AcOEt-Acetato de etila

CCD-Cromatografia em Camada Delgada

CH₂O-Formaldeído

CH₃OH-Metanol

CHCl₃-Clorofórmio

CI₅₀-Concentração Inibitória Média

CIM₉₀-Concentração Inibitória Mínima de uma amostra capaz de matar, pelo menos, 90% dos patógenos sensíveis.

CMH-Caldo Mueller Hinton

CO-Monóxido de Carbono

CO₂-Dióxido de carbono

CTRL-Controle

CV-Cristal Violeta

DCM-Diclorometano

DMSO-Dimetilsulfóxido

DPPH-2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EM-AT-Extrato metanólico de *Annona tomentosa*

ESI-Fonte de Ionização Eletrospray

FA-AT-Fração alcaloídica de *Annona tomentosa*

FAC-AT-Fração acetato de etila de *Annona tomentosa*

FIA-Análise por Injeção em Fluxo

FLZ-Fluconazol

HPLC-ESI-IT/MS-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com ionização por Eletrospray e analisador de massas do tipo Íon Trap acoplada à Espectrometria de Massas

HPLC-PDA-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à detecção de Arranjo de Diodos

HRF-Fissão Heterocíclica do Anel

IMP-Imipenem

IT-Ion *Trap* (Analisador de Armadilha de Íons)

m/z-Relação massa/carga

MeOH-Metanol

MOPS-(3-(*N-Morpholino*)propane sulfonic acid)

MS² ou MS/MS-Dois estágios de espectrometria de massas

MSn-Fragmentações em múltiplos estágios

NaCl-Cloreto de sódio

NH₃-Amônia

NH₄OH-Hidróxido de amônio

PBS-Solução tampão fosfato

pH-Potencial Hidrogeniônico

QM-Reação Quinona Metídeo

RDA-Reação Retro Diels-Alder

RPM-Rotações Por Minuto

RPMI 1640-Meio *Roswell Park Memorial Institute*

SHAM-Grupo controle sem substância

SiBBr-Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira

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

SPE-Solid *Phase Extraction* (Extração em Fase Sólida)

UFC-Unidade Formadora de Colônias

UV-Ultravioleta

UV-Vis-Detector Ultravioleta e Visível

YNB-Yeast *Nitrogen Base* (Base Nitrogenada de Levedura)

[M-H]⁻ -Modo de ionização negativo

[M-H]⁺ -Modo de ionização positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos.....	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	Família Annonaceae	21
3.2	Gênero <i>Annona</i>	22
3.3	<i>Annona tomentosa</i> R. E. Fr.....	22
3.4	Metabólitos secundários frequentes em <i>Annona</i>	25
3.5	Potencial biológico de espécies de <i>Annona</i>	27
4	METODOLOGIA	30
4.1	Procedimentos Fitoquímicos	30
4.1.1	Coleta do material vegetal.....	30
4.1.2	Preparo do extrato	30
4.1.3	Partição líquido-líquido do extrato	30
4.1.3.1	Fração acetato de etila.....	30
4.1.3.2	Extração ácido-base (Fração alcaloídica).....	30
4.2	Perfil cromatográfico e identificação dos constituintes químicos de <i>Annona tomentosa</i> 31	
4.2.1	HPLC-PDA.....	31
4.2.2	HPLC-ESI-IT/MS	31
4.3	Ensaio biológicos	32
4.3.1	Ensaio <i>in vitro</i>	32
4.3.1.1	Avaliação do potencial antioxidante de <i>A. tomentosa</i>	32
4.3.1.2	Avaliação da capacidade de inibição enzimática de α -glicosidase.....	33
4.3.1.3	Avaliação do potencial antimicrobiano de <i>A. tomentosa</i>	33
4.3.1.4	Avaliação da citotoxicidade de <i>A. tomentosa</i> sobre eritrócitos de carneiro	36
4.3.2	Ensaio <i>in vivo</i>	37
4.3.2.1	Avaliação da toxicidade aguda de <i>A. tomentosa</i> em modelo invertebrado (<i>Tenebrio molitor</i> L.).....	37
4.4	Análise estatística	38

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Rendimento do extrato bruto e frações	39
5.2	Perfil cromatográfico e identificação das substâncias	39
5.3	Avaliação do potencial antioxidante.....	53
5.4	Avaliação da capacidade de inibição enzimática de α -glicosidase	55
5.5	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	57
5.6	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> e toxicidade aguda <i>in vivo</i>	64
6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

As plantas constituem-se como base da medicina tradicional em todo mundo, há milhares de anos, produzindo substâncias bioativas para o desenvolvimento de novos fármacos (ROMANO; TATONETTI, 2019). Produtos naturais podem atuar como agentes quimiopreventivos, antimicrobianos, antineoplásicos, dentre outros (RAHMAN; SARKER, 2020; SHRIVASTAVA et al., 2021; SINGH; KUMARI; AHMED, 2022), apresentando vantagens significativas sobre as moléculas sintéticas convencionais, tendo em vista a rica diversidade e complexidade estrutural, que proporcionam ações biologicamente mais amplas (HUANG; ZHANG, 2022). Deste modo, o desenvolvimento de fármacos de origem natural, com maior tolerância e menor toxicidade, é fundamental para se alcançar resultados promissores no tratamento de diversos tipos de doenças, melhorando a qualidade de vida.

Entre as famílias botânicas como fonte de produtos naturais, destaca-se a Annonaceae, com cerca de 122 gêneros e 2.440 espécies, das quais, aproximadamente 170 espécies são descritas para o gênero *Annona* (RAINER; CHATROU, 2014). No Maranhão, evidencia-se a ocorrência de 9 gêneros de Annonaceae, com cerca de 120 espécies, sendo o gênero *Annona* de maior abundância, com 46 espécies descritas no Estado (SIBBr, 2021). Este gênero configura-se como um dos mais importantes na descoberta de novos fármacos (ALMEIDA; SANTOS, 2018), devido à presença de metabólitos secundários com propriedades terapêuticas, como saponinas, terpenoides, flavonoides, taninos, glicosídeos, fenóis, alcaloides e acetogeninas (QAZI et al., 2018; YAJID et al., 2018).

Estudos relatam diversas atividades biológicas associadas aos fitoquímicos dos extratos, frações e óleos essenciais de espécies de *Annona*, como antioxidante, citotóxica, antimicrobiana e antidiabética (BADMUS et al., 2020), antitumoral (SILVA et al., 2018); bem como, anticonvulsivantes, sedativas, ansiolíticas, antidepressivas (DINIZ et al., 2019) e antileishmanicida (BRÍGIDO et al., 2020).

Estima-se que a classe dos alcaloides, uma das mais investigadas da família Annonaceae, abranja cerca de 12.000 compostos, que correspondem a cerca de 15% a 20% dos produtos naturais conhecidos, dos quais ressalta-se o grupo dos alcaloides indólicos, representados por mais de 4.000 compostos conhecidos, que apresentam grande diversidade em termos de estrutura e de propriedades farmacológicas, sendo caracterizados como anti-inflamatórios, antinociceptivos, antitumorais, antioxidantes e antimicrobianos (MARQUES; LOPES, 2015; ROSALES et al., 2020).

Levando em consideração a espécie *Annona tomentosa*, foram realizadas, inicialmente, investigações com o extrato hidroetanólico da entrecasca do caule, que

demonstrou potenciais atividades citotóxica *in vitro* frente a células neoplásicas e antimicrobiana, e revelou a presença de fitoquímicos, como os alcaloides anonaina, assimilobina, norushinsunina (PINHEIRO, 2019), com bioatividades já relatadas em outras espécies. Contudo, poucos trabalhos são descritos na literatura para *A. tomentosa*.

Portanto, tendo em vista a riqueza do gênero *Annona*, sua abundância no Estado do Maranhão, o fácil cultivo da espécie e, principalmente, a importância do desenvolvimento de novos fármacos e propostas terapêuticas, o presente trabalho visou investigar quimicamente o extrato metanólico da casca do caule de *Annona tomentosa*, seu potencial biológico e de suas frações, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, que possibilitarão direcionar futuros estudos para o isolamento de substâncias ativas e avaliação em diferentes alvos. Além disso, esta pesquisa visa mostrar as potencialidades da biodiversidade maranhense e valorizar o conhecimento tradicional associado, sobretudo no que diz respeito às espécies da família Annonaceae.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a composição química e o potencial biológico de *Annona tomentosa*.

2.2 Específicos

- Identificar os constituintes químicos presentes no extrato metanólico através de técnicas de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI-IT/MS);
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato e fração acetato de etila (métodos de DPPH e ABTS);
- Avaliar a atividade antihipoglicemiante do extrato e frações acetato de etila e alcaloídica por meio da inibição de α -glicosidase;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato e frações (difusão em ágar, microdiluição e biofilme);
- Avaliar a citotoxicidade em eritrócitos de carneiro e a toxicidade aguda em larvas de *Tenebrio molitor* do extrato e frações.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae compreende aproximadamente 122 gêneros e 2.440 espécies agrupadas em quatro subfamílias (Anaxagoreoideae, Ambavioideae, Annonoideae e Malmeoideae) e 14 tribos (CHATROU et al., 2012; RAINER; CHATROU, 2014). Apesar do grande quantitativo de espécies conhecidas, somente 150, pouco mais de 7%, pertencentes a 41 gêneros foram estudadas quanto à taxonomia, caracterização química e farmacológica (LÚCIO et al., 2015). A tabela a seguir mostra a sinopse de Annonaceae para todo o Brasil.

Tabela 1 - Sinopse brasileira para Família Annonaceae

	Aceitos	Endêmicos	Sinônimos
Gêneros	32	3	11
Espécies	384	154	342
Subespécies	0	0	3
Variedades	0	0	55

Fonte: Lobão et al (2020)

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), 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; PEIXOTO ARAUJO et al., 2021; PERRONE et al., 2022; QUÍLEZ et al., 2018; RABELO et al., 2016).

As atividades biológicas de espécies desta família são atribuídas aos metabólitos secundários, como terpenos, alcaloides, acetogeninas, dentre outros. A família Annonaceae vem, então, sendo apontada como uma fonte importante de substâncias bioativas com possíveis aplicações medicinais (PAES et al., 2016; QUÍLEZ et al., 2018). Espécies dos mais variados gêneros de Annonaceae, como *Annona*, *Guatteria*, *Xylopia* e *Unonopsis*, têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças negligenciadas, como doença de chagas, malária e leishmaniose (FRAUSIN et al., 2014; ROCHA et al., 2021; TSABANG et al., 2012).

Logo, considerando a ampla gama de substâncias ativas presentes em anonáceas, investigações farmacológicas com espécies da família têm aumentado. Resultados promissores foram então observados a partir de ensaios biológicos, como: antitumoral (BOMFIM et al., 2016; SILVA et al., 2018); leishmanicida (BRÍGIDO et al., 2020; COSTA et al., 2009; LÓPEZ;

CUCA; DELGADO, 2009); antiviral (OLIVIER; VAN VUUREN; MOTEETEE, 2015; ROCHA et al., 2021); tripanocida (COSTA et al., 2012; OKPEKON et al., 2022; PINHEIRO et al., 2009; SILVA et al., 2009, 2013); larvicida (RODRIGUES et al., 2021; SOONWERA, 2015) e antimicrobiano (AGUILAR-VILLALVA et al., 2021; KAMDEM et al., 2022; SOUSA et al., 2012).

3.2 Gênero *Annona*

O gênero *Annona* compreende cerca de 170 espécies de árvores e arbustos (COL, 2022). As espécies mais comuns no Brasil são *A. muricata*, *A. cherimola*, *A. coriacea*, *A. reticulata*, e *A. squamosa* (STASI; HIRUMA-LIMA, 2003), que são de grande importância econômica como fonte de frutos comestíveis e nutritivos, sendo amplamente cultivadas e comercializadas. Estas espécies são popularmente conhecidas como: graviola, cherimóia, frutadão-conde ou ata, pinha, fruta-pinha, respectivamente. Seus frutos são usados *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (LORENZI; MATOS, 2002). Espécies de *Annona* também são usadas na fabricação de cosméticos, como a *Annona muricata* L., que é utilizada frequentemente para a obtenção de produtos que atuam na prevenção da degeneração e diminuição do colágeno na pele (BARATA et al., 2009; KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

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, 1985), ou de *A. muricata* (“graviola”), cujo decoto das folhas é utilizado contra 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., 2013b). Dentre essas espécies, com potencial químico e biológico, destaca-se *Annona tomentosa*.

3.3 *Annona tomentosa* R. E. Fr.

Annona tomentosa (Figura 1), popularmente conhecida como “araticum rasteiro” ou “araticum da moita”, é uma espécie nativa e não endêmica no Brasil, com ocorrências confirmadas no Norte (Pará, Rondônia, Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo), com domínios fitogeográficos na Amazônia, Cerrado,

Pantanal e tipo de vegetação característica do Cerrado (MENDES-SILVA et al., 2020). Na Tabela 2, encontra-se descrita a taxonomia da planta.

Figura 1 – Espécie *Annona tomentosa*



Fonte: Pontes; Mello-Silva (2003)

Tabela 2 - Taxonomia da planta

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Magnoliales
Família	Annonaceae
Gênero	<i>Annona</i>
Espécie	<i>Annona tomentosa</i>

Fonte: SiBBR (2021)

Apesar da variação morfológica, *Annona tomentosa* pode ser reconhecida por seus tricomas estrelados e eretos das partes vegetativas, bem como por suas pétalas internas, que são mais estreitas que as externas. A espécie destaca-se pela utilização por populações regionais devido às suas propriedades farmacológicas, sendo usada no tratamento de picadas de cobras, afecções parasitárias no couro cabeludo, diarreias, estomatites, cefaleias, furúnculos e úlceras (ALMEIDA et al., 1998; MOTA, 2016).

Estudos realizados por MOTA (2016) relata a presença de vários metabólitos secundários, como taninos, flavonoides, saponinas e alcaloides, além de demonstrar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroetanólico da casca do caule de *Annona tomentosa*. A Figura 2 apresenta a exsicata da espécie e, a Figura 3, diferentes fases do seu desenvolvimento.

Figura 2 – Exsicata de *Annona tomentosa*



Fonte: Camara (2013)

Figura 3– 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)



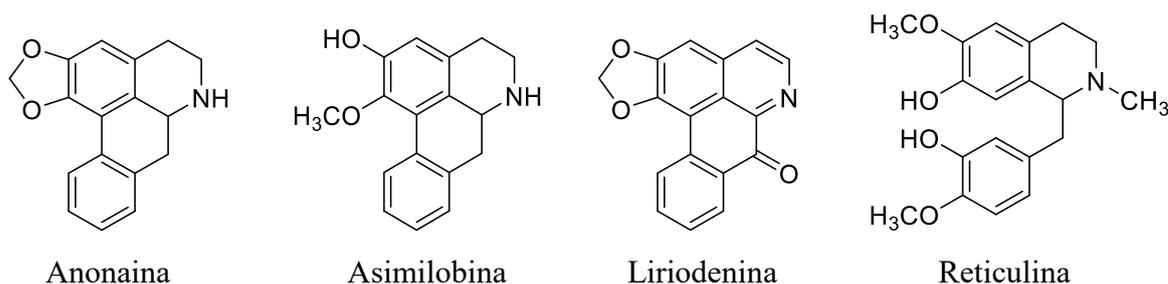
(E)

Fonte: Camara (2013)

3.4 Metabólitos secundários frequentes em *Annona*

Revisões de espécies de Annonaceae reportam a presença de flavonoides, terpenos, acetogeninas e mais de 130 alcaloides (COSTA, 2009; MOREIRA et al., 2013; SILVA et al., 2015), sobretudo no gênero *Annona*. Anonaina, assimilobina, liriiodenina e reticulina (Figura 4) são alguns exemplos de alcaloides descritos em muitas espécies desse gênero, podendo ser considerados como marcadores quimiotaxonômicos (CRUZ et al., 2011).

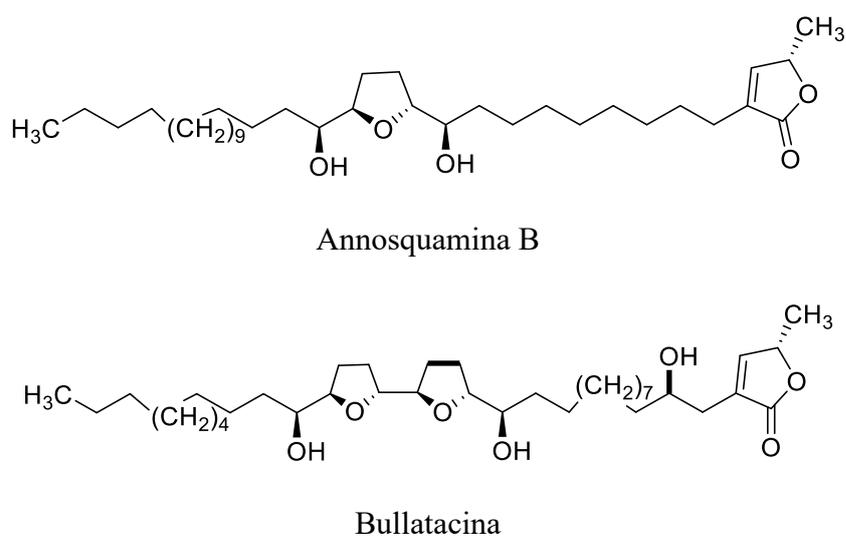
Figura 4 – Alcaloides isolados de espécies de *Annona*



Fonte: Autora (2021)

As acetogeninas (ACG) são substâncias naturais encontradas exclusivamente na família Annonaceae, sendo o gênero *Annona* a principal fonte desta classe de compostos, com ACGs isoladas de 20 espécies (BERMEJO et al., 2005; NESKE et al., 2020). Alguns exemplos de acetogeninas de anonáceas são annosquamina B e bullatacina (Figura 5), isoladas de *Annona squamosa* (CHEN et al., 2013).

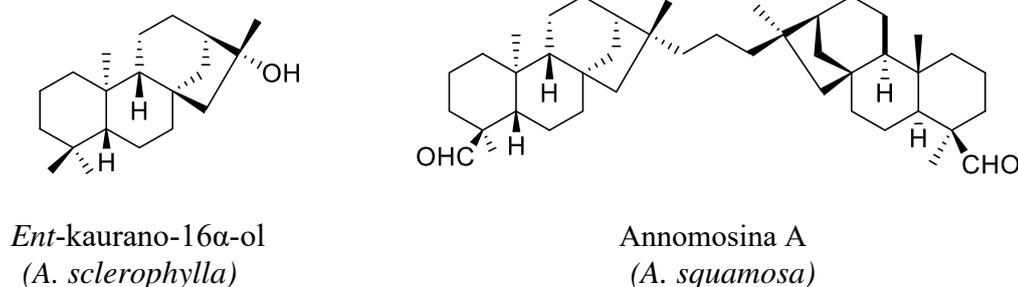
Figura 5 – Acetogeninas isoladas de *Annona squamosa*



Fonte: Autora (2021)

Os diterpenos frequentemente encontrados em espécies do gênero *Annona* são do tipo *ent*-kaurano (Figura 6) e também podem ser considerados seus marcadores quimiotaxonômicos (CRUZ et al., 2011).

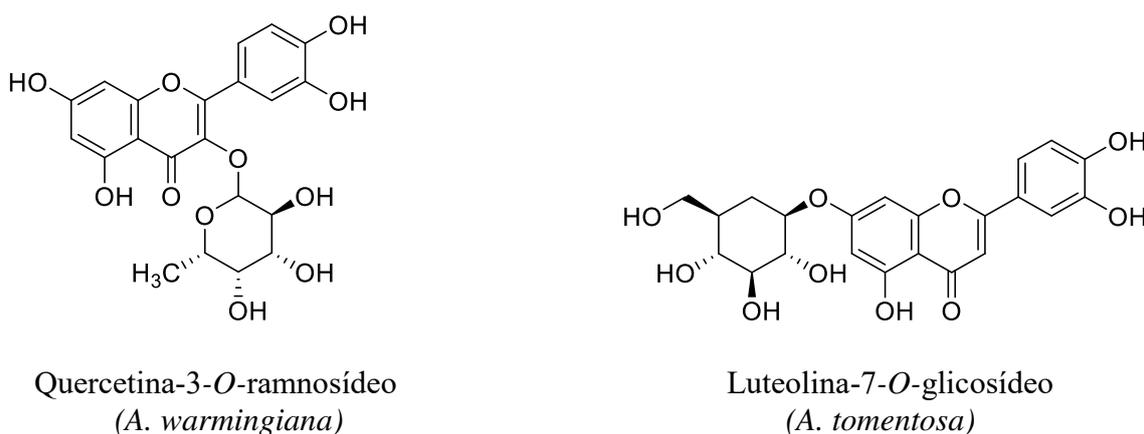
Figura 6 - Diterpenos *ent*-kauranos isolados de espécies de *Annona*



Fonte: Autora (2021)

As subclasses 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* (RINALDI, 2008; SANTOS; SALATINO, 2000; VEGA et al., 2007). Exemplos destes flavonoides isolados são mostrados na Figura 7.

Figura 7 – Flavonoides isolados de espécies de *Annona*



Fonte: Autora (2021)

Segundo levantamento bibliográfico, realizado no período de 2000 a 2017, 25 flavonoides com ocorrência no gênero *Annona* foram catalogados e encontram-se distribuídos nas seguintes classes: flavonóis (21), flavonas (3) e flavanóis (1) (ALMEIDA; SANTOS,

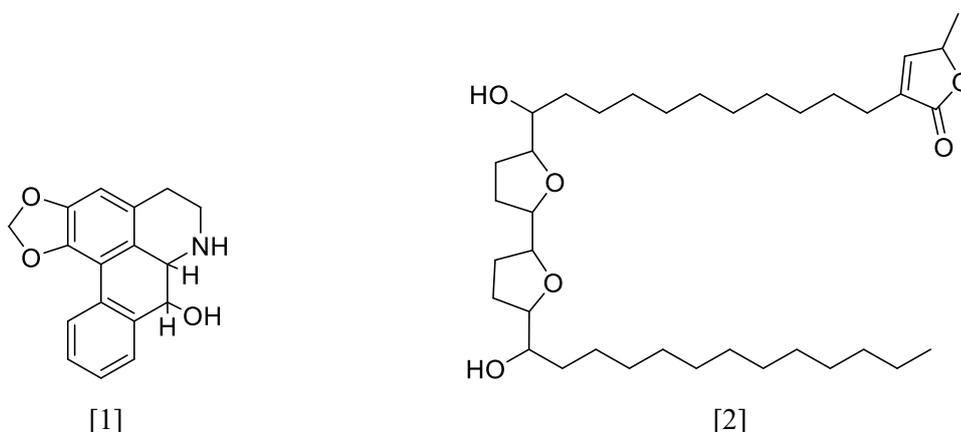
2018). Quanto ao potencial biológico, alguns estudos com espécies de *Annona* associam atividade anticâncer promissora a estes compostos (VEGA et al., 2007; YANG et al., 2015).

3.5 Potencial biológico de espécies de *Annona*

O gênero *Annona* tem sido amplamente estudado devido à presença evidente de certas classes de metabólitos, com propriedades farmacológicas bem consolidadas e bastante promissoras, das quais se destaca a potente ação citotóxica, associada principalmente as acetogeninas, que se destacam ainda pelas propriedades antineoplásica, antimicrobiana, antiparasitária, pesticida, imunossupressora e antimalárica (BARRETO, 2014; CHEN et al., 2011; GUINAUDEAU; LEBŒUF; CAVÉ, 1979; RINALDI, 2008), e, aos alcaloides isoquinolínicos, que desempenham papel relevante no gênero, e apresentaram citotoxicidade frente a diversas linhagens celulares cancerígenas como a de pulmão, cólon e leucemia, (CHEN et al., 2011; COSTA, 2009b; COSTA et al., 2010, 2013b; CUSTÓDIO; VEIGA JUNIOR, 2014; FAGUNDES, 2005; FALCÃO et al., 2008; GUINAUDEAU; LEBŒUF; CAVÉ, 1988; LI et al., 2013; LÚCIO et al., 2015; STÉVIGNY; BAILLY; QUETIN-LECLERCQ, 2005; SURESH; SHIVAKUMAR; SHIVAKUMAR, 2012; YADAV et al., 2011).

Estudos realizados por Suresh et al. (2012) para investigar o potencial antiproliferativo de *A. reticulata* revelaram que os alcaloides aporfínicos liriodenina, norushinsunina, reticulina e a acetogenina neoannonina, isolados a partir das raízes, testados contra linhagens tumorais humanas cervical (HeLa), carcinoma de pulmão (A-549), leucemia mieloide crônica (K-562), adenocarcinoma mamário (MDA-MB) e células não neoplásicas, demonstraram elevada citotoxicidade concentração-dependente contra todas as linhagens tumorais testadas, com destaque para neoannonina, com CI_{50} variando de 5,8-6,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em relação às tumorais, o efeito de todos os compostos nas células não neoplásicas foi, simultaneamente, inferior.

Dos alcaloides aporfínicos testados, em norushinsunina [1], a presença de um grupo hidroxila em C-7, pode estar relacionada à sua ação pronunciada, enquanto a existência de duas hidroxilas adjacentes ao anel tetrahydrofurânico, na acetogenina neoannonina [2], pode ser responsável por elevada atividade, como pode ser visto na figura a seguir.

Figura 8 - Alcaloide norushinsunina e acetogenina neoannonina

Fonte: Autora (2021)

Estudo realizado por Silva et al. (2018), para avaliar o efeito antineoplásico do extrato bruto e partições derivadas de *A. crassiflora* nas linhas celulares de câncer cervical, os resultados revelaram que o extrato bruto, e principalmente sua partição hexânica, alteram significativamente a viabilidade celular, a proliferação e a migração, e induzem a morte celular por via intrínseca nas linhas celulares de câncer de colo de útero. Além disso, a partição hexânica exibe ainda efeito antitumoral *in vivo* em células de câncer cervical.

Em investigação sobre efeito antidiabético, o extrato etanólico de *A. cherimola* administrado na dose de 300 mg/Kg em ratos anti-hiperglicêmicos induzidos por aloxana, exibiu efeito ao diminuir o nível de glicose no sangue 331,5 mg/dL para 149,2 mg/dL após 4h de administração, em comparação com a acarbose (151,3 mg/dL), um inibidor da α -glucosidase (CALZADA et al., 2017).

Em relação à ação antioxidante, extrato etanólico da espécie *A. muricata* mostrou atividade com eliminação máxima (90,05%) a 500,0 μ g/mL pelo método de ABTS, seguida por eliminação de radical hidroxila (85,88%) e eliminação de óxido nítrico (72,60%), e ação moderada para o ensaio de peroxidação lipídica (BASKAR; RAJESWARI; KUMAR, 2007). Outro estudo com a espécie relatou, pela primeira vez, amplo espectro de ação antimicrobiana, sendo as membranas bacterianas caracterizadas como alvos primários dos compostos bioativos. Os alcalóides anonaina, asimilobina, coripalmina, lirioderina, nornuciferina, xilopina e reticulina foram destacados como prováveis responsáveis, pelo menos em parte, pelas bioatividades relatadas no estudo (PINTO et al., 2017).

Na investigação da toxicidade aguda do extrato aquoso das folhas de *A. reticulata* em camundongos, nenhuma mortalidade, toxicidade e mudanças no comportamento foram

observadas com 2.000 mg/Kg de peso corporal. Também não houve elevações significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue. O exame histopatológico revelou arquitetura normal do fígado, rim e pâncreas, sem efeito adverso significativo observado nesses órgãos; indicando, portanto, a segurança da administração oral do extrato a 2.000 mg/Kg de peso corporal, podendo ser utilizado em formulações nutracêuticas (SHIVANNA; SARJAN; UROOJ, 2019).

Diante das amplas propriedades farmacológicas de espécies de *Annona*, faz-se então necessário a intensificação dos estudos relacionados ao gênero, possibilitando, dessa forma, a descoberta futura de novas moléculas que possam ser utilizadas na elaboração de fármacos potenciais para diversas patologias, tendo em vista a importância do desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes, viáveis economicamente e com menores efeitos colaterais.

4 METODOLOGIA

4.1 Procedimentos Fitoquímicos

4.1.1 Coleta do material vegetal

Cascas do caule de *Annona tomentosa* foram coletadas no dia 26 de setembro de 2020, no povoado de Morro Grande, sob as coordenadas 03°32'06.0" S e 043°56'48.7" W, localizado no município de Vargem Grande, Maranhão, Brasil. A planta foi identificada no Herbário Rosa Mochel da Universidade Estadual do Maranhão, pela professora Ana Maria Maciel Leite. A exsicata encontra-se depositada pelo 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.

4.1.2 Preparo do extrato

O material vegetal foi seco em estufa a 40 °C por 72 h e triturado em moinho de facas, em malha de 1,0 mm. O pó obtido (1350,0 g) foi submetido a um processo de extração com metanol (3800,0 mL) pelo método de maceração. Inicialmente, a extração da amostra foi mantida por 1 semana. Posteriormente, a renovação de solvente foi realizada mais duas vezes, a cada 72 h. O solvente foi evaporado do extrato através da pressão reduzida e temperatura controlada (40-50 °C), e reutilizado a cada etapa da maceração. Ao término do processo, o resíduo vegetal da extração foi descartado. A amostra obtida foi liofilizada para completa remoção do solvente. O extrato metanólico apresentou, então, massa igual a 273,36 g.

4.1.3 Partição líquido-líquido do extrato

4.1.3.1 Fração acetato de etila

A fração acetato de etila foi obtida a partir da dissolução de 20,0 g do extrato metanólico em água/metanol (7:3) (200,0 mL) e partição com acetato de etila (100,0 mL), após 5 extrações, com intervalo de 24 h cada. Em seguida, a fração acetato foi submetida ao processo de secagem para remoção do solvente. Após a completa secagem, a fração apresentou massa igual a 4,0 g.

4.1.3.2 Extração ácido-base (Fração alcaloídica)

O extrato metanólico (20,0 g) foi dissolvido em água/metanol (7:3) (100,0 mL) e acidificado com solução de HCl 37 % até pH 2. A solução obtida foi particionada com éter (100,0 mL). A fase aquosa remanescente contendo a massa do extrato foi basificada até pH 11 com solução de NH₄OH e particionada com CHCl₃. A fase clorofórmica (alcaloídica) foi concentrada em evaporador rotativo e liofilizada para remoção de solventes. A fração apresentou massa de 0,860 g. Para confirmação da presença de alcaloides, foi realizada a

cromatografia em camada delgada com sistema de eluição diclorometano/metanol (DCM/MeOH) (9:1), utilizando como reveladores o reagente de Dragendorff e a luz UV (254 nm) (MATOS, 1997).

4.2 Perfil cromatográfico e identificação dos constituintes químicos de *Annona tomentosa*

4.2.1 HPLC-PDA

O extrato bruto e as frações acetato de etila e alcaloídica de *Annona tomentosa* foram analisadas por HPLC-PDA. Foi realizada uma etapa de limpeza para remover quaisquer contaminantes. As soluções das amostras (10 mg/mL, 1 mL) passaram por uma extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Phenomenex Strata C18 (500,0 mg de fase estacionária) previamente ativados com 5,0 mL de MeOH e seguida equilibrados com 5,0 mL de MeOH:H₂O (1:1, v/v). As amostras foram então filtradas através de um filtro PTFE de 0,22 µm e secas, posteriormente. O extrato e as frações secas foram dissolvidos na concentração de 10,0 mg/mL em solvente metanol grau HPLC. Aliquotas de 20,0 µL foram injetadas diretamente no HPLC-PDA com detecção a 270 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 UV-Vis (SPA-10A). A coluna utilizada foi Luna 5,0 µm C18 100 A (150,0 µm x 4,6 µm). Os solventes de eluição foram A (ácido acético a 2% em água) e B (metanol). O extrato foi eluído de acordo com o seguinte gradiente: 2% a 100% de B em 35 minutos e as frações no gradiente de: 5% a 100% de B em 70 minutos. O fluxo foi de 1 mL/min, a temperatura da coluna foi de 20 °C. O volume de injeção das amostras foi de 20,0 µL. Os dados foram processados no software *LC Solution* (Shimadzu).

4.2.2 HPLC-ESI-IT/MS

O extrato bruto foi analisado usando um sistema de cromatografia líquida Shimadzu com controlador CBM-20A, bombas LC-30AD, detector SPD-20A, forno CTO-20A e autoinjeter SIL 30AC. A separação por HPLC foi realizada utilizando coluna cromatográfica Phenomenex Luna C18 com poros de 5,0 µm, e dimensões de 250,0 x 4,6 mm. A fase móvel utilizada consistiu em água (A) e metanol (B), em gradiente exploratório, iniciando com 2% a 100% de B em 70 minutos, em um fluxo de 1,0 mL/min.

O cromatógrafo líquido foi acoplado a um espectrômetro de massas (Amazon Speed ETD – Bruker) equipado com ionização por eletrospray (ESI) e analisador íon-trap (IT). Os modos negativos e o positivo foram usados para a geração e análise dos espectros do extrato.

As condições experimentais foram: pressão do nebulizador, 30,0 Psi; fluxo de gás de arraste, 12,0 L/min; temperatura capilar, 300 °C e voltagem do capilar, 4500 V. O intervalo de aquisição foi de m/z 100-2000. O software *DataAnalysisView* versão 5.3 foi usado para adquirir e processar os dados.

4.3 Ensaios biológicos

4.3.1 Ensaios *in vitro*

4.3.1.1 Avaliação do potencial antioxidante de *A. tomentosa*

4.3.1.1.1 Método do sequestro do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O método do sequestro do radical livre DPPH• foi realizado de acordo com a metodologia de Sánchez-Moreno; Larrauri; Saura-Calixto, 1999, com alterações. Uma solução metanólica de DPPH (40 µg/mL) foi preparada. Em seguida, em uma microplaca de 96 poços, foram misturadas alíquotas de 190 µL da solução de DPPH à 10 µL das soluções do extrato, fração acetato e também do padrão de Quercetina, ambos nas concentrações finais de 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL. As leituras foram realizadas em 517 nm, utilizando metanol como branco. O tempo de reação adotado foi de 30 minutos. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left[\frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \right] \times 100$$

A = absorbância

Os valores de CI_{50} foram determinados por regressão não linear com o programa *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão das médias com experimentos realizados em triplicata.

4.3.1.1.2 Método do sequestro do radical livre ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

A avaliação do potencial antioxidante utilizando o reagente ABTS foi feita segundo Re et al., 1999, com modificações. O reagente foi dissolvido em água até a concentração 7 mMol·L⁻¹. Esta foi então misturada a uma solução de persulfato de potássio (concentração final 2,45 mMol·L⁻¹). A mistura foi mantida em frasco âmbar e ambiente escuro por 16 horas antes do ensaio para a completa oxidação do ABTS e geração do cromóforo ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), um cátion radicalar de alta estabilidade. A solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol absoluto até a absorbância atingir o valor de 0,7 ± 0,02. As amostras foram solubilizadas e diluídas com etanol nas concentrações finais de 0,625; 1,25;

2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL. As leituras foram realizadas em microplaca no comprimento de 734 nm, utilizando volumes fixos de 10,0 µL do extrato, fração acetato e do padrão de Quercetina, e 190,0 µL de solução radicalar. O tempo de reação adotado foi de 30 minutos. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left[\frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \right] \times 100$$

A = absorbância

Os valores de CI₅₀ foram determinados por regressão não linear com o programa *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão das médias com experimentos realizados em triplicata.

4.3.1.2 Avaliação da capacidade de inibição enzimática de α-glicosidase

A atividade da enzima α-glicosidase foi determinada de acordo com Nishioka et al. (1998) com pequenas modificações. Utilizou-se volumes fixos de 20,0 µL das amostras vegetais (EM-AT, FAC-AT e FA-AT), nas concentrações crescentes de 0,82–52,63 µg/mL, e do controle positivo Acarbose, na concentração de 10,0 mg/mL. As microplacas foram incubadas com a enzima α-glicosidase (0,3 U/mL-20,0 µL), em 50,0 µL de tampão fosfato de sódio 67,0 mM (pH 6,8), por 20 minutos a 37 °C. Após o período de incubação, a solução de *p*-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo (substrato 10mM) foi adicionada (50,0 µL) e as microplacas reincubadas por 30 minutos. A reação foi terminada pela adição de 50,0 µL de Na₂CO₃(carbonato de sódio 100,0 mM) e a absorbância lida em 405 nm. O experimento foi realizado em triplicata e o valor de CI₅₀ foi determinado por regressão não linear com o programa *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4.3.1.3 Avaliação do potencial antimicrobiano de *A. tomentosa*

4.3.1.3.1 Microrganismos

Cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC[®]25923[™]), *Escherichia coli* (ATCC[®]25922[™]) e *Candida albicans* (ATCC[®]10231[™]) foram fornecidas pelo Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão. Os isolados bacterianos foram ativados em Caldo BHI (CBHI, Merck[®], Brasil), e a levedura em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD, Merck[®], Brasil), sendo submetidos ao crescimento em estufa microbiológica a 37 °C por 24 horas. Após a confirmação do crescimento, os isolados bacterianos foram reativados em Ágar BHI (ABHI, Kasvi[®], Brasil) e a levedura em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD, Kasvi[®], Brasil),

incubados a 37°C por 24 horas, e as colônias isoladas obtidas foram utilizadas para os posteriores testes.

4.3.1.3.2 Ensaio de ágar difusão em poços

A metodologia utilizada foi realizada segundo Kalidindi et al. (2015) e Dev et al., 2019, com algumas adaptações. Os isolados microbianos descritos no *Item 4.3.1.3.1* (p.33) foram suspensos em solução salina estéril (NaCl a 0,9%) e a turbidez ajustada visualmente com o auxílio da escala 0,5 de McFarland, correspondendo a 10^8 UFC/mL. Em seguida, a densidade celular foi determinada com o auxílio de um espectrofotômetro, em 530 nm.

As suspensões bacterianas padronizadas foram transferidas com um auxílio de um swab estéril para placas de Petri (diâmetro) contendo Ágar Muller Hinton (AMH, Kasvi®, Brasil), e a levedura, para placas contendo ASD. Espalhou-se todo o conteúdo em três sentidos diferentes em todo o ágar. Posteriormente, usando cilindros de vidro estéril com o diâmetro de 6,0 mm, foram feitos poços determinados para as posteriores adições de 100,0 µL das diferentes concentrações do EM-AT, FAC-AT e FA-AT (100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,25 e 3,125 µg/mL). O controle positivo foi o antibiótico Imipenem (IMP) (200,0 µg/mL), o antifúngico Fluconazol (FLZ) (128,0 µg/mL) e o DMSO 1% (controle negativo). Após as substâncias teste fundirem ao ágar, as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas. A presença das zonas de inibição foi analisada e as medidas feitas com o auxílio de um paquímetro. O teste foi realizado em triplicata e os diâmetros dos halos de inibição foram expressos em média e desvio padrão.

4.3.1.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀)

O método de microdiluição em microplacas estéreis de 96 poços de fundo plano foi seguido segundo as normas M7-A11 para testes em bactérias e M27-A2 destinadas a leveduras. Ambas as normas se encontram descritas pela Clinical and Laboratory Standards Institute, com algumas adaptações (CLSI, 2012; CLSI, 2018).

Após as bactérias serem reativadas em caldo BHI, elas foram semeadas em ABHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram suspensas em solução salina e o inóculo ajustado, obedecendo a escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL). Para a levedura, utilizou-se o meio ASD e incubação por 24h a 37°C. Logo após, as colônias foram suspensas em 5,0 mL de solução salina estéril 0,85% (0,145 mol/L; 8,5 g/L NaCl). A suspensão resultante foi homogeneizada (Vortex®) durante 15 segundos. Posteriormente, a turbidez foi ajustada visualmente com o auxílio da escala 0,5 de McFarland, correspondendo aproximadamente a 10^6 UFC/mL. Em seguida, a densidade celular foi determinada com o auxílio de um espectrofotômetro, em 530 nm. Para a determinação da CIM₉₀, os isolados bacterianos foram

adicionados nas placas em um volume de 10,0 µL de suspensão bacteriana junto ao Caldo Mueller Hinton (CMH, Merck®, Brasil) (190,0 µg/poço), contendo diferentes concentrações do EM-AT, FAC-AT e FA-AT (100,0 – 3,125 µg/mL) e do controle positivo IMP (50,0 – 0,0488 µg/mL). O solvente dimetilsulfóxido estéril (DMSO, Sigma-Aldrich; 1% em solução salina) foi usado para aumentar a solubilidade das amostras testadas e como negativo ao controle. Para levedura, empregou-se aos poços da microplaca 100,0 µL do inóculo padrão junto ao meio RPMI-1640-MOPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (100 µL/poço). Logo após, foram adicionados os diferentes tratamentos das concentrações testes e controle negativo citados, e, como controle positivo, usou-se o antifúngico Fluconazol (128,0 – 0,125 µg/mL).

As placas foram mantidas em temperatura de 37°C por 24 e 48 horas. Após este período, a CIM₉₀ foi determinada como a concentração mais baixa que inibiu o crescimento visual microbiano. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores expressos em média e desvio padrão correspondendo a dois experimentos independentes.

4.3.1.3.4 Ensaio do biofilme microbiano

4.3.1.3.4.1. Efeito das amostras vegetais na formação do biofilme bacteriano

Para a determinação dos efeitos das amostras vegetais (EM-AT e FAC-AT) e droga padrão (Imipenem) na formação do biofilme bacteriano, seguiu-se o protocolo descrito por Ferro et al. (2016), com algumas adaptações. Para isso, 10,0 µL da suspensão bacteriana, descrito de acordo com o *Item 4.3.1.3.2* (p. 34), foram adicionados em microplacas de 96 poços contendo concentrações sub e suprainibitórias (1/2CIM₉₀, CIM₉₀, 2×CIM₉₀ e 4×CIM₉₀) em 190,0 µL de CMH. O tratamento com o veículo DMSO 1% em solução salina em CMH foi determinado como controle negativo do teste. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e, em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS estéril. Logo após, as amostras foram então fixadas com 200,0 µL de metanol (100%; Merck Millipore) por 15 min. Em seguida, o metanol foi removido e os poços da placa deixados secar ao ar. O biofilme foi corado com 5% de cristal violeta (CV) (Sigma-Aldrich) por 10 minutos em temperatura ambiente, e imediatamente solubilizado com metanol (200,0 µL). A absorbância foi lida a 570 nm utilizando leitor de placa (SPECTRAMax- PLUS384 Molecular Devices, Inc, EUA).

4.3.1.3.4.2. Efeito das amostras vegetais na formação do biofilme fúngico

O ensaio do biofilme está descrito de acordo com Jin et al. (2004); Yan et al. (2019), com algumas adaptações. O biofilme *Candida albicans* foi tratado com as concentrações encontradas em (1/2CIM₉₀, CIM₉₀, 2×CIM₉₀ e 4×CIM₉₀) das amostras vegetais (EM-AT, FAC-AT e FA-AT) e do padrão (Fluconazol), sendo utilizado DMSO 1% como controle negativo.

Inicialmente, foi preparada uma suspensão padronizada da levedura correspondendo a 10^6 UFC/mL, em YNB estéril contendo 100,0 mM de glicose. Em seguida, as placas foram acondicionadas em estufa microbiológica durante 90 minutos, em temperatura de 37°C para efetuação da adesão celular. Logo após, realizou-se duas lavagens utilizando PBS estéril. Os poços foram então preenchidos com 100,0 µL de meio YNB estéril, contendo 100,0 mM de glicose junto à 100,0 µL das drogas teste, e as microplacas foram incubadas no período de 24 h a 37°C. A massa celular do biofilme foi quantificada utilizando o ensaio do CV, sendo adicionado 100,0 µL de solução de CV a 1% a cada poço teste, com incubação por 20 minutos a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada, cuidadosamente, três vezes com PBS estéril. Posteriormente, as células coradas com CV foram descoradas pela adição de 200,0 µL/poço de Etanol a 95%. Por fim, 100,0 µL de etanol foram transferidos para uma nova placa de microtitulação e a absorbância foi medida em 595 nm, usando leitor de placa (SPECTRAMax-PLUS384 Molecular Devices, Inc, EUA).

4.3.1.4 Avaliação da citotoxicidade de *A. tomentosa* sobre eritrócitos de carneiro

Para este ensaio foi utilizado sangue de carneiro (EB Farma, Rio de Janeiro, RJ, BR). Os eritrócitos foram isolados por centrifugação (Centrífuga 5810R, Eppendorf) a 2000 RPM por 10 minutos a 20°C. Após a remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados três vezes com PBS (pH=7,4), e em seguida foram ressuspensos a 10% (v/v) no mesmo tampão. Para avaliar a atividade hemolítica do EM-AT, FAC-AT e FA-AT, alíquotas de 100,0 µL da solução de eritrócitos foram adicionados ao fundo da microplaca de 96 poços em diferentes concentrações das amostras teste (1,0; 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 µg/mL).

A hemólise total foi obtida com Triton X-100 a 1% (Sigma-Aldrich), enquanto o PBS foi utilizado como controle negativo. Solução de DMSO 1% também foi utilizada como controle. Após a incubação por 60 minutos a 37°C, as células foram centrifugadas a 2000 RPM por 10 minutos, a 20°C. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para microplaca para leitura a 450 nm. A atividade hemolítica foi expressa em relação ao Triton X-100 e calculada pela equação:

$$\text{Atividade hemolítica relativa (\%)} = [(As - Ab).100]/(Ac - Ab)$$

Em que “Ab” corresponde a absorbância do controle (branco); “As”, a absorbância na presença da amostra e; “Ac”, a absorbância na presença de Triton X-100 (DA SILVA et al., 2016).

4.3.2 Ensaio *in vivo*

4.3.2.1 Avaliação da toxicidade aguda de *A. tomentosa* em modelo invertebrado (*Tenebrio molitor* L.)

4.3.2.1.1 Aquisição e manutenção das larvas de *T. molitor*

Para o processo de aquisição e manutenção, utilizou-se as metodologias empregadas por De Souza et al. (2015) e Navarro et al. (2019), com pequenas modificações. As larvas de *T. molitor* entre 10° e 12° estágio larval foram adquiridas comercialmente através de fornecedores especializados na venda de animais invertebrados e, posteriormente, mantidas no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão. As larvas foram acondicionadas em recipientes plásticos cobertos com tela ao abrigo da luz, contendo ração padronizada a base de farelo de trigo, milho e aveia na proporção de 2:2:2, com temperatura controlada ($29,01 \pm 0,62$ °C), e a umidade ($61,86 \pm 12,67$ %) mantida pela presença de um recipiente com água destilada.

Para a definição dos grupos teste, seguiu-se alguns critérios, sendo excluídas as larvas que apresentaram alterações em sua cor padrão, sem resposta ao toque e motilidade lenta. Incluiu-se apenas as larvas com padrões similares de peso, tamanho e aspecto morfológico saudável.

4.3.2.1.2 Ensaio da toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado como descrito por Wang et al. (2015) e Alves et al. (2019), com adaptações. Para a definição dos grupos teste foram selecionadas larvas em condições favoráveis como descrito no *Item 4.3.2.1.1* anterior. Foi estabelecido $n=10$ de larvas para cada grupo, que apresentaram pesos e tamanhos padronizados (Apêndice A).

A formação dos grupos foi determinada de acordo com as concentrações definidas para as amostras EM-AT, FAC-AT e FA-AT, variando de 1,0 – 100,0 µg/Kg, e controles (CTRL) para avaliação e validação do teste: SHAM – grupo controle que não recebeu nenhuma substância; CTRL MeOH, AcOEt e CHCl₃ – grupos controles de letalidade do solvente; CTRL Trauma – grupo que recebeu somente o trauma da injeção; CTRL PBS – grupo que recebeu PBS estéril e CTRL DMSO 1% - grupo que recebeu o solvente diluente do extrato e frações.

Para o procedimento das injeções agudas das substâncias teste, as larvas inicialmente foram submetidas à paralização por esfriamento em superfície de vidro com gelo, e, logo após, foram submetidas à desinfecção na porção ventral com álcool 70%, e com o auxílio de uma seringa analítica (Hamilton, Modified Microliter™) foram injetados 10,0 µL dos

diferentes tratamentos pela via intrahemocélica no quarto metâmero, na porção ventral das larvas.

Após o procedimento, as larvas foram transferidas para placas de Petri, destinadas aos referidos grupos, contendo ração padronizada, e incubadas ao abrigo da luz, em câmaras com temperatura e umidade favorável. A sobrevivência foi monitorada diariamente, durante 7 dias, e a morte das larvas foi avaliada através da resposta ao toque, sendo observado à falta de motilidade e a presença de melanização.

4.4 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e analisados por análise de variância (*ANOVA* one-way) seguido do teste de Tukey – Kramer (para três ou mais grupos) ou por teste t de Student (dois grupos). São considerados significativos os valores de $P < 0,05$. Todos os dados foram analisados com auxílio do programa *GraphPad Prism* versão 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do extrato bruto e frações

Os rendimentos do EM-AT, FAC-AT e FA-AT são apresentados na tabela a seguir.

Tabela 3 - Resultados das extrações para o extrato metanólico e frações

Amostra	Massa inicial (g)	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
EM-AT	1350,0	273,36	20,25
FAC-AT	20,0	4,0	20,0
FA-AT	20,0	0,860	4,3

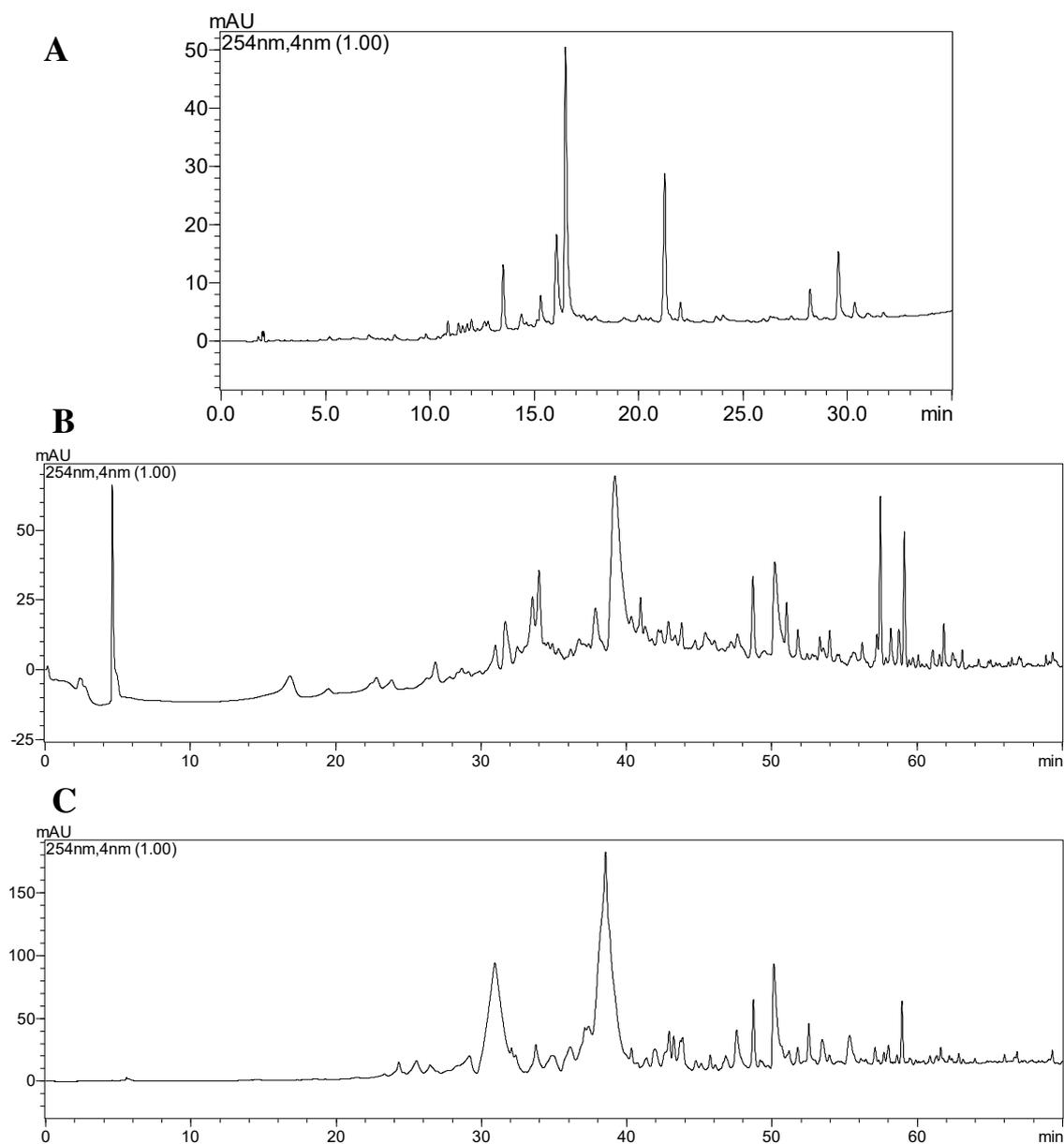
Fonte: Autora (2021)

Estudos anteriores realizados com *A. tomentosa* pelo nosso grupo mostraram que o extrato hidroetanólico 70% da espécie apresentou rendimento de 18,65% numa avaliação mais recente e 17% na primeira investigação, enquanto que a fração alcaloídica exibiu rendimento de 4,33%, similar ao obtido neste trabalho (MOTA, 2016; PINHEIRO, 2019). Para o extrato metanólico das folhas de *Annona crassiflora*, Melo (2017) obteve rendimento de 15,52% partindo de 1,3 Kg de material vegetal.

Logo, ressalta-se que os resultados obtidos são considerados satisfatórios, tendo em vista a proximidade dos valores, e que este trabalho não objetivou avaliar a fração aquosa, apenas as frações acetato e alcaloídica, e o extrato bruto.

5.2 Perfil cromatográfico e identificação das substâncias

Os perfis cromatográficos, obtidos por HPLC-PDA, do EM-AT, FAC-AT e FA-AT são mostrados na figura a seguir. Foram observadas bandas de absorção entre 200 – 385 nm para EM-AT, indicando a presença de compostos das classes dos flavonoides, taninos e derivados de ácidos fenólicos nas amostras. Os flavonoides, normalmente, são encontrados em 270 e 330 a 365 nm para flavonas e flavonóis, 290 nm para flavanonas, 236 ou 260 nm para isoflavonas, 340 a 360 nm para chalconas, e 210 ou 280 nm para catequinas (ANDERSEN; MARKHAM, 2005).

Figura 9 - Perfis cromatográficos do EM-AT (A), FAC-AT (B) e FA-AT (C) obtidos em 254 nm

Fonte: Autora (2021)

Verificou-se também a presença de alcaloides por meio da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), pela qual foi possível observar o aparecimento de manchas características dessas substâncias após revelação com reagente de Dragendorff, conforme mostra Figura 10 (p. 10).

Figura 10 - CCD da fração alcaloídica utilizando sistema de eluição DCM/MeOH (9:1)



Fonte: Autora (2019)

A partir dos espectros de primeira e segunda ordem obtidos por HPLC-ESI-IT/MS foi possível elucidar 11 compostos do EM-AT, sendo 2 alcaloides. Os dados adquiridos, como tempo de retenção, fragmentação e identificação, estão apresentados na Tabela 4 para os compostos identificados no modo negativo. As fragmentações foram comparadas com a literatura.

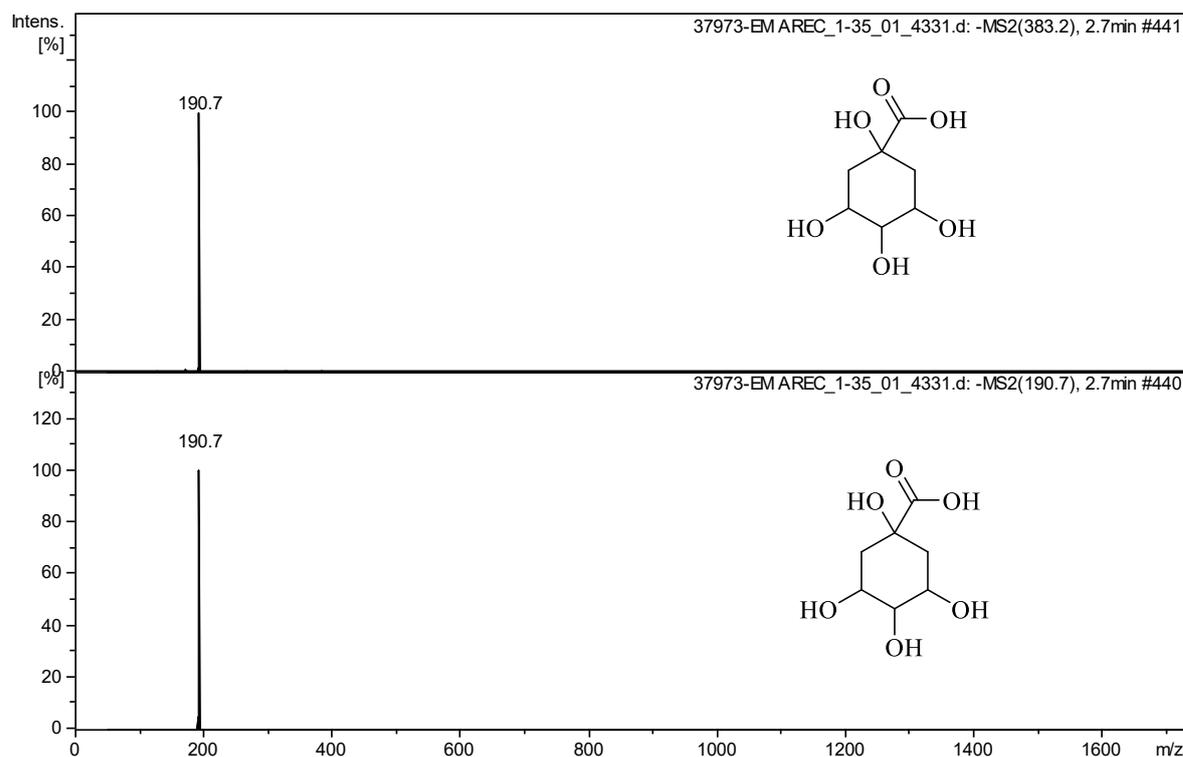
Tabela 4 - Compostos identificados do extrato metanólico (EM-AT) em modo de ionização negativo

Tempo de retenção (min)	[M-H] ⁻ /Íons fragmentos	Nome	Referências
2,7*	383 [2M-H] ⁻ ; 191 ; 191	dímero de ácido quínico	(CORREIA, 2016)
2,8	371 [M-H] ⁻ / 191 [M-H-180] ⁻	ácido cafeoilgalactárico	(MARTUCCI et al., 2014)
3,3 ^a	533 [M-H] ⁻ / 191 [2M-H-180] ⁻ ; 191 [2M-H-342] ⁻	derivado de ácido quínico	(SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2015)
3,5	683 [2M-H] ⁻ / 341 [2M-H-342] ⁻ 341 [M-H] ⁻ / 179 [M-H-162] ⁻	cafeoil glicosídeo	(NEGRI et al., 2016)
3,7	371 [M-H+18] ⁻ / 353 [M-H-18] ⁻ ; 191 [M-H-18-162] ⁻	hidrato de ácido clorogênico	(DARTORA et al., 2011)
12,7	577 [M-H] ⁻ / 559; 451; 425 [M-H-152] ⁻ ; 407; 289; 245 613 [M+Cl] ⁻ / 577 [M-H-Cl] ⁻	procianidina B1	(NUNES, 2016)
13,7	865 [M-H] ⁻ / 847; 739; 695 [M-H-170] ⁻ ; 577 [M-H-288] ⁻ ; 543; 407; 377; 287 577 [M-H-288] ⁻ / 559; 451; 425 [M-H-288-152] ⁻ ; 407; 289; 245	trímero de procianidina ou procianidina C1	(ENOMOTO et al., 2019; ROCKENBACH et al., 2012)
15,1	579 [2M-H] ⁻ / 561; 427; 289 [M-H-290] ⁻ ; 245 289 [M-H] ⁻ / 245 [M-H-44] ⁻ ; 205 325 [M+Cl] ⁻ / 289 [M-H-Cl] ⁻	catequina ou epicatequina	(ROCKENBACH et al., 2012)
22,0	303 [M-H] ⁻ / 285 [M-H-18] ⁻ ; 177 [M-H-126] ⁻ ; 125 607 [2M-H] ⁻ / 303 [2M-H-304] ⁻ ; 285 [2M-H-18-44] ⁻ ; 241; 177	taxifolina	(YANG et al., 2016)

Legenda: a = ambos não possuem absorção significativa nos comprimentos de ondas selecionados; * = não possui absorção significativa nos comprimentos de ondas monitorados.

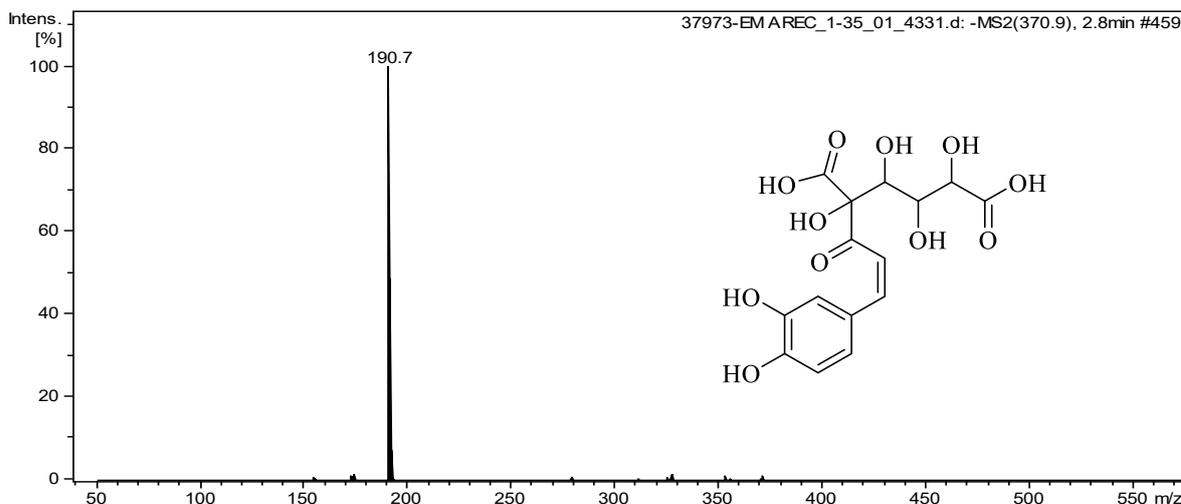
O pico em 2,7 min apresentou como íon molecular desprotonado o m/z 191 $[2M - H]^-$, correspondente ao ácido quínico ($C_7H_{11}O_6$). O composto foi então identificado como um dímero de ácido quínico ($C_{14}H_{23}O_{12}$) (Figura 11), m/z 383 $[2M - H]^-$, que formou como íon base o m/z 191, conforme relatado por Baskaran; Pullencheri; Somasundaram (2016).

Figura 11 - Espectro de massas referente à m/z 383 $[2M - H]^-$



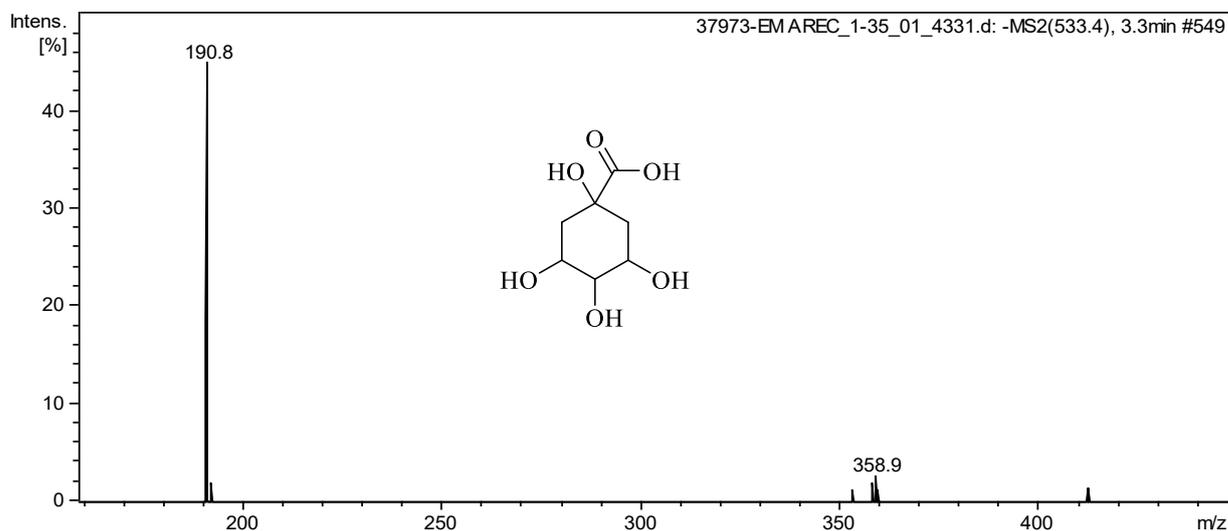
Fonte: Autora (2021)

Estudos reportam a presença de compostos fenólicos como: rutina, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido quínico e seus derivados, em extratos brutos da casca do araticum (*Annona tomentosa*) (JUSTINO et al., 2016; ROESLER et al., 2007). O modo de ionização negativo permitiu a identificação do composto ácido cafeoilgalactárico ($C_{15}H_{15}O_{11}$) (Figura 12), m/z 371 $[M - H]^-$. O espectro MS/MS mostrou um íon produto m/z 191, formado após a perda da unidade de ácido cafeico, característica do ácido galactárico.

Figura 12 - Espectro de massas referente à m/z 371 $[M-H]^-$ 

Fonte: Autora (2021)

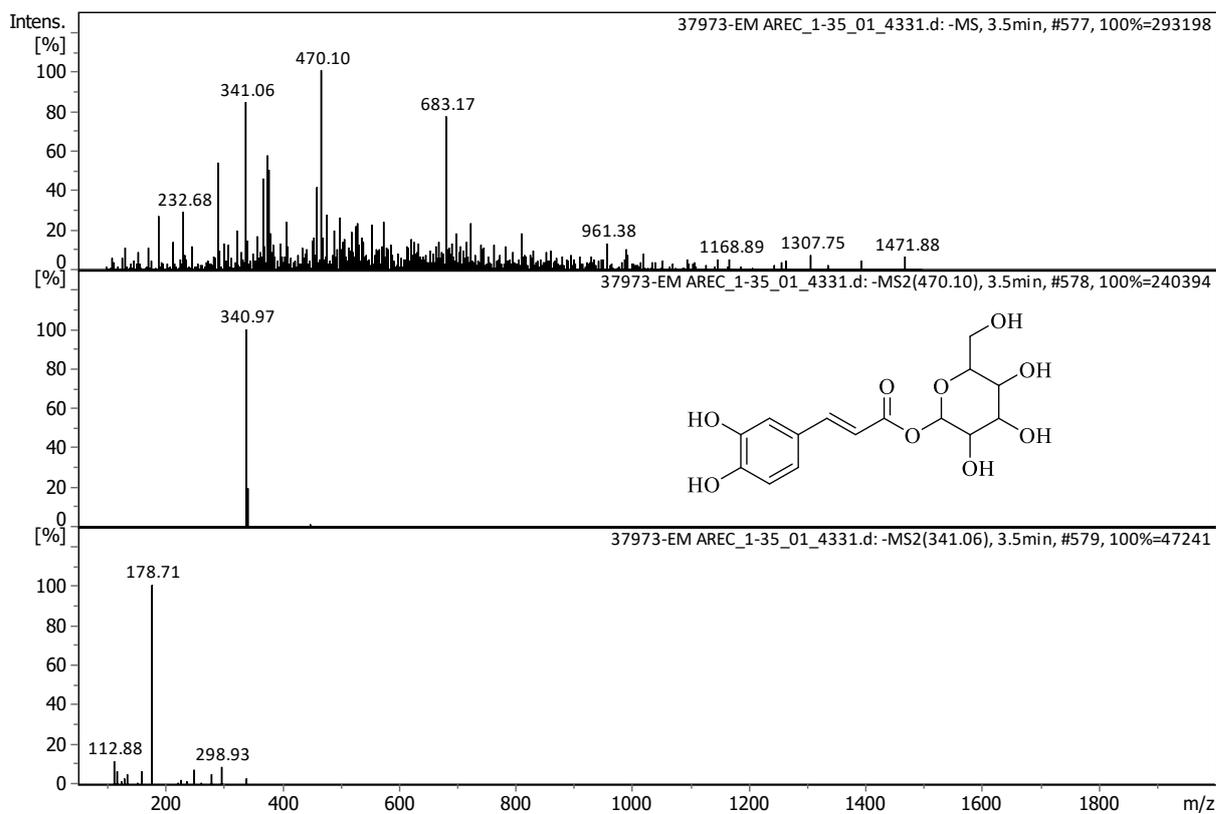
Foram elucidados em EM-AT, outros três compostos derivados de ácidos. O derivado de ácido quínico (Figura 13) exibiu m/z 533 e mostrou uma perda direta de 341 Da em MS^2 , produzindo um íon de fragmento de m/z 191. Devido ao padrão de fragmentação semelhante ao do ácido quínico, o composto foi caracterizado como um derivado do mesmo.

Figura 13 - Espectro de massas referente à m/z 533 $[M-H]^-$ 

Fonte: Autora (2021)

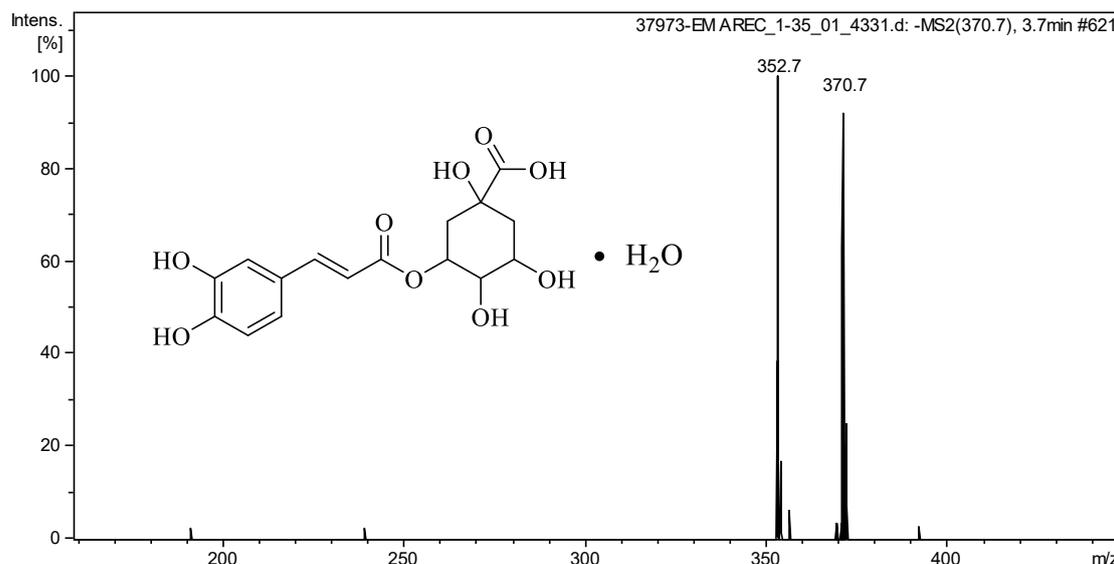
O espectro de massas obtido com m/z 683 $[2M-H]^-$ (Figura 14) apresentou o composto desprotonado em m/z 341, à qual foi atribuído a fórmula molecular $C_{15}H_{17}O_9$. Foi obtido também um íon fragmento com m/z 179, correspondente ao ácido cafeico desprotonado. De acordo com estes dados e mediante a literatura, a substância foi sugerida como cafeoil glicosídeo.

Figura 14 - Espectro de massas referente à m/z 683 $[2M-H]^-$



Fonte: Autora (2021)

Ácidos clorogênicos são constituídos por uma unidade de ácido quínico esterificada com uma de ácido cafeico. Seus derivados apresentam m/z 353 $[M-H]^-$ ($C_{16}H_{17}O_9$) como íon precursor no modo de ionização negativo, tendo padrão de fragmentação específico para cada substância (MARTUCCI et al., 2014). Assim, o composto de m/z 371 $[M-H+18]^-$ foi identificado como hidrato de ácido clorogênico (Figura 15); pois, sem o acréscimo de 18 Da, apresenta m/z 353, exibindo ainda íon produto característico de m/z 191 (ácido quínico).

Figura 15 - Espectro de massas referente à m/z 371 $[M-H+18]^-$ 

Fonte: Autora (2021)

As proantocianidinas, conhecidas também como taninos condensados ou procianidinas, constituídas de forma exclusiva por catequina e/ou epicatequina, foram identificadas em EM-AT. Foi possível observar padrões de fragmentação típicos de proantocianidinas após reações de quinona metídeo (QM), retro-Diels-Alder (RDA) e fissão heterocíclica do anel (HRF).

O íon molecular m/z 577 corresponde à procianidina B1 (dímero de procianidina) (Figura 16), em conformidade com a fórmula molecular $C_{30}H_{25}O_{12}$, proveniente da reação QM. Observou-se a formação de aducto com cloro em m/z 613 $[M+Cl]^-/577 [M-H-Cl]^-$. O íon produto m/z 425 foi observado após a reação RDA. A reação HRF também foi observada, gerando m/z 451. Outra reação QM com o dímero formou uma só quinona, resultando no fragmento m/z 289.

Para m/z 865, o padrão de fragmentação se mostrou similar ao da procianidina C1 (trímero de procianidina) (Figura 17 e 18), equivalente à fórmula molecular $C_{45}H_{37}O_{18}$. O íon produto m/z 713 gerado, corresponde à reação RDA em uma unidade de catequina (-152 Da) e, m/z 695, à perda de uma molécula de água (-18 Da). O íon m/z 739 foi produzido pela reação HRF da unidade catequina (-126 Da). Após reação RDA de m/z 577, foram observados os íons m/z 425, que originou m/z 407, proveniente da perda de uma molécula de água (-18 Da). A reação HRF gerou o íon em m/z 451. Por fim, uma reação QM resultou em dois fragmentos de m/z 289 e 287. A proposta do mecanismo de fragmentação para procianidinas é apresentada no Esquema 1.

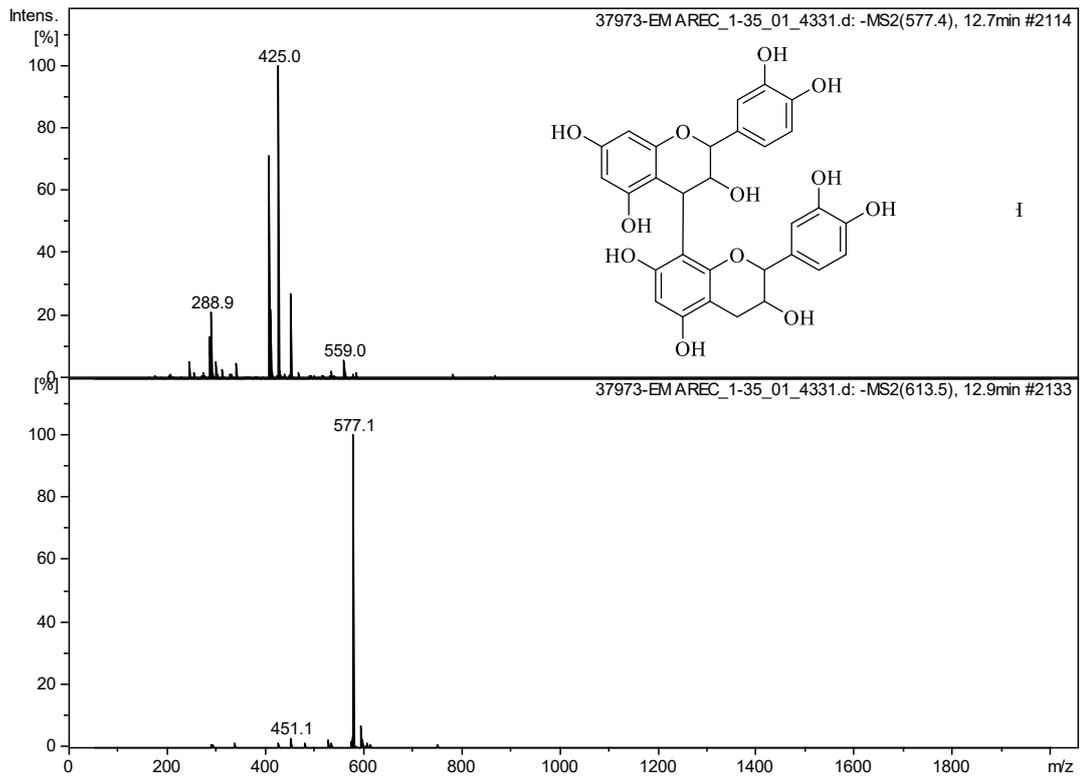
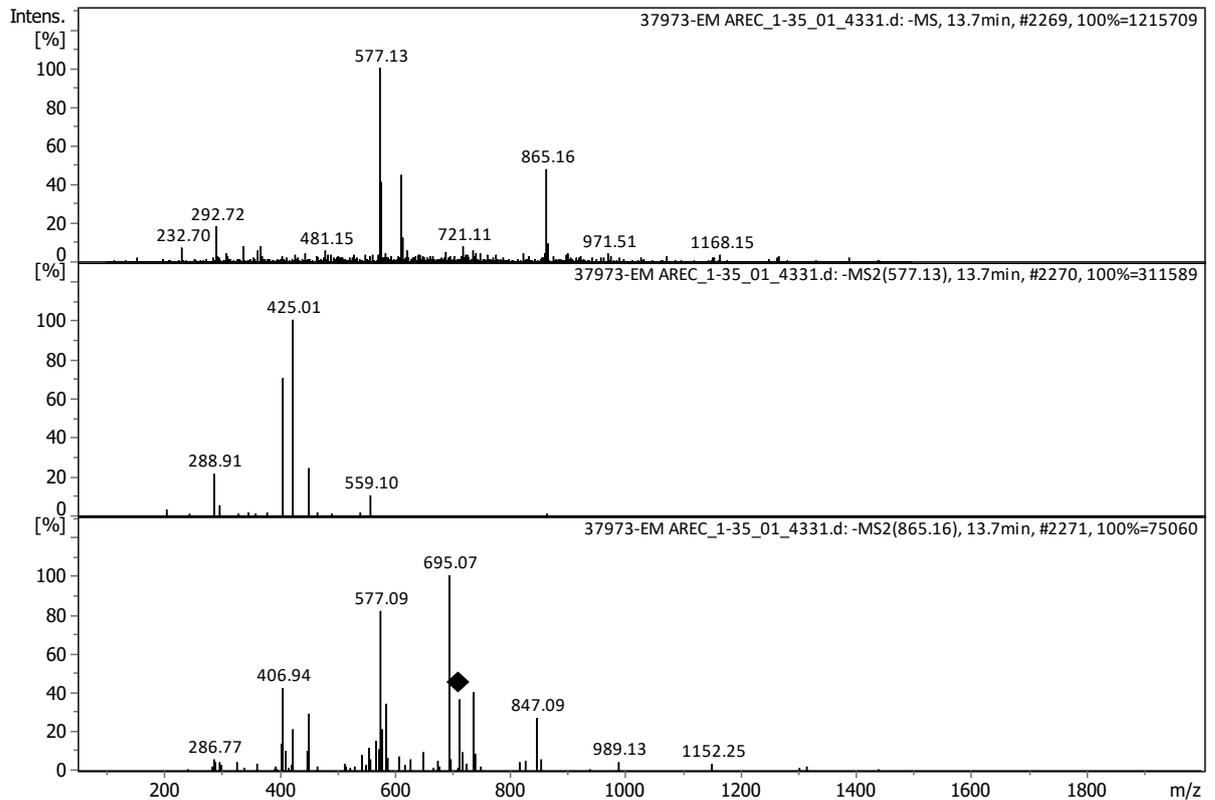
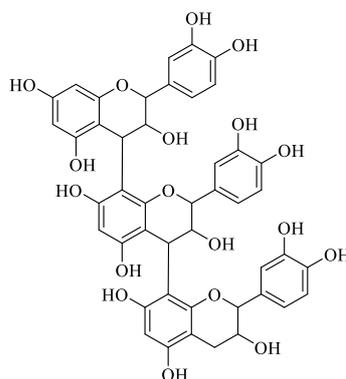
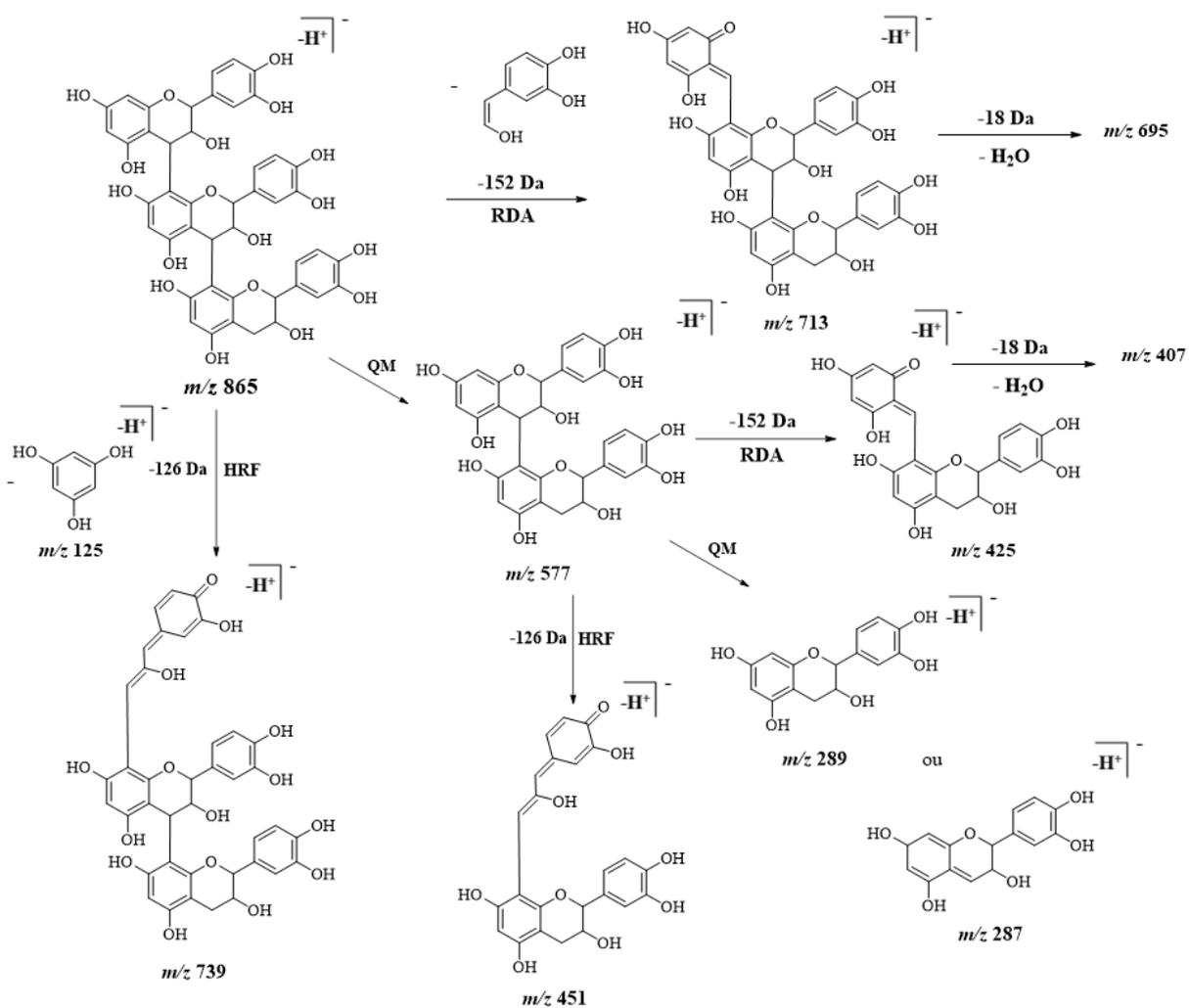
Figura 16 - Espectro de massas referente à m/z 577 $[M-H-Cl]^-$ **Figura 17** - Espectro de massas referente à m/z 865 $[M-H]^-$ 

Figura 18 - Trímero de procianidina elucidado do extrato metanólico (EM-AT) de *Annona tomentosa*



Fonte: Autora (2021)

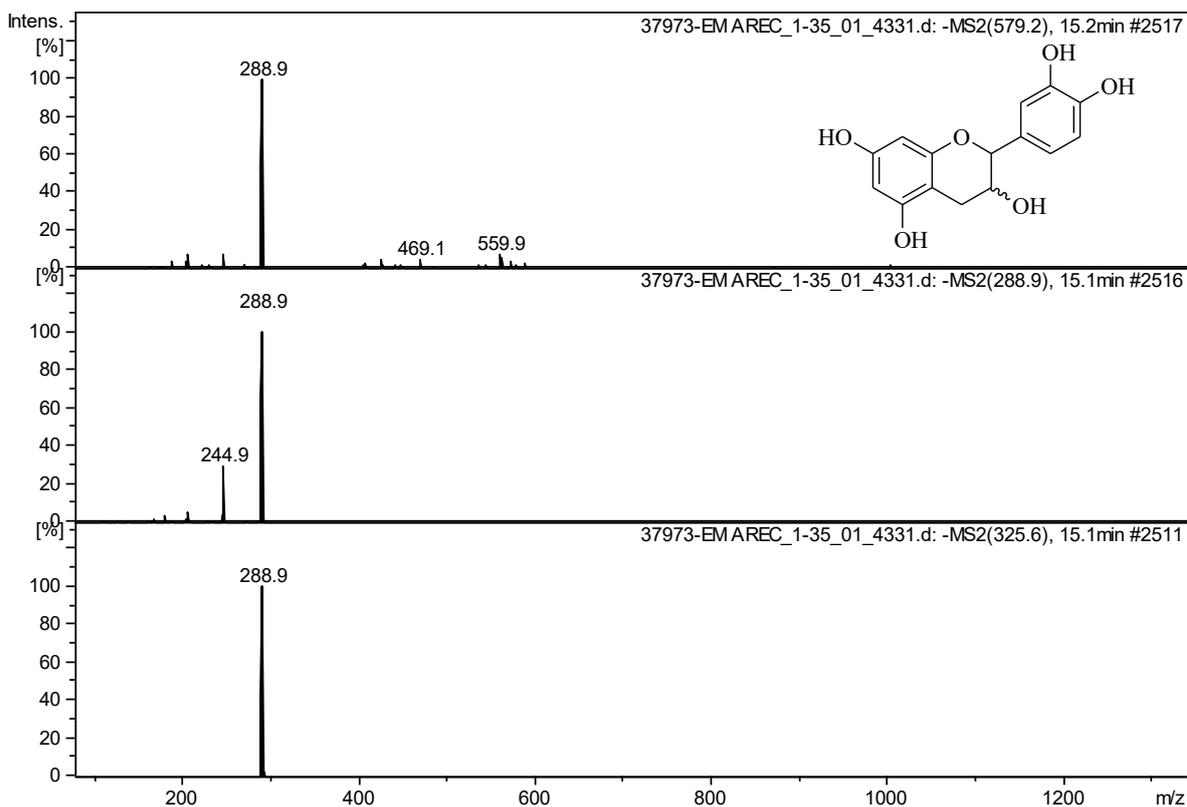
Esquema 1 – Proposta de mecanismo de fragmentação para procianidinas elucidadas do EM-AT



Fonte: Autora (2021)

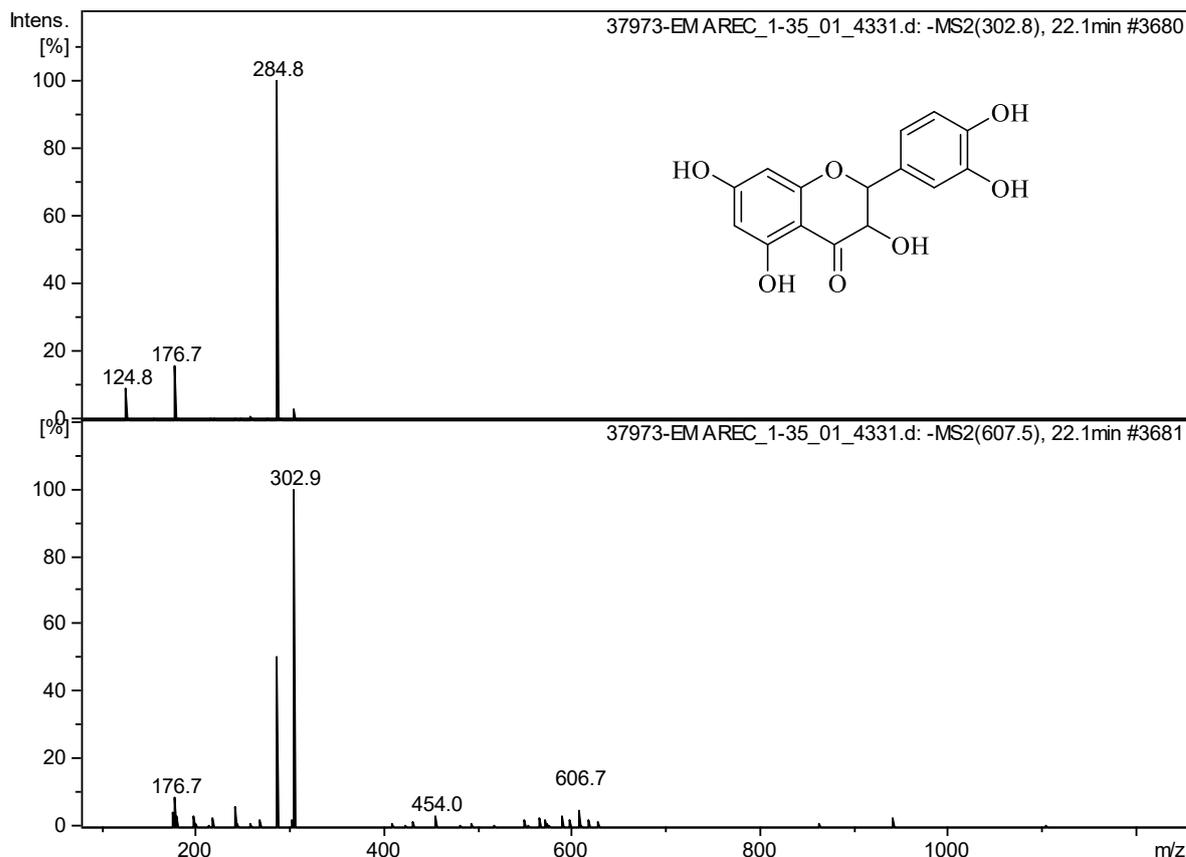
Observou-se a presença do monômero de procianidinas. Catequina ou epicatequina (Figura 19), referente à fórmula química $C_{15}H_{13}O_6$, (m/z 289 $[M-H]^-$) foram identificadas com fragmentos característicos de MS^2 com m/z 245, indicando a perda de CO_2 e m/z 205, sugerindo a clivagem do anel A de flavan-3-ol.

Figura 19 - Espectro de massas referente à m/z 289 $[M-H]^-$



Fonte: Autora (2021)

A taxifolina (Figura 20), outro membro da família dos flavonoides, também foi identificada em EM-AT. O íon molecular m/z 303 $[M-H]^-$, está em conformidade com a fórmula molecular $C_{15}H_{11}O_7$. O espectro de massas indicou um padrão de fragmentação semelhante ao descrito na literatura, com eliminação de H_2O (m/z 303 \rightarrow 285) e clivagem no anel C através de reação RDA (m/z 285 \rightarrow 177).

Figura 20 - Espectro de massas referente à m/z 303 $[M-H]^-$ 

Fonte: Autora (2021)

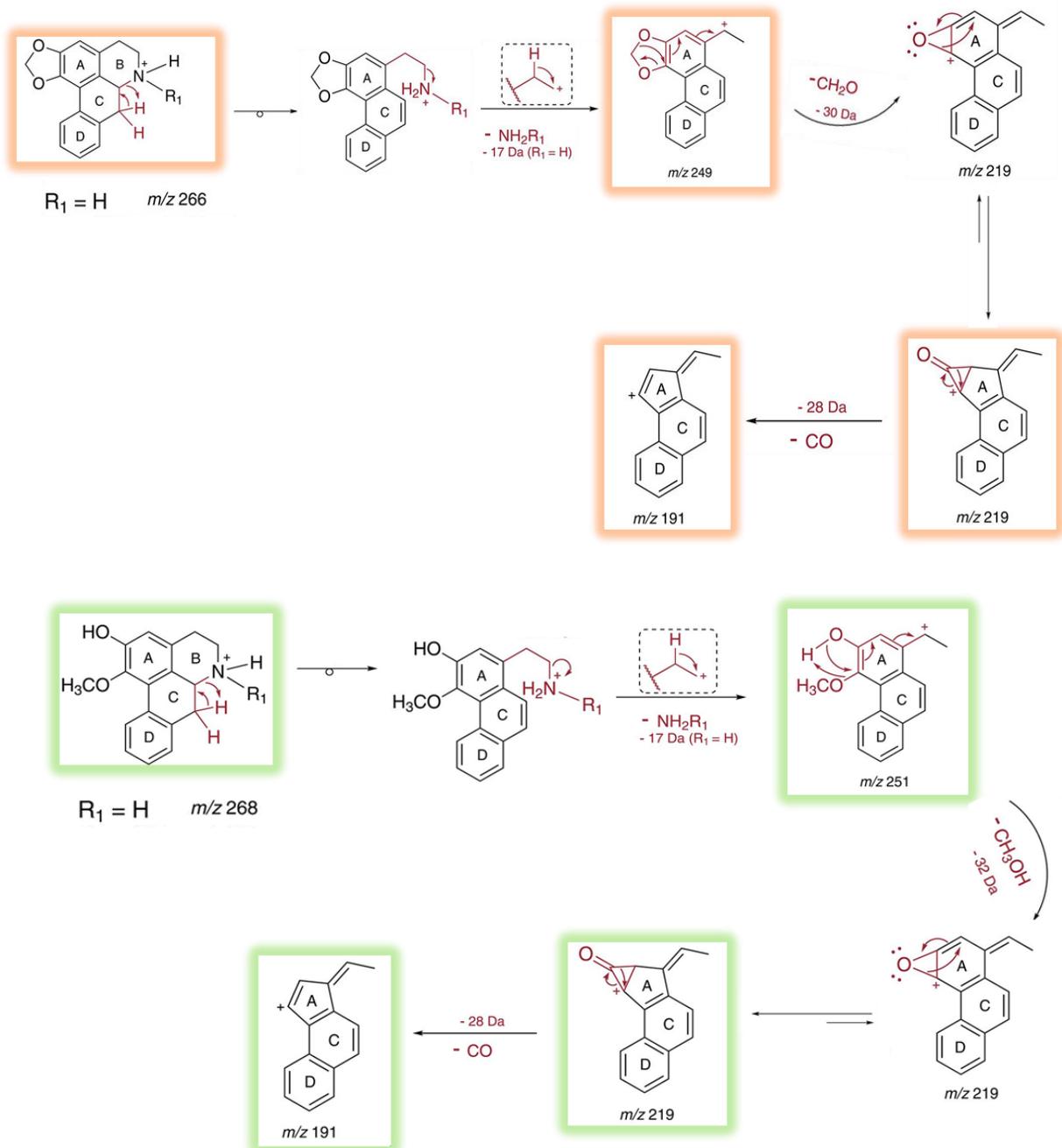
A análise de fragmentação foi feita também em modo positivo para elucidação de alcaloides (Tabela 5). Observou-se para anonaina (Figura 21), m/z 266 $[M+H]^+$, os fragmentos m/z 249, m/z 219 e m/z 191, representando a perda inicial do grupo amina e dos grupos CH_2O e CO . Para assimilobina (Figura 22), m/z 268 $[M+H]^+$, verificou-se as fragmentações m/z 251, m/z 219 e m/z 191, indicando perda de NH_3 , CH_3OH e CO , respectivamente. Essas fragmentações mostraram-se semelhantes ao estudo anterior para o extrato hidroetanólico da espécie realizado por nosso grupo (PINHEIRO, 2019). Os mecanismos de fragmentação (Esquema 2) foram propostos para estes alcaloides, que são substâncias de destaque em espécies da família Annonaceae, considerados marcadores quimiotaxonômicos.

Tabela 5 - Alcaloides aporfínicos identificados no extrato metanólico (EM-AT) de *Annona tomentosa* com as principais fragmentações observadas

Composto	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴
Anonaina	266	249	219	191
Asimilobina	268	251	219	191

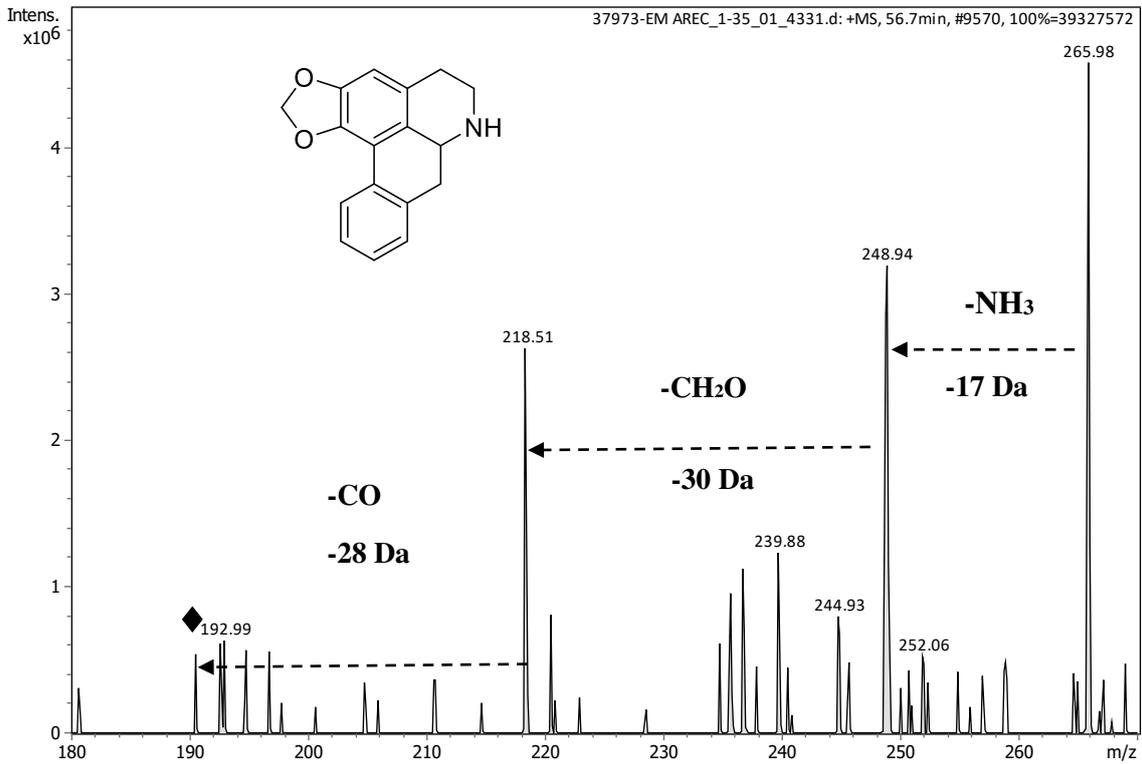
Fonte: Autora (2021)

Esquema 2 – Propostas mecânicas de fragmentação para os alcaloides anonaina (*m/z* 266) e asimilobina (*m/z* 268) do extrato metanólico (EM-AT) de *Annona tomentosa*



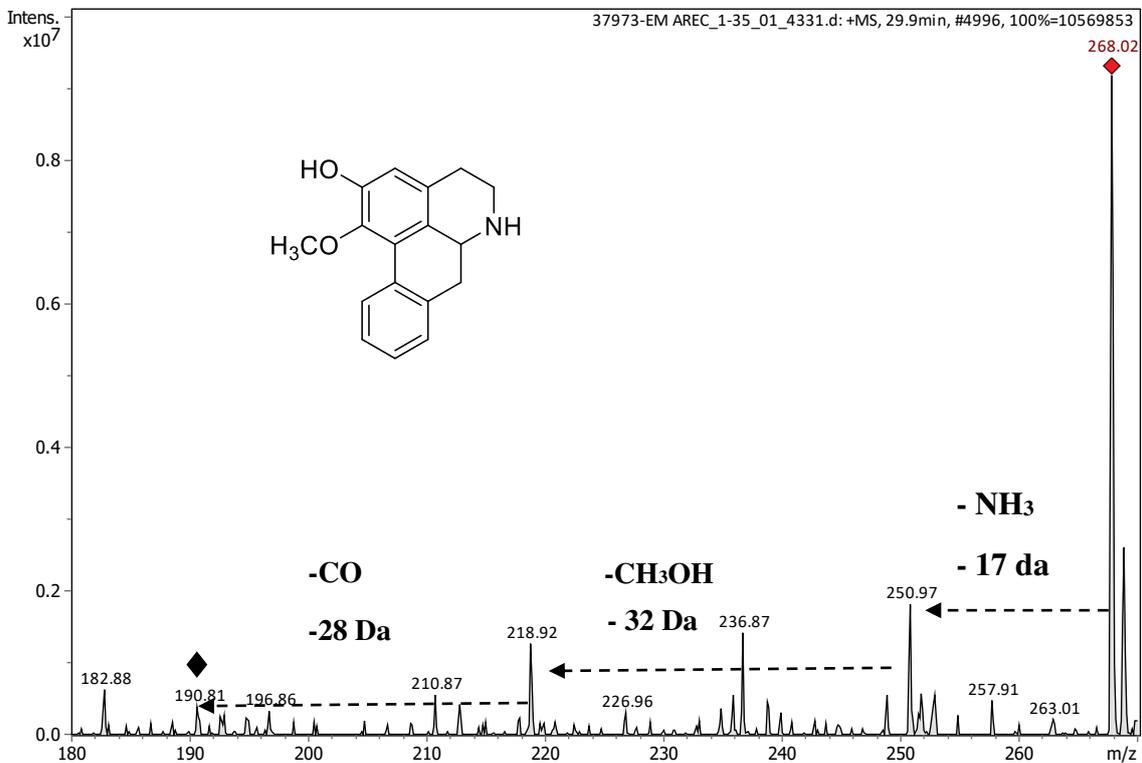
Fonte: Autora (2021)

Figura 21 - Espectro de massas referente à m/z 266 $[M-H]^+$



Fonte: Autora (2021)

Figura 22 - Espectro de massas referente à m/z 268 $[M-H]^+$



Fonte: Autora (2021)

5.3 Avaliação do potencial antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS revelaram que EM-AT e FAC-AT apresentaram atividade significativa quando comparado ao padrão quercetina, conforme mostra a tabela a seguir. Extratos são considerados bioativos quando a CI_{50} é menor que $< 100,0 \mu\text{g/mL}$ (BUTTERWECK; NAHRSTEDT, 2012). Quanto ao percentual de inibição, os resultados demonstraram uma atividade concentração-dependente para EM-AT e FAC-AT (Figura 23).

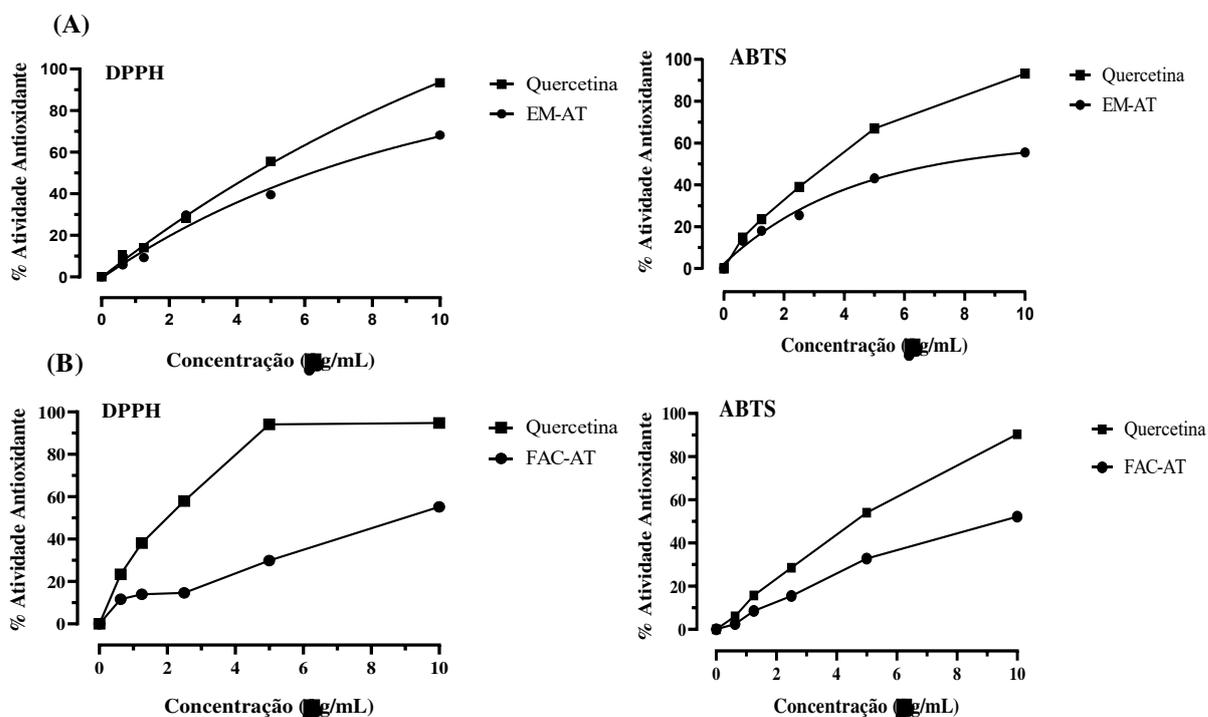
Tabela 6 – Atividade antioxidante do extrato metanólico (EM-AT) e fração acetato (FAC-AT) de *Annona tomentosa*

Amostra	DPPH (CI_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	ABTS (CI_{50} , $\mu\text{g/mL}$)
EM-AT	$6,47 \pm 1,13$	$6,18 \pm 1,06$
FAC-AT	$11,48 \pm 1,10$	$10,10 \pm 1,06$
Quercetina	$4,04 \pm 1,17$	$2,56 \pm 1,14$

Valores de CI_{50} apresentados com desvio padrão.

Fonte: Autora (2021)

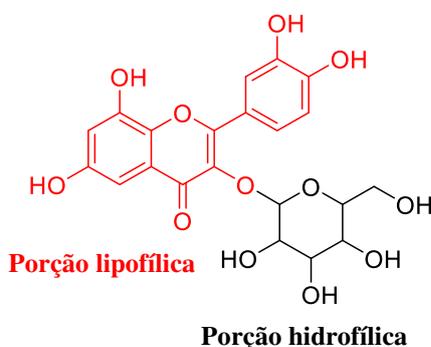
Figura 23 – Gráficos da atividade antioxidante (%) do EM-AT (A), da FAC-AT(B) e do padrão quercetina pelos métodos do DPPH e ABTS



Fonte: Autora (2021)

Estudos indicam que o método de ABTS permite avaliar a atividade antioxidante de substâncias de natureza lipofílica e hidrofílica, enquanto o método de DPPH é aplicável a sistemas hidrofóbicos (FLOEGEL et al., 2011; RE et al., 1999). À vista disso, a diferença de resultados observada em ambos os métodos pode estar diretamente relacionada ao reagente utilizado e ao perfil dos fenólicos presentes nas amostras, considerando que as agliconas (ou geninas) de compostos fenólicos (porção lipofílica) possuem atividade antiradicalar mais expressiva do que seus glicosídeos (porção hidrofílica) (HAVSTEEN, 2002). A Figura 24 apresenta a estrutura molecular de um fenólico (quercetina glicosídeo) com a representação de sua aglicona e glicona.

Figura 24 - Estrutura de composto fenólico com identificação das porções lipofílica (aglicona) e hidrofílica (glicona)



Fonte: Autora (2021)

Na avaliação do potencial antioxidante realizada por Roduan et al. (2019), o extrato metanólico das folhas de *Annona muricata* revelou a maior atividade sequestradora de radicais livres (87,4%) pelo método de DPPH, na concentração de 1,0 mg/mL, valor muito acima da maior concentração testada (10,0 µg/mL) neste estudo. Enquanto que em investigações com frações do extrato metanólico das folhas de *Annona dioica*, as frações acetato de etila e hidrometanólica apresentaram as maiores atividades, com CI_{50} de 8,53 e 10,57 µg/mL (FORMAGIO et al., 2013), maiores que a do extrato metanólico de *A. tomentosa* para os métodos de DPPH ($6,47 \pm 1,13$ µg/mL) e ABTS ($6,18 \pm 1,06$ µg/mL) e da fração acetato por ABTS ($10,10 \pm 1,06$ µg/mL).

Autores atribuem bons resultados com extrato metanólico à abundância de compostos fenólicos extraídos pelo solvente, tendo em vista que o metanol pode extrair diversos compostos polares que se associam com propriedades antioxidantes (DO et al., 2014), dentre os quais se destacam: flavonoides, taninos, polifenóis e saponinas (ADEOSUN et al., 2016; KUMAR et al., 2010; ZŁOTEK et al., 2016).

Em relação a estrutura-atividade, Das; Pereira (1990) mostraram que o grupo carbonila, em C-4, e a dupla ligação, entre C-2 e C-3, presentes em flavonoides, desempenham papel fundamental na ação antioxidante, e que a configuração das hidroxilas no anel também é considerada fator determinante no processo de eliminação dos radicais livres. Além disso, estudos realizados por Heim; Tagliaferro; Bobilya (2002) revelaram que, provavelmente, as diferenças na atividade antioxidante de flavonoides por polihidroxilação ou polimetoxilação ocorrem devido as diferentes configurações estruturais dos radicais livres, que após a doação de grupos hidroxila e metila pelos flavonoides, perdem sua reatividade, não sendo capazes de atacar biomoléculas do organismo.

Em estudo realizado por Justino et al. (2018) com *Annona muricata* Linn., foram identificados compostos como: ácido clorogênico, procianidinas B2 e C1, (epi)catequina, quercetina, quercetina-glicosídeo, rutina e kaempferol, sendo estas moléculas amplamente relatadas como potentes antioxidantes, devido as capacidades de eliminação de radicais livres, redutoras de hidrogênio e de atuarem como agentes doadores de elétrons (COS et al., 2003; GANESHPURKAR; SALUJA, 2017; GU et al., 2006; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; VELLOSA et al., 2011). Alguns destes compostos foram identificados em *A. tomentosa*, como a procianidina C1 e a (epi)catequina, sendo então possíveis responsáveis pela atividade em questão.

De um modo geral, uma maior capacidade antioxidante em virtude dos altos teores de fenólicos já é descrita na literatura para extratos das cascas de espécies de *Annona* frente a outros extratos (ARRUDA et al., 2018; PRADO et al., 2020), sendo também um indício de que os mesmos podem ter potencial antiproliferativo, em virtude do estresse oxidativo estar relacionado à progressão das células tumorais (TAUCHEN et al., 2016).

5.4 Avaliação da capacidade de inibição enzimática de α -glicosidase

Nos últimos anos, a prevalência de diabetes vem aumentando, o que constitui-se como uma grave ameaça à saúde humana (YANG et al., 2021). Na prática clínica, não existe ainda um método de cura para esta doença, somente medicamentos para controlar o açúcar no sangue de forma temporária, apesar do desenvolvimento rápido das tecnologias e tratamentos médicos.

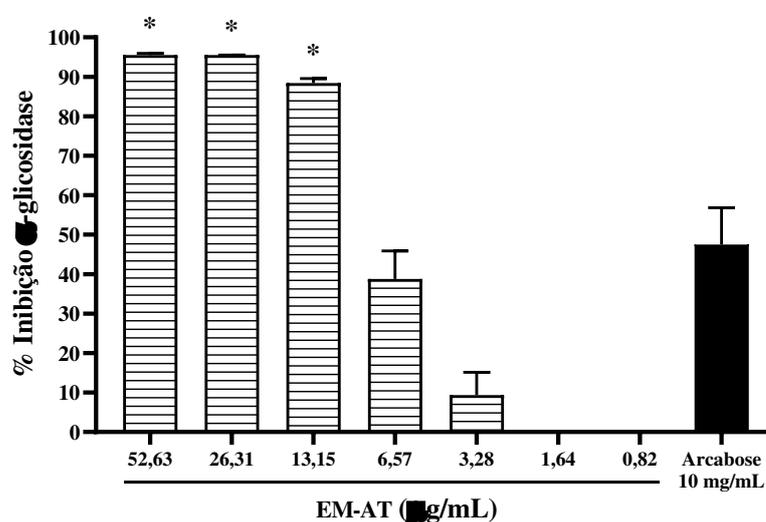
Desse modo, o método mais comum de preparo de enzimas para triagem de ingredientes ativos para hipoglicemiantes usado atualmente é o modelo de inibição da enzima α -glicosidase. Além de inibir sua atividade, seus inibidores também são capazes de reduzir a hidrólise do amido e a absorção de glicose para controlar o açúcar no sangue pós-prandial (KIM et al., 2017); incluem principalmente a acarbose, voglibose, miglitol, dentre outros (LUTHRA

et al., 2020; TATSUMI et al., 2013), que tornaram-se drogas importantes para o tratamento do diabetes.

Contudo, embora os hipoglicemiantes tenham efeitos expressivos, alguns ainda apresentam altos custos e efeitos colaterais, como a baixa tolerância dos pacientes (JIA et al., 2021). Logo, o desenvolvimento e a utilização de novos hipoglicemiantes de origem natural tornou-se uma grande tendência, segundo o que também era exigido pela medicina preventiva, tendo em vista que os mesmos possuem ação medicinal significativa, com efeitos tóxicos e colaterais menores (JIA et al., 2020).

Dessa maneira, realizou-se o ensaio de inibição de α -glicosidase com o extrato metanólico e frações de *Annona tomentosa*. Por meio deste, foi possível observar que somente o EM-AT foi capaz de inibir a atividade da enzima, conforme mostra a Figura 25. Isto pode ter ocorrido em virtude de um possível sinergismo dos fitocomplexos presentes no extrato metanólico da espécie, diferentemente das frações. Nas concentrações de 52,63; 26,31 e 13,15 $\mu\text{g/mL}$, o extrato apresentou resultados significantes ($p < 0.0001$), com inibição maior que 50% em comparação a Arcabose (10 mg/mL), que apresentou inibição de 47,53%.

Figura 25 - Inibição da atividade enzimática de α -glicosidase pelo extrato metanólico (EM-AT) da casca do caule de *Annona tomentosa*



Valores expressos em porcentagem de inibição enzimática. Foi aplicado ANOVA considerando significante * $p < 0,05$ representados como média \pm desvio padrão.

Fonte: Autora (2021)

De acordo com o valor de CI_{50} , o extrato metanólico das cascas do caule de *A. tomentosa* exibiu maior atividade inibitória da α -glicosidase ($7,27 \pm 0,362 \mu\text{g/mL}$) do que o extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* e suas frações acetato de etila e *n*-butanol, com

valores respectivos de $1470,0 \pm 21,50 \mu\text{g/mL}$, $413,1 \pm 121,1 \mu\text{g/mL}$ e $817,4 \pm 87,90 \mu\text{g/mL}$, em ensaio realizado por Justino et al. (2018).

Considerando que a inibição das hidrolases de glicosídeos - que se caracterizam como fatores de risco para complicações micro e macrovasculares no diabetes *mellitus* - é um método relevante para o controle da hiperglicemia pós-prandial, e que diversos compostos fenólicos, como ácidos clorogênico e cafeico, quercetina, quercetina glicosídeo, catequina, procianidinas e rutina, têm sido relatados como inibidores devido à capacidade de se ligar a proteínas (LI et al., 2009; MCDUGALL; STEWART, 2005; OBOH et al., 2015; TADERA et al., 2006), pressupõem-se então que a presença dos mesmos, alguns destes elucidados para espécie *Annona tomentosa*, pode ter contribuído para a capacidade inibitória do extrato. Destaca-se ainda que a presença dos grupos hidroxilas nessas moléculas, também está associada à inibição enzimática (ROHN; RAWEL; KROLL, 2002).

5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas do EM-AT, FAC-AT e FA-AT foram avaliadas para cepas padrão de microrganismos, conforme mostram os resultados a seguir. Pelo método de difusão em ágar por poço, levou-se em consideração as zonas inibitórias diante dos isolados de microrganismos. O extrato e as frações de *A. tomentosa* apresentaram tendência a um perfil concentração-dependente, em que as concentrações utilizadas estão diretamente relacionadas aos seus efeitos.

A fração FAC-AT (Tabela 7) exibiu a melhor atividade para todas as cepas deste ensaio. Para a bactéria *Staphylococcus aureus* e levedura *Candida albicans*, apresentou, respectivamente, zonas de inibição nas concentrações de $100,0 \mu\text{g/mL}$ ($22,8 \pm 1,71 \text{ mm}$ e $15,3 \pm 3,2 \text{ mm}$) e $50,0 \mu\text{g/mL}$ ($15,3 \pm 0,957 \text{ mm}$ e $11,0 \pm 0,816 \text{ mm}$) em comparação com ao antibiótico Imipenem (IMP) ($25,0 \pm 3,3 \text{ mm}$) e antifúngico Fluconazol (FLZ) ($20,8 \pm 1,5 \text{ mm}$).

Para *Escherichia coli*, a fração FAC-AT (Tabela 7) mostrou zona de inibição ($18,0 \pm 1,41 \text{ mm}$) na concentração de $100,0 \mu\text{g/mL}$, sendo maior que a do IMP ($16,5 \pm 9,0 \text{ mm}$). Logo, tendo por base as avaliações da amostra vegetal para todos os microrganismos, evidencia-se o potencial desta fração em comparação aos controles positivos (IMP e FLZ), que possuem zonas de inibição definidas nas concentrações de $200,0 \mu\text{g/mL}$ e $128,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Em contrapartida, a fração FA-AT (Tabela 8) não apresentou nenhuma atividade para *E. coli* e mostrou o menor perfil de inibição para os outros microrganismos. O extrato EM-AT (Tabela 9) também exibiu baixa atividade para *E. coli*, apresentando zonas de inibição significativas para as demais cepas apenas na maior concentração em comparação aos fármacos.

Em estudo anterior realizado por Mota (2016) pela mesma técnica, o extrato hidroetanólico da casca do caule de *A. tomentosa* demonstrou potencial antimicrobiano sugestivo para cepa padrão de *Staphylococcus aureus* e para os isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* e *Candida albicans*, com zonas de inibição respectivas de 20 mm, 20 mm e 15 mm, corroborando, portanto, com o delineamento deste estudo para *S. aureus* e *C. albicans*.

Tabela 7 - Zonas de inibição (mm) da fração acetato (FAC-AT) de *Annona tomentosa* e fármacos Imipenem (IMP) e Fluconazol (FLZ)

Microrganismos	Zona de inibição (mm)				
	Concentração da FAC-AT e antimicrobianos ($\mu\text{g/mL}$)				
	100	50	25	IMP 200	FLZ 128
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	22,8 \pm 1,71	15,3 \pm 0,957	9,5 \pm 1,0	25,0 \pm 3,3	–
<i>E. coli</i> ATCC 25922	18 \pm 1,41	8,75 \pm 0,5	8,0 \pm 0,816	16,5 \pm 9,0	–
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	15,3 \pm 3,2	11,0 \pm 0,816	8,75 \pm 0,957	–	20,8 \pm 1,5

Valores experimentais foram expressos em média e desvio padrão (\pm), dados em triplicata (n=3).

Fonte: Autora (2021)

Tabela 8 - Zonas de inibição (mm) da fração alcaloídica (FA-AT) de *Annona tomentosa* e fármacos Imipenem (IMP) e Fluconazol (FLZ)

Microrganismos	Zona de inibição (mm)				
	Concentração da FA-AT e antimicrobianos ($\mu\text{g/mL}$)				
	100	50	25	IMP 200	FLZ 128
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5,0 \pm 3,37	3,0 \pm 2,16	SI ^a	24,0 \pm 4,24	–
<i>E. coli</i> ATCC 25922	SI ^a	SI ^a	SI ^a	20,5 \pm 1,0	–
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	9,0 \pm 2,0	5,25 \pm 0,5	3,75 \pm 0,5	–	21,3 \pm 2,36

Valores experimentais foram expressos em média e desvio padrão (\pm), dados em triplicata (n=3). ^a SI (sem inibição).

Fonte: Autora (2021)

Tabela 9 - Zonas de inibição (mm) do extrato metanólico (EM-AT) de *Annona tomentosa* e fármacos Imipenem (IMP) e Fluconazol (FLZ)

Microrganismos	Zona de inibição (mm)				
	Concentração do EM-AT e antimicrobianos (µg/mL)				
	100	50	25	IMP 200	FLZ 128
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	17,3 ± 3,1	10,3 ± 0,5	5,75 ± 3,86	29,5 ± 3,70	–
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5,75 ± 1,5	1,5 ± 1	SI ^a	20,8 ± 12,5	–
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	11,8 ± 0,957	6,0 ± 4,0	4,75 ± 0,5	–	20,8 ± 1,5

Valores experimentais foram expressos em média e desvio padrão (±), dados em triplicata (n=3). ^a SI (sem inibição).

Fonte: Autora (2021)

Pelo método de microdiluição em microplacas de 96 poços, as amostras EM-AT, FAC-AT e FA-AT inibiram o crescimento de todos os microrganismos testados, com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) entre 10,4 e 100,0 µg/mL. Os resultados são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 10 - Concentrações inibitórias mínimas do extrato metanólico (EM-AT), frações acetato (FA-AT) e alcaloídica (FAC-AT) de *Annona tomentosa* e fármacos frente a cepas microbianas

Cepa padrão (ATCC)	Concentração Inibitória Mínima (CIM) - µg/mL				
	EM-AT CIM ₉₀	FA-AT CIM ₉₀	FAC-AT CIM ₉₀	Imipenem CIM ₉₀	Fluconazol CIM ₉₀
<i>S. aureus</i>	20,8 ± 7,22	83,3 ± 28,9	10,4 ± 3,61	12,5 ± 0,00	-
<i>E. coli</i>	66,7 ± 28,9	100,0 ± 0,00	25,0 ± 0,00	25,0 ± 0,00	-
<i>C. albicans</i>	50,0 ± 1,25	12,5 ± 0,00	10,4 ± 3,61	-	13,3 ± 4,62

Valores experimentais foram expressos em média e desvio padrão (±), dados em triplicata (n=3).

Fonte: Autora (2021)

Novamente, a fração FAC-AT mostrou-se uma das mais ativas contra todas as cepas. Para *S. aureus* e *C. albicans*, a fração exibiu CIM₉₀ de 10,4 µg/mL para ambas, menor que as dos controles positivos IMP (12,5 ± 0,00 µg/mL) e FLZ (13,3 ± 4,62 µg/mL), corroborando com os dados do teste anterior. Em relação à *E. coli*, exibiu a mesma CIM₉₀ do

IMP de $25,0 \pm 0,00$ $\mu\text{g/mL}$. Já o extrato EM-AT, apresentou resultado mais expressivo para *S. aureus*, com CIM_{90} de $20,8 \pm 7,22$ $\mu\text{g/mL}$; enquanto FA-AT exibiu melhores valores para esse ensaio em comparação aos controles, com CIM de $12,5 \pm 0,00$ $\mu\text{g/mL}$ frente à *C. albicans*, sendo menor que a do antifúngico FLZ ($13,3 \pm 4,62$ $\mu\text{g/mL}$).

As diferenças observadas para as técnicas de difusão em ágar e microdiluição podem estar diretamente associadas à composição e solubilidade das amostras no meio de cultura, metodologia de extração e pH, tendo-se como desafio, portanto, a padronização de procedimentos para avaliação de atividade antimicrobiana de amostras vegetais (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

Contudo, de acordo com a literatura, não basta determinar apenas os valores de CIM_{90} sem avaliar as atividades antibiofilme das amostras, pois a resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos aumenta quando os mesmos formam biofilmes (MOHAMMADI et al., 2019). Biofilmes são comunidades microbianas capazes de aderir às superfícies bióticas ou abióticas por meio de substâncias extrapoliméricas (EPS) produzidas pelos microrganismos. As EPS incluem ácidos nucléicos, proteínas e carboidratos, que auxiliam na fixação celular ao substrato (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Em relação aos microrganismos em questão, *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva frequentemente encontrada na pele e no trato respiratório, a levedura *Candida albicans* é detectada principalmente nas membranas mucosas e no trato gastrointestinal, enquanto a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é o agente causador mais comum de infecções urinárias (LEE et al., 2019; SHEVADE; AGRAWAL, 2015). Estes são patógenos oportunistas e que podem causar doenças graves, como a sepse, devido a capacidade de formação de biofilmes, que é considerado um dos principais fatores de virulência.

Desse modo, tendo em vista o aumento da resistência microbiana devido ao uso generalizado de drogas antimicrobianas e a capacidade de certos microrganismos de se adaptarem, e que a interação entre biofilmes é precursora do aumento de tolerância aos fármacos, da evasão imunológica e virulência; comunidades científicas, principalmente no campo de química de produtos naturais e sintética, têm buscado desenvolver novos agentes antimicrobianos potentes para tratar e prevenir doenças infecciosas causadas também por cepas multirresistentes (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012; ANAND et al., 2019; ASLAM et al., 2018; TODD; PETERS, 2019).

Logo, considerando a relevância do tema e o potencial antimicrobiano já revelado para a espécie, a avaliação da atividade antibiofilme do extrato e frações de *Annona tomentosa* foi determinada de acordo com o perfil de sensibilidade dos microrganismos testados,

considerando as menores médias encontradas em CIM₉₀ e aplicando para o tratamento do biofilme valores sub e supra-inibitórios para *S. aureus* e *C. albicans*, descritos de acordo com a Tabela 11.

Tabela 11 - Concentrações dos tratamentos das amostras teste para o biofilme microbiano

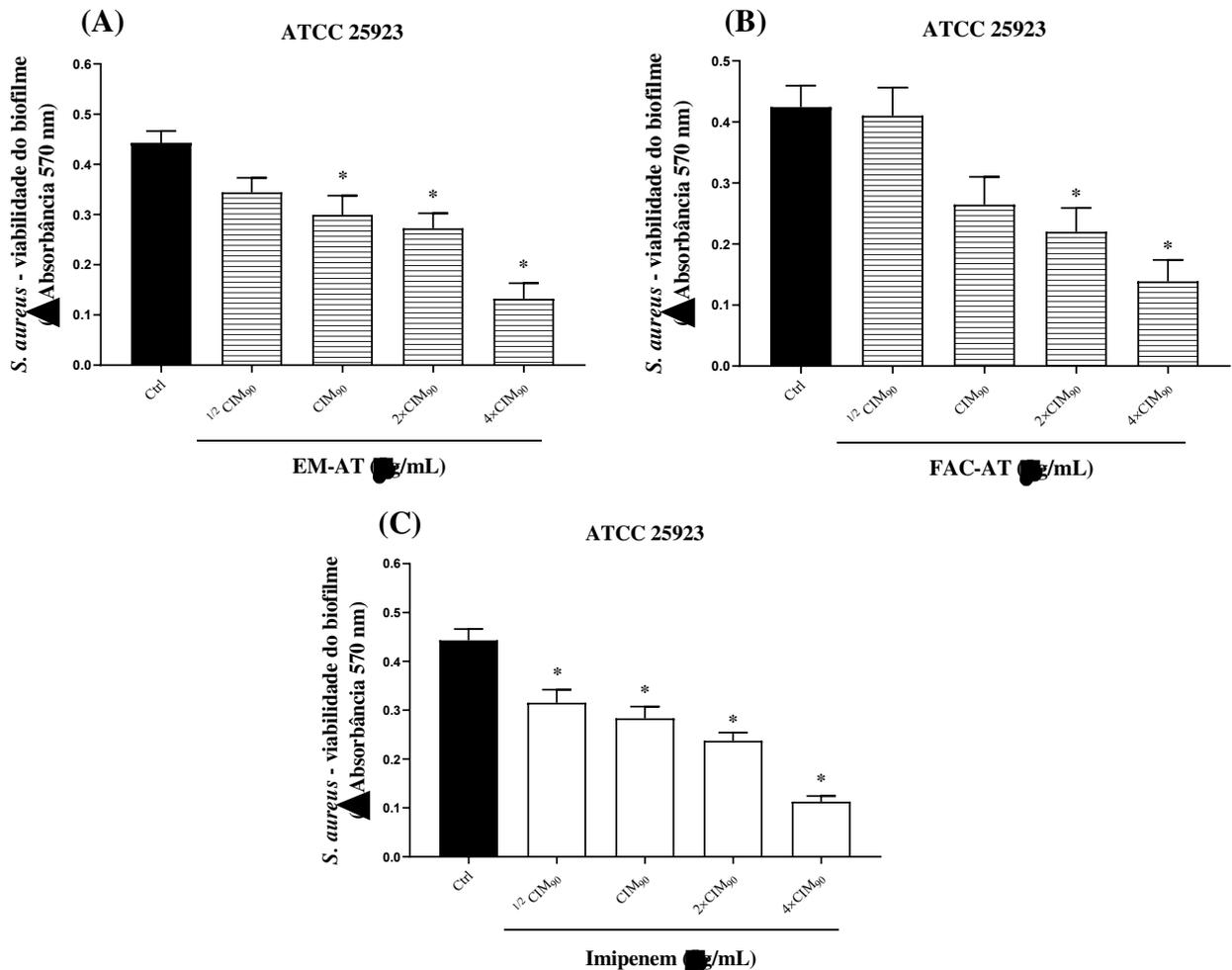
Droga teste (µg/mL)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)				<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)			
	½ CIM ₉₀	CIM ₉₀	2×CIM ₉₀	4×CIM ₉₀	½ CIM ₉₀	CIM ₉₀	2×CIM ₉₀	4×CIM ₉₀
EM-AT	10,4	20,8	41,6	83,2	25,0	50,0	100,0	200,0
FA-AT	NA	NA	NA	NA	6,25	12,50	25,0	50,0
FAC-AT	5,2	10,4	20,8	41,6	5,20	10,40	20,8	41,6
Imipenem	6,25	12,5	25,0	50,0	NA	NA	NA	NA
Fluconazol	NA	NA	NA	NA	6,25	13,3	26,6	53,2

NA = não aplicado.

Fonte: Autora (2021)

Os efeitos dos extratos e frações de *A. tomentosa* na formação do biofilme microbiano estão descritos nas Figuras 26 e 27. Os isolados microbianos que receberam o tratamento do EM-AT apresentaram reduções significantes ($p < 0.05$) na biomassa do biofilme, sendo observado para *S. aureus* reduções graduais a partir de CIM₉₀ e redução expressiva em 4×CIM₉₀ ($p < 0.0001$), similares ao tratamento utilizando Imipenem. Para o isolado de *C. albicans*, o EM-AT apresentou um perfil de redução similar para todas as concentrações teste ($p < 0.0001$), apresentando melhores resultados comparados ao Fluconazol. Já o tratamento utilizando a FAC-AT, apresentou resultados significantes ($p < 0.0001$) somente nos valores de 2×CIM₉₀ e 4×CIM₉₀ para *S. aureus*. Porém, foi observado neste estudo que as concentrações avaliadas de FA-AT e FAC-AT não foram capazes de reduzir o biofilme de *C. albicans*, obtendo o mesmo comportamento da droga padrão (Fluconazol).

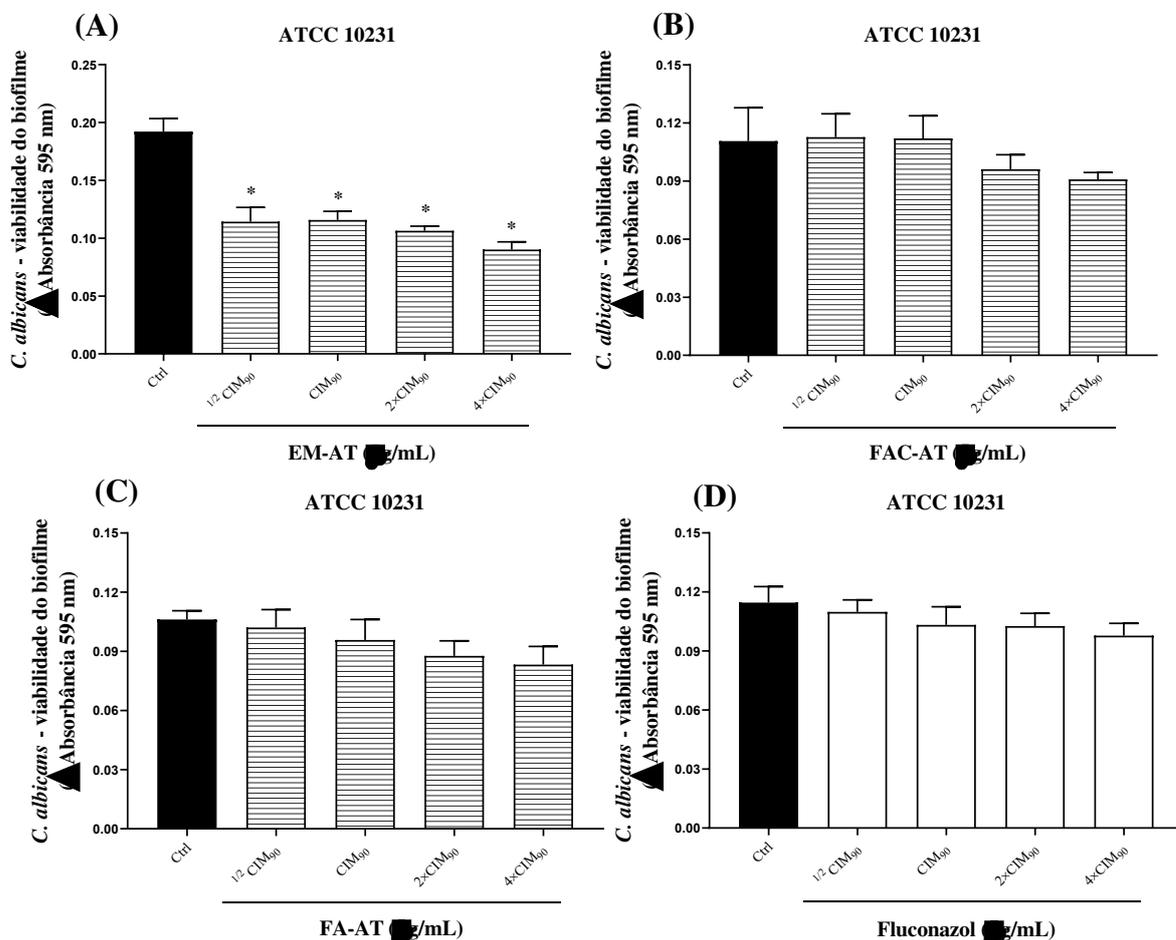
Figura 26 - Efeitos das concentrações do extrato metanólico (EM-AT) e fração acetato (FAC-AT) de *Annona tomentosa* na biomassa do biofilme de *Staphylococcus aureus*



(A) tratamento do biofilme de *S. aureus* com concentrações sub e supra-inibitórias do EM-AT; (B) tratamento do biofilme de *S. aureus* com concentrações sub e supra-inibitórias da FAC-AT e para efeito comparativo em (C) efeitos das concentrações teste da droga padrão (Imipenem). O controle (Ctrl) é compreendido pelo tratamento da bactéria (DMSO 1% em solução salina). Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e foi aplicado ANOVA considerando significativo * $p < 0,05$ representados como média \pm desvio padrão.

Fonte: Autora (2021)

Figura 27 - Efeitos das concentrações do extrato metanólico (EM-AT), frações acetato e alcaloídica (FAC-AT e FA-AT) de *Annona tomentosa* na biomassa do biofilme de *Candida albicans*



(A) Efeito do tratamento no biofilme do EM-AT; (B) Efeito do tratamento no biofilme da FAC-AT; (C) Efeito do tratamento no biofilme da FA-AT e para efeito comparativo em (D) efeitos das concentrações teste da droga padrão (Fluconazol). O controle (Ctrl) é compreendido pelo tratamento da levedura (DMSO 1% em solução salina). Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e foi aplicado ANOVA considerando significante *p < 0,05 representados como média \pm desvio padrão.

Fonte: Autora (2021)

A maioria das pesquisas com espécies de Annonaceae, sobretudo do gênero *Annona*, atribuem as atividades biológicas, como a antimicrobiana, principalmente à presença de alcaloides, acetogeninas e flavonoides, como mostra a revisão das potenciais aplicações terapêuticas do gênero *Annona* de Quílez et al. (2018).

As atividades antimicrobianas dos alcaloides anonaina (KUETE, 2010; PAULO et al., 1992; VILLAR et al., 1987) e asimilobina (COSTA et al., 2013a) identificados no extrato metanólico de *Annona tomentosa*, por exemplo, já são relatadas. Estudo de Chen et al. (2011) relata que a anonaina induz danos ao DNA, ativação de caspase 3, 7, 8 e 9 e clivagem da poli

ADP ribose polimerase. Alcaloides aporfinoídes, como a anonaina, apresentam grupo metilenodioxí, que é o provável responsável pela bioatividade (HOET et al., 2004). Contudo, mais investigações precisam ser feitas quanto ao mecanismo de ação dos outros alcaloides.

No que diz respeito aos flavonoides, essas substâncias são conhecidas por serem sintetizadas pelas plantas em resposta à infecção microbiana (DIXON; DEY; LAMB, 1983). Possivelmente, sua atividade é devido à capacidade de complexar com proteínas extracelulares e solúveis, e com paredes celulares bacterianas. Flavonoides mais lipofílicos também são capazes de romper as membranas microbianas (TSUCHIYA et al., 1996).

Em estudos com subclasses de flavonoides (flavonóis e flavonas) que apresentaram efeito antimicrobiano, foi presumido, estruturalmente, que a posição específica dos grupos hidroxila e a ligação dupla entre C-2 e C-3 podem fornecer sítios para adição nucleofílica por cadeias laterais de aminoácidos, o que poderia então diminuir as atividades dos microrganismos (KOO et al., 2002a, 2002b).

5.6 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* e toxicidade aguda *in vivo*

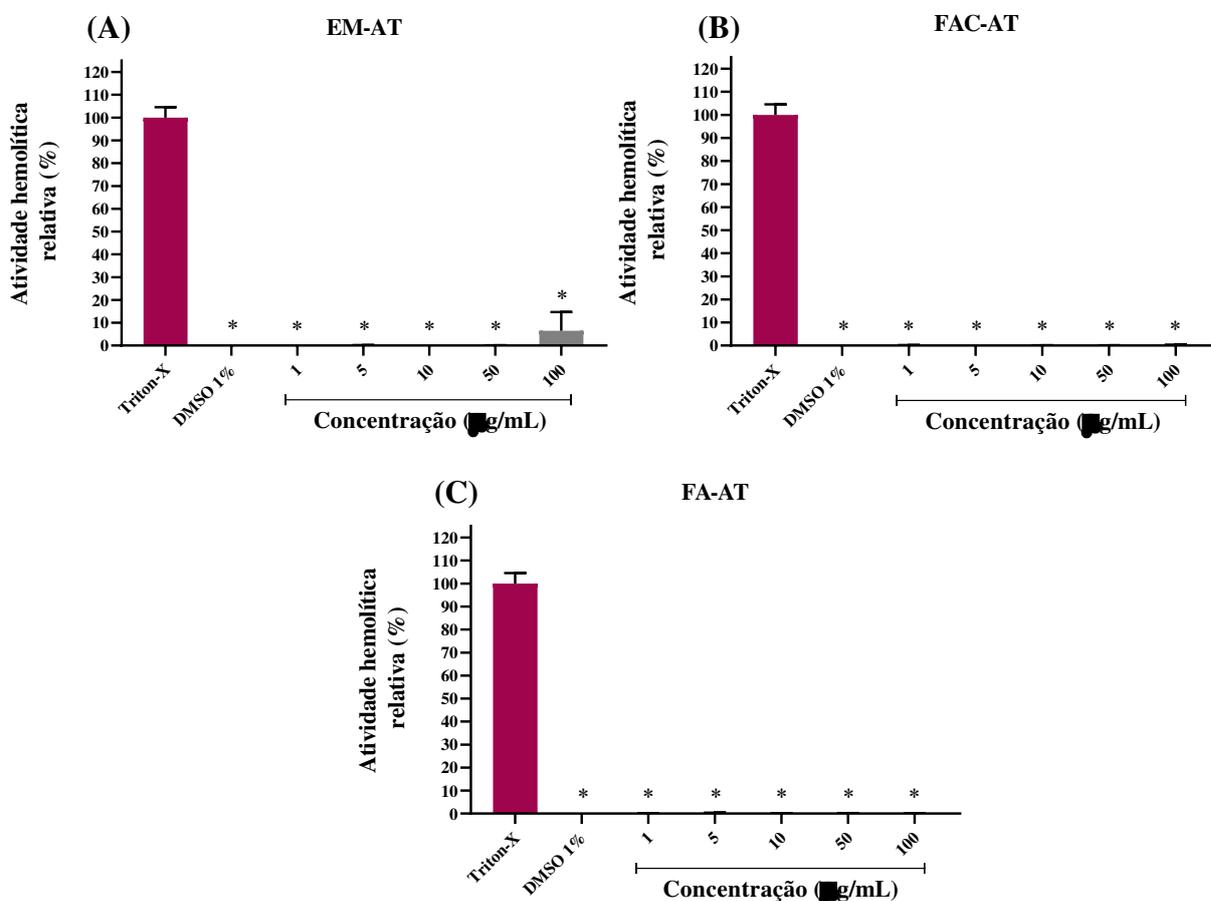
Apesar da importância do conhecimento popular e tradicional, estes não são suficientes para garantir a segurança, eficácia e validação ética das plantas medicinais. A realização de ensaios toxicológicos é primordial para garantir a segurança do uso, seja da planta medicinal *in natura* ou do medicamento sintetizado a partir dela (DICSON et al., 2015). Desse modo, ensaios toxicológicos foram realizados com o extrato e frações de *A. tomentosa*.

Mediante o teste de atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro, verificou-se que as amostras não apresentaram citotoxicidade significativa na faixa de concentração avaliada em comparação ao controle positivo Triton-X (TX), como mostra a Figura 28.

Segundo Moreno et al. (2018); Oliveira et al. (2021), valores de até 5% para o teste de hemólise podem indicar que a amostra teste possui baixo grau de citotoxicidade em eritrócitos, enquanto que valores de até 25%, sugerem grau moderado de hemólise. Assim, na concentração de 100,0 µg/mL, o EM-AT apresentou a maior atividade hemolítica (6,52%), contudo, considerado um valor baixo e inexpressivo em relação a controle positivo (TX).

Já em estudo realizado por Camara (2013) para a espécie, o extrato hidroetanólico das folhas, por meio de avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos isolados de rato, apresentou atividade hemolítica menor que 20% na concentração de 100,0 µg/mL, se correlacionando com os resultados apresentados neste trabalho.

Figura 28 - Citotoxicidade do extrato (EM-AT) (A), frações acetato (FAC-AT) (B) e alcaloídica (FA-AT) (C) de *Annona tomentosa* em eritrócitos de carneiro



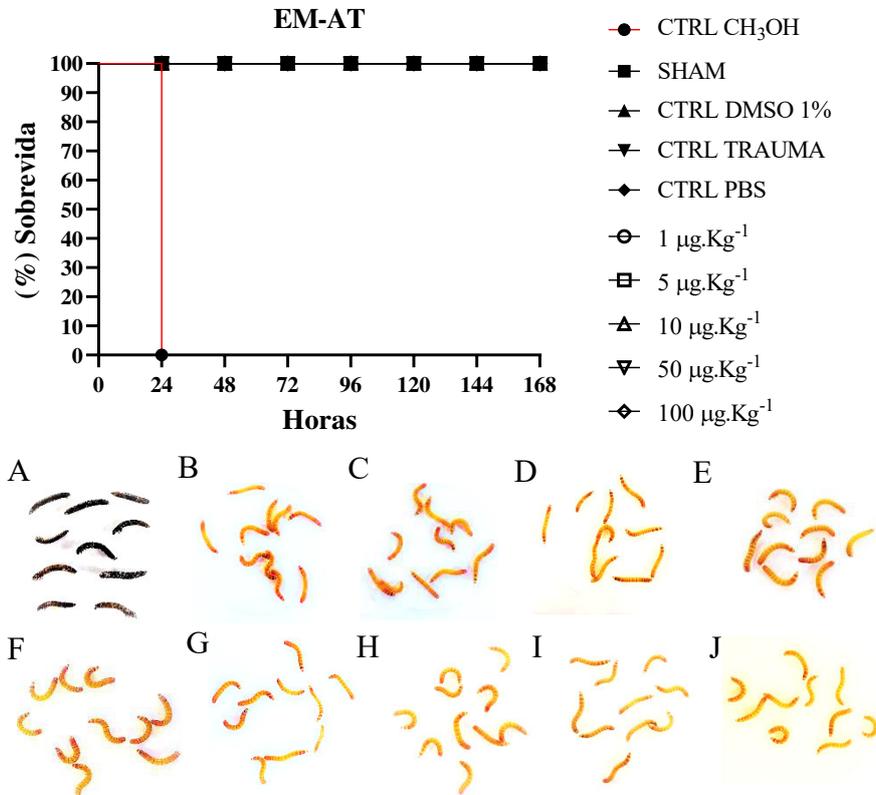
O percentual da atividade hemolítica foi comparado ao Triton X-100, como controle de hemólise. A atividade hemolítica do Triton-X foi considerada como 100% para a análise dos dados. Os dados foram analisados por ANOVA com o pós-teste de Tukey, com * $p < 0,05$.

Fonte: Autora (2021)

Este ensaio representa, portanto, um modelo preliminar de toxicidade, uma vez que investiga a capacidade que uma droga tem em promover dano à membrana plasmática das hemácias, seja pela formação de poros ou pela lise celular total (LUSTOSA et al., 2016). No entanto, investigações *in vivo* são essenciais para determinação do perfil toxicológico de produtos naturais.

Desse modo, a toxicidade aguda em larvas de *Tenebrio molitor* foi avaliada. As larvas receberam injeções diretas de diferentes concentrações do EM-AT, FAC-AT e FA-AT, como descrito no *Item 4.3.2.1.2* (p.37) da metodologia, e sua sobrevivência foi observada. Os resultados são apresentados nas figuras a seguir.

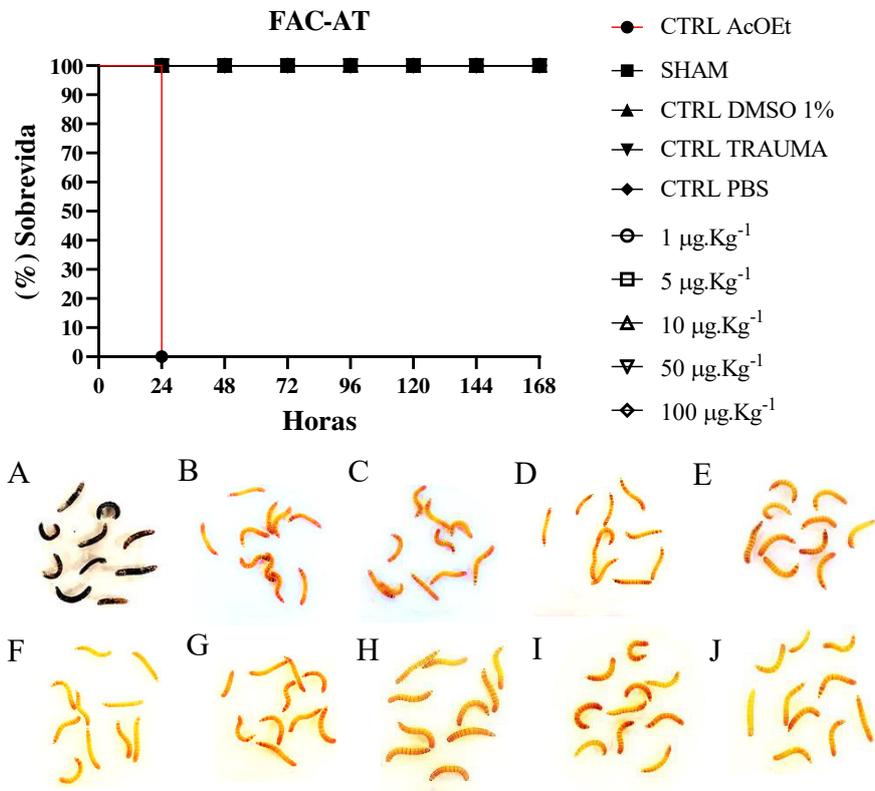
Figura 29 - Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico (EM-AT) de *Annona tomentosa* em larvas de *Tenebrio molitor*



Avaliação estatística através do Teste Log-rank (Mantel-Cox) $p < 0,05$. Fotografias registradas do último dia de análise (7º dia), referido aos seguintes grupos: (A) CTRL CH₃OH; (B) SHAM (Controle limpo); (C) CTRL DMSO 1%; (D) CTRL TRAUMA; (E) CTRL PBS; (F) EM 1,0 µg/Kg; (G) EM 5,0 µg/Kg; (H) EM 10,0 µg/Kg; (I) EM 50,0 µg/Kg; (J) EM 100,0 µg/Kg.

Fonte: Autora (2021)

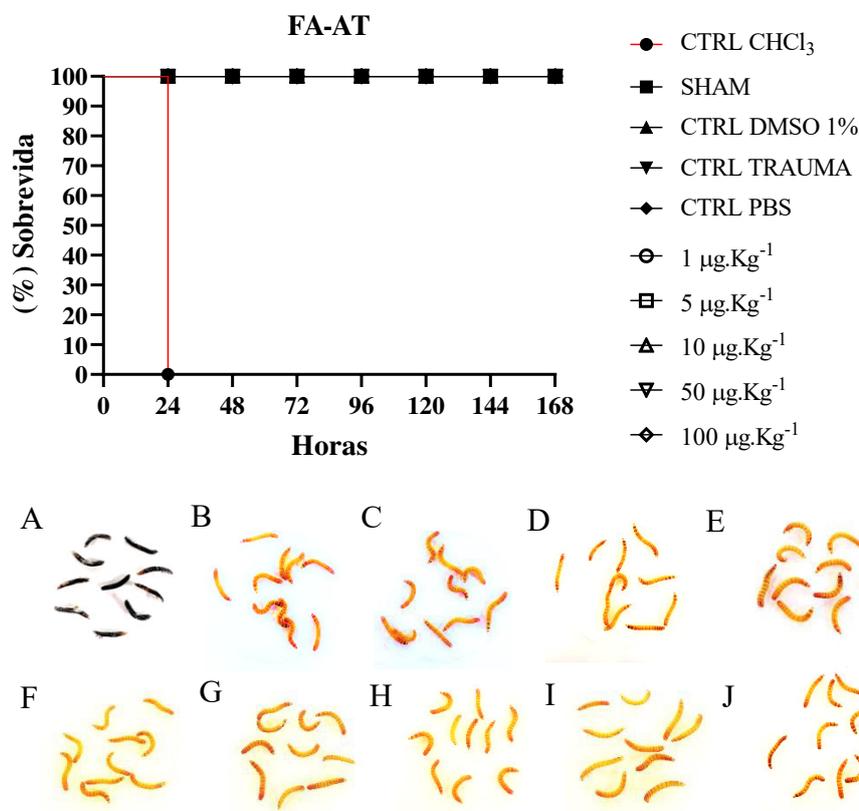
Figura 30 - Avaliação da toxicidade aguda da fração acetato (FAC-AT) de *Annona tomentosa* em larvas de *Tenebrio molitor*



Avaliação estatística através do Teste Log-rank (Mantel-Cox) $p < 0,05$. Fotografias registradas do último dia de análise (7º dia), referido aos seguintes grupos: (A) CTRL $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$; (B) SHAM (Controle limpo); (C) CTRL DMSO 1%; (D) CTRL TRAUMA; (E) CTRL PBS; (F) FAC 1,0 $\mu\text{g/Kg}$; (G) FAC 5,0 $\mu\text{g/Kg}$; (H) FAC 10,0 $\mu\text{g/Kg}$; (I) FAC 50,0 $\mu\text{g/Kg}$; (J) FAC 100,0 $\mu\text{g/Kg}$.

Fonte: Autora (2021)

Figura 31 - Avaliação da toxicidade aguda da fração alcaloídica (FA-AT) de *Annona tomentosa* em larvas de *Tenebrio molitor*



Avaliação estatística através do Teste Log-rank (Mantel-Cox) $p < 0,05$. Fotografias registradas do último dia de análise (7º dia), referido aos seguintes grupos: (A) CTRL CHCl₃ (B) SHAM (Controle limpo); (C) CTRL DMSO 1%; (D) CTRL TRAUMA; (E) CTRL PBS; (F) FA 1,0 µg/Kg; (G) FA 5,0 µg/Kg; (H) FA 10,0 µg/Kg; (I) FA 50,0 µg/Kg; (J) FA 100,0 µg/Kg.

Fonte: Autora (2021)

Observou-se que a avaliação *in vivo* corrobora com a citotóxica. Os grupos controle (CTRL) SHAM, trauma, PBS, DMSO 1% e as amostras teste EM-AT, FAC-AT e FA-AT (1,0; 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 µg/Kg) não apresentaram nenhum efeito tóxico no período determinado da pesquisa (7 dias), atingindo 100% da sobrevivida. A toxicidade aguda foi apresentada somente pelos grupos controle de letalidade (CH₃OH, AcOEt e CHCl₃) em 24h, demonstrando, portanto, a viabilidade das larvas.

Diante disso, foi possível verificar que as investigações toxicológicas associadas as atividades biológicas evidenciam que o extrato bruto e as frações da casca do caule de *A. tomentosa* apresentam grande potencial para o desenvolvimento de um fármaco seguro e eficaz, dentro de um intervalo de baixas concentrações, apesar da presença de alcaloides, que são muito relatados por sua elevada toxicidade.

Ademais, ressalta-se a importância do uso de metodologias alternativas para testes *in vivo*, substituindo ou restringindo o uso de animais vertebrados, como camundongos, o que

minimizaria ou extinguiria o sofrimento dos mesmos e o custo requerido. A experimentação com larvas de *T. molitor*, por exemplo, tem sido amplamente empregada para avaliações de efeitos bioativos e toxicológicos de produtos de origem vegetal, devido ao baixo investimento econômico para aquisição e acondicionamento das larvas, e por demonstrar o mesmo perfil de eficácia e segurança dos testes tradicionais.

6 CONCLUSÃO

De um modo geral, este trabalho revelou que a espécie *Annona tomentosa* R. E. Fr. apresenta características típicas da família Annonaceae, com substâncias ricas em atividades farmacológicas de interesse clínico, como antioxidante, hipoglicemiante e antimicrobianas, demonstrando o potencial promissor como futuro alvo terapêutico para o tratamento de diversas doenças, como as infecciosas.

Além disso, os resultados abrem perspectivas para valorização e exploração de plantas do Cerrado, com destaque para o gênero *Annona*, considerando a diversidade química e biológica de suas espécies. Por fim, incentiva-se então a busca por moléculas ativas, visando o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos, gerando retorno social, de forma acessível e segura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMÕES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 1007–1021, 7 ago. 2012.
- ADEOSUN, A. M. et al. Phytochemical, minerals and free radical scavenging profiles of *Phoenix dactylifera* L. seed extract. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1–6, 1 fev. 2016.
- AGUILAR-VILLALVA, R. et al. Antioxidant capacity and antibacterial activity from *Annona cherimola* phytochemicals by ultrasound-assisted extraction and its comparison to conventional methods. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 7, p. 103239, 1 jul. 2021.
- ALMEIDA, A. S. DE; SANTOS, A. F. DOS. Flavonoides do Gênero *Annona*. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 475, 5 set. 2018.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado : espécies vegetais úteis**. [s.l.] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1998.
- ALVES, A. V. et al. Safety evaluation of the oils extracted from edible insects (*Tenebrio molitor* and *Pachymerus nucleorum*) as novel food for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 102, p. 90–94, 1 mar. 2019.
- ANAND, U. et al. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. **Metabolites 2019, Vol. 9, Page 258**, v. 9, n. 11, p. 258, 1 nov. 2019.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids : Chemistry, Biochemistry and Applications**. [s.l.] CRC Press, 2005.
- ARRUDA, H. S. et al. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 738–749, 15 abr. 2018.
- ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645, 2018.
- BADMUS, J. A. et al. Photo-assisted bio-fabrication of silver nanoparticles using *Annona muricata* leaf extract: exploring the antioxidant, anti-diabetic, antimicrobial, and cytotoxic activities. **Heliyon**, v. 6, n. 11, p. e05413, 1 nov. 2020.
- BARATA, L. E. S. et al. Plantas Medicinais Brasileiras. IV. *Annona muricata* L. (Graviola). *Revista Fitos*. p. 132–138, 1 mar. 2009.
- BARRETO, F. S. **ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPOSTOS OBTIDOS DO EXTRATO ACETÔNICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L. POR FRACIONAMENTO BIOGUIADO FORTALEZA 2014**. [s.l.: s.n.].
- BASKARAN, R.; PULLENCHERI, D.; SOMASUNDARAM, R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 82, p. 121–127, 1 abr. 2016.

- BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 2, p. 269–303, 31 mar. 2005.
- BOMFIM, L. M. et al. Antitumour Activity of the Microencapsulation of *Annona vepretorum* Essential Oil. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 118, n. 3, p. 208–213, 1 mar. 2016.
- BRÍGIDO, H. P. C. et al. Antileishmanial activity of *Annona* species (Annonaceae). **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 9, p. 1–8, 1 set. 2020.
- BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A. What is the best strategy for preclinical testing of botanicals? A critical perspective. **Planta medica**, v. 78, n. 8, p. 747–754, 2012.
- CALZADA, F. et al. Antihyperglycemic Activity of the Leaves from *Annona cherimola* Miller and Rutin on Alloxan-induced Diabetic Rats. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 1, p. 1, 1 jan. 2017.
- CAMARA, M. B. P. ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL ARATICUM BRAVO (*Annona tomentosa* R. E. Fr.). [Monografia]. UFMA. 2013.
- CHATROU, L. 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, 1 maio 2012.
- CHEN, B.-H. et al. (–)-Anonaine Induces DNA Damage and Inhibits Growth and Migration of Human Lung Carcinoma H1299 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2284–2290, 23 mar. 2011.
- CHEN, Y. et al. Antitumor activity and toxicity relationship of annonaceous acetogenins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 394–400, 1 ago. 2013.
- COL. *Annona*. Disponível em: <<https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/8ST8S>>. Acesso em: 14 mar. 2022.
- CORREIA, R. M. Perfil químico do café capixaba conilon & arábica por ESI(-)FT-ICR MS e ATR-FTIR: uma abordagem quantitativa. 4 mar. 2016.
- COS, P. et al. Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 9, p. 1291–1297, 1 set. 2003.
- COSTA, E. V. 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.
- COSTA, E. V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteriaopsis blepharophylla*, *Guatteriaopsis friesiana* e *Guatteriaopsis hispida* (Annonaceae). 2009a.
- COSTA, E. V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteriaopsis blepharophylla*, *Guatteriaopsis friesiana* e *Guatteriaopsis hispida* (Annonaceae). 2009b.
- COSTA, E. V. et al. Alkaloids from the Bark of *Guatteria hispida* and Their Evaluation as Antioxidant and Antimicrobial Agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 6, p. 1180–1183, 25 jun. 2010.
- COSTA, E. V. et al. Essential Oil from the Leaves of *Annona vepretorum*: Chemical Composition and Bioactivity: <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700240>, v. 7, n. 2, p. 265–266, 1 fev. 2012.

- COSTA, E. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2012.688044>, v. 27, n. 11, p. 1002–1006, 1 jun. 2013a.
- COSTA, E. V. et al. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. **Natural product research**, v. 27, n. 11, p. 997–1001, 1 jun. 2013b.
- CUSTÓDIO, D. L.; VEIGA JUNIOR, V. F. DA. Lauraceae alkaloids. **RSC Advances**, v. 4, n. 42, p. 21864–21890, 20 maio 2014.
- DA CRUZ, P. E. O. et al. Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 4–6, p. 872–875, ago. 2011.
- DA SILVA, A. P. S. A. et al. Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Organic Extracts from *Cleome spinosa* Jacq. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 963, 2016.
- DARTORA, N. et al. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1453–1461, 15 dez. 2011.
- DAS, N.; PEREIRA, T. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure-activity relationships. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 4, p. 255–258, 1990.
- DE SOUZA, P. C. et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182–186, 1 nov. 2015.
- DEV, S. K. et al. Antimicrobial, anti-inflammatory and wound healing activity of polyherbal formulation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 555–567, 1 mar. 2019.
- DICSON, S. M. et al. Evaluation of in vitro and in vivo safety profile of the Indian traditional medicinal plant *Grewia tiliaefolia*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 241–247, 1 out. 2015.
- DINIZ, T. C. et al. Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: Involvement of GABAergic and serotonergic systems. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1074–1087, 1 mar. 2019.
- DIXON, R. A. ; DEY, P. M. ; LAMB, C. J. **Phytoalexins: enzymology and molecular biology** *Advanced*, 1983. Disponível em: <https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Phytoalexins%3A+enzymology+and+molecular+biology.&author=R.+A.+Dixon&author=P.+M.+Dey&author=C.+J.+Lamb&publication_year=1983&pages=1-69&pmid=6353887>. Acesso em: 1 fev. 2022
- DO, Q. D. et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 296–302, 1 set. 2014.
- ENOMOTO, H. et al. Distribution of Flavan-3-ol Species in Ripe Strawberry Fruit Revealed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Imaging. **Molecules** **2020**, Vol. **25**, Page **103**, v. 25, n. 1, p. 103, 26 dez. 2019.
- FAGUNDES, F. A. *Annona coriacea* INDUZ EFEITO GENOTÓXICO EM CAMUNDONGOS. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 24–29, 19 out. 2005.

- FALCÃO, H. D. S. et al. Gastric and Duodenal Antiulcer Activity of Alkaloids: A Review. **Molecules** **2008**, Vol. **13**, Pages **3198-3223**, v. 13, n. 12, p. 3198–3223, 17 dez. 2008.
- FERRO, T. A. F. et al. Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects against Infection in a *Galleria mellonella* Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. DEC, p. 2052, 2016.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology** **2010** **8:9**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2 ago. 2010.
- FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 1 nov. 2011.
- FORMAGIO, A. S. N. et al. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. **BMC Complementary and Alternative Medicine** **2013** **13:1**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 11 jan. 2013.
- FRAUSIN, G. et al. Plants of the Annonaceae traditionally used as antimalarials: a review. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPEC. EDITION 1, p. 315–337, 2014.
- GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 149–164, 1 fev. 2017.
- GU, L. et al. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 4057–4061, 31 maio 2006.
- GUINAUDEAU, H.; LEBŒUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine Alkaloids. II. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 4, p. 325–360, 1979.
- GUINAUDEAU, H.; LEBŒUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid Alkaloids, V. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 8, p. 1033–1135, 1 ago. 1988.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2–3, p. 67–202, 1 nov. 2002.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 1 out. 2002.
- HOET, S. et al. Alkaloids from *Cassipoupa filiformis* and related aporphines: Antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. **Planta Medica**, v. 70, n. 5, p. 407–413, 4 maio 2004.
- HUANG, B.; ZHANG, Y. Teaching an old dog new tricks: Drug discovery by repositioning natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, 16 fev. 2022.
- JIA, Y. et al. Characterization, antioxidant activities, and inhibition on α -glucosidase activity of corn silk polysaccharides obtained by different extraction methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1640–1648, 15 nov. 2020.
- JIA, Y. et al. Chemical structure and inhibition on α -glucosidase of polysaccharides from corn silk by fractional precipitation. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, p. 117185, 15 jan. 2021.
- JIN, Y. et al. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. **Archives of oral biology**, v. 49, n. 10, p. 789–798, out. 2004.

- JOSSANG, A. et al. [Annomontacine: a new cytotoxic acetogenin, monotetrahydrofuran gamma-lactone from *Annona montana*]. [French]. 1991.
- JUSTINO, A. B. et al. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 167–182, 1 dez. 2016.
- JUSTINO, A. B. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, p. 83–92, 1 abr. 2018.
- KALIDINDI, N. et al. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 4, p. 795–802, 1 dez. 2015.
- KAMDEM, M. H. K. et al. Cytotoxic and antimicrobial activities of new phytosteroids from the leaves of *Anonidium mannii* (Oliv.) Engl. & Diels (Annonaceae). **South African Journal of Botany**, v. 147, p. 628–635, 1 jul. 2022.
- KIM, J. H. et al. α -Glucosidase inhibition by prenylated and lavandulyl compounds from *Sophora flavescens* roots and *in silico* analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 960–969, 1 set. 2017.
- KOO, H. et al. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1302–1309, 2002a.
- KOO, H. et al. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 17, n. 6, p. 337–343, 1 dez. 2002b.
- KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPEC. EDITION 1, p. 225–242, 2014.
- KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Medica**, v. 76, n. 14, p. 1479–1491, 8 jun. 2010.
- KUMAR, D. et al. Free Radical Scavenging and Analgesic Activities of *Cucumis sativus* L. Fruit Extract. **Journal of Young Pharmacists**, v. 2, n. 4, p. 365–368, 1 out. 2010.
- LEE, R. A. et al. Impact of Infectious Disease Consultation on Clinical Management and Mortality in Patients With Candidemia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 9, p. 1585–1587, 24 abr. 2019.
- LI, H.-T. et al. The Pharmacological Activities of (–)-Anonaine. **Molecules** **2013**, Vol. **18**, Pages **8257-8263**, v. 18, n. 7, p. 8257–8263, 12 jul. 2013.
- LI, Y. Q. et al. Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of α -Glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 11463–11468, 23 dez. 2009.
- LOBÃO, A. . et al. **Annonaceae in Flora do Brasil 2020**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB110219>>. Acesso em: 14 set. 2021.

- LÓPEZ, R.; CUCA, L. E.; DELGADO, G. Antileishmanial and immunomodulatory activity of *Xylopiya discreta*. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 10, p. 623–630, 1 out. 2009.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. DE A. Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas. [s.d.].
- LÚCIO, A. S. S. C. et al. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. **Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 74, p. 233–409, 1 jan. 2015.
- LUSTOSA, A. K. M. F. et al. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 77–82, 1 jan. 2016.
- LUTHRA, T. et al. Discovery of novel pyrido-pyrrolidine hybrid compounds as alpha-glucosidase inhibitors and alternative agent for control of type 1 diabetes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 188, p. 112034, 15 fev. 2020.
- MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. T. Studies in Annonaceae. II. A monograph of the genus *Anaxagorea* A. St. Hil. Part 2. **Mededelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van de Rijksuniversiteit te Utrecht**, v. 543II, n. 1, p. 73–204, 1 jan. 1985.
- MARQUES, J. P.; LOPES, G. C. ALCALOIDES COMO AGENTES ANTITUMORAIS: CONSIDERAÇÕES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS. **Uningá Review Journal**, v. 24, n. 1, out. 2015.
- MARTUCCI, M. E. P. et al. Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application in the Genus *Vernonia* Schreb. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93149, 15 abr. 2014.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. [s.l.] Edições UFC, 1997.
- MCDougall, G. J.; STEWART, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **BioFactors**, v. 23, n. 4, p. 189–195, 1 jan. 2005.
- MENDES-SILVA, I. et al. **Flora do Brasil - *Annona tomentosa* R.E.Fr.** Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=17&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=&grupo=5&familia=110219&genero=Annona&especie=tomentosa&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=SIM&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODO&origem=TODO®iao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODO&mostrarAte=SUBESP_VAR&opcoesBusca=TODO_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica>. Acesso em: 14 set. 2021.
- MOHAMMADI, M. et al. Study the antibacterial and antibiofilm activity of *Carum copticum* against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm forms. **Microbial Pathogenesis**, v. 129, p. 99–105, 1 abr. 2019.
- MOREIRA, I. C. et al. Genus *Xylopiya* (Annonaceae): chemical and biological aspects. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 11, p. 1921–1943, nov. 2013.
- MORENO, A. DE H. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. **Arch. Health Sci. (Online)**, v. 25, n. 1, p. 11–12, 20 abr. 2018.

MOTA, A. C. C. **PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CASCA DO CAULE DA ESPÉCIE VEGETAL ARATICUM BRAVO**(*Annona tomentosa* R. E. Fr.). [Monografia]. UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO, , 24 ago. 2016. Disponível em: <<http://rosario.ufma.br:8080/jspui/handle/123456789/1419>>. Acesso em: 15 set. 2021

NAVARRO, M. O. P. et al. Fluopsin C for Treating Multidrug-Resistant Infections: *In vitro* Activity Against Clinically Important Strains and *in vivo* Efficacy Against Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 0, n. OCT, p. 2431, 2019.

NEGRI, G. et al. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE CASCA E FOLHAS DE *Erythroxylum vacciniifolium* EM MODELOS *in vivo*. **Revista Ciência e Saúde On-line**, v. 1, n. 1, 3 maio 2016.

NESKE, A. et al. **Acetogenins from Annonaceae family. Their potential biological applications****Phytochemistry**Elsevier Ltd, , 1 jun. 2020.

NUNES, B. Prospecção química e avaliação biológica de *Banisteriopsis laevifolia* (Malpighiaceae). 29 abr. 2016.

OBOH, G. et al. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (*in vitro*): A comparative study. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 165–170, 1 mar. 2015.

OKPEKON, T. A. et al. Apoprunellelactone (APL), an antiprotozoal lactone from the stem barks of *Isolona cooperi* Hutch. & Dalziel (Annonaceae). **Natural Product Research**, v. 35, n. 23, p. 5112–5119, 3 fev. 2022.

OLIVEIRA, G. P. DE et al. Citotoxicidade de uma formulação em orabase de *Libidibia ferrea*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e133101018713, 7 ago. 2021.

OLIVEIRA, M. S. S. et al. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 326–331, 2007.

OLIVIER, D. K.; VAN VUUREN, S. F.; MOTEETEE, A. N. *Annickia affinis* and *A. chlorantha* (*Enantia chlorantha*) – A review of two closely related medicinal plants from tropical Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 438–462, 24 dez. 2015.

PAES, M. M. et al. Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 945–980, 2016.

PAULO, M. DE Q. et al. Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 39–41, 1 fev. 1992.

PEIXOTO ARAUJO, N. M. et al. Functional and nutritional properties of selected Amazon fruits: A review. **Food Research International**, v. 147, p. 110520, 1 set. 2021.

PERRONE, A. et al. Botanical, genetic, phytochemical and pharmaceutical aspects of *Annona cherimola* Mill. **Scientia Horticulturae**, v. 296, p. 110896, 5 abr. 2022.

PINHEIRO, A. DE A. Caracterização química, atividade antimicrobiana e citotóxica da entrecasca do caule de *Annona tomentosa* R. E. Fr. [Monografia]. UFMA. 28 jun. 2019.

- PINHEIRO, M. L. B. et al. Acanthoic acid and other constituents from the stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1095–1102, 2009.
- PINTO, N. DE C. C. et al. Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 332–340, 15 nov. 2017.
- PRADO, L. G. et al. Antioxidant, antiproliferative and healing properties of araticum (*Annona crassiflora* Mart.) peel and seed. **Food Research International**, v. 133, p. 109168, 1 jul. 2020.
- QAZI, A. K. et al. Emerging therapeutic potential of graviola and its constituents in cancers. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 4, p. 522–533, 5 abr. 2018.
- QUÍLEZ, A. M. et al. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, p. 244–270, 28 out. 2018.
- RABELO, S. V. et al. *Annona* Species (Annonaceae) Oils. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**, p. 221–229, 1 jan. 2016.
- RAHMAN, M.; SARKER, S. D. Antimicrobial natural products. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 77–113, 1 jan. 2020.
- RAINER, H.; CHATROU, L. W. **Annonaceae GSD**. Disponível em: <<https://www.catalogueoflife.org/data/dataset/1040>>. Acesso em: 14 mar. 2022.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1 maio 1999.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152–159, 1 abr. 1997.
- RINALDI, M. V. N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. 3 out. 2008.
- 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, 1 jul. 1988.
- ROCHA, G. et al. Phytochemicals and biological properties of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae): A systematic review from 1971 to 2020. **Chemico-Biological Interactions**, v. 336, p. 109390, 25 fev. 2021.
- ROCKENBACH, I. I. et al. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 848–855, 1 out. 2012.
- RODRIGUES, A. M. et al. Larvicidal activity of *Annona mucosa* Jacq. extract and main constituents rolliniastatin 1 and rollinacin against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Industrial Crops and Products**, v. 169, p. 113678, 1 out. 2021.
- RODUAN, M. R. M. et al. Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* in vitro. **Journal of Herbal Medicine**, v. 15, p. 100219, 1 mar. 2019.

- ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048–1054, 1 jan. 2007.
- ROHN, S.; RAWEL, H. M.; KROLL, J. Inhibitory Effects of Plant Phenols on the Activity of Selected Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3566–3571, 5 jun. 2002.
- ROMANO, J. D.; TATONETTI, N. P. Informatics and computational methods in natural product drug discovery: A review and perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. APR, p. 368, 2019.
- ROSALES, P. F. et al. Indole alkaloids: 2012 until now, highlighting the new chemical structures and biological activities. **Fitoterapia**, v. 143, p. 104558, 1 jun. 2020.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols - Sánchez-Moreno - 1998 - Journal of the Science of Food and Agriculture - Wiley Online Library. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 1999.
- 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, 1 nov. 2000.
- SHEVADE, S. U.; AGRAWAL, G. N. Study of virulence factors of *E. coli* in community and nosocomial urinary tract infection. **Indian Journal of Medical Specialities**, v. 6, n. 4, p. 158–160, 1 out. 2015.
- SHIVANNA, L. M.; SARJAN, H. N.; UROOJ, A. Acute Toxicity Study of *Annona reticulata* Leaves Extract in Swiss Albino Mice. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 9, n. 2, p. 71–75, 16 set. 2019.
- SHRIVASTAVA, N. et al. Chemopreventive and Therapeutic Potential of Natural Agents and Their Combinations for Breast Cancer. **Discovery and Development of Anti-Breast Cancer Agents from Natural Products**, p. 231–281, 1 jan. 2021.
- SIBBR. *Annona* | SiBBr (Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira). Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/375173>>. Acesso em: 15 set. 2021.
- SIBBR. **Herbário do Maranhão**. Disponível em: <https://collectory.sibbr.gov.br/collectory/public/show/dr288?lang=pt_BR#>. Acesso em: 14 mar. 2022.
- SILVA, D. B. et al. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 1059–1063, 1 nov. 2009.
- SILVA, L. E. et al. Plantas do Gênero *Xylopi*a: Composição Química e Potencial Farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Medicin**ais, v. 17, n. 4, p. 814–826, 2015.
- SILVA, T. B. et al. Chemical constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopi*a *laevigata*. **Planta Medica**, v. 79, n. 2, p. 123–130, 2013.
- SILVA, V. A. O. et al. Hexane partition from *Annona crassiflora* Mart. promotes cytotoxicity and apoptosis on human cervical cancer cell lines. **Investigational New Drugs** 2018 37:4, v. 37, n. 4, p. 602–615, 29 ago. 2018.

- SINGH, D.; KUMARI, K.; AHMED, S. Natural herbal products for cancer therapy. **Understanding Cancer**, p. 257–268, 1 jan. 2022.
- SOONWERA, M. Efficacy of essential oil from *Cananga odorata* (Lamk.) Hook.f. & Thomson (Annonaceae) against three mosquito species *Aedes aegypti* (L.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison), and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Parasitology research**, v. 114, n. 12, p. 4531–4543, 1 dez. 2015.
- SOUSA, O. V. et al. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil. Barks. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 11056, set. 2012.
- SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSⁿ and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 14–30, 15 abr. 2015.
- STASI, L. C. DI.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. p. 604, 2002.
- STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents**, v. 5, n. 2, p. 173–182, mar. 2005.
- SURESH, H. M.; SHIVAKUMAR, B.; SHIVAKUMAR, S. I. Cytotoxicity of Aporphine Alkaloids from the Roots of *Annona Reticulata* on Human Cancer Cell Lines. **International Journal of Plant Research**, v. 2, n. 3, p. 57–60, 9 maio 2012.
- TADERA, K. et al. Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, n. 2, p. 149–153, abr. 2006.
- TATSUMI, F. et al. Concomitant use of miglitol and mitiglinide as initial combination therapy in type 2 diabetes *mellitus*. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 101, n. 1, p. 35–44, 1 jul. 2013.
- TAUCHEN, J. et al. Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 728–737, 1 nov. 2016.
- TODD, O. A.; PETERS, B. M. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Pathogenicity and Polymicrobial Interactions: Lessons beyond Koch's Postulates. **Journal of Fungi 2019, Vol. 5, Page 81**, v. 5, n. 3, p. 81, 4 set. 2019.
- TSABANG, N. et al. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 171–180, 6 jan. 2012.
- TSUCHIYA, H. et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, n. 1, p. 27–34, 1 jan. 1996.
- VEGA, M. R. G. 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.
- VELLOSA, J. C. R. et al. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. **Eclética Química**, v. 36, n. 2, p. 07–20, 2011.

- VILLAR, A. et al. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids. **Die Pharmazie**, v. 42, n. 4, p. 248–250, 1 abr. 1987.
- WANG, X. et al. The Effect of Chemical Composition and Bioactivity of Several Essential Oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 116, 1 jan. 2015.
- YADAV, D. K. et al. Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 666–675, 1 jun. 2011.
- YAJID, A. I. et al. Potential Benefits of *Annona muricata* in Combating Cancer: A Review. **The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS**, v. 25, n. 1, p. 5, 1 jan. 2018.
- YAN, Y. et al. Effect of Shikonin Against *Candida albicans* Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, 2019.
- YANG, C.-J. et al. UHPLC-MS/MS Determination, Pharmacokinetic, and Bioavailability Study of Taxifolin in Rat Plasma after Oral Administration of its Nanodispersion. **Molecules** **2016**, Vol. **21**, Page **494**, v. 21, n. 4, p. 494, 14 abr. 2016.
- YANG, C. et al. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 6, p. 656–665, 1 jun. 2015.
- YANG, J. et al. Comparative study of inhibition mechanisms of structurally different flavonoid compounds on α -glucosidase and synergistic effect with acarbose. **Food Chemistry**, v. 347, p. 129056, 15 jun. 2021.
- ZŁOTEK, U. et al. The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 628–633, 1 set. 2016.

APÊNDICE A – MEDIDA DAS LARVAS E PESO DOS GRUPOS PARA EM-AT, FAC-AT E FA-AT

EM-AT					
	G1	G2	G3	G4	G5
	2,0	2,0	2,0	1,9	2,1
	2,1	2,1	1,9	2,0	2,2
	2,0	2,2	2,0	2,0	2,2
	2,2	2,2	2,0	2,2	2,2
	2,1	2,3	2,1	2,1	2,1
	2,0	2,2	2,0	2,1	2,1
	2,2	2,2	1,9	2,2	1,9
	2,1	2,1	2,1	1,9	2,0
	2,1	2,0	2,0	1,9	2,0
	2,2	2,0	2,1	2,0	2,2
PESO	1,11	1,14	1,09	1,07	1,10

As larvas foram medidas em cm e o peso registrado em g. Os grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) referem-se as seguintes concentrações: 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 µg/Kg.

FAC-AT					
	G1	G2	G3	G4	G5
	2,0	2,2	2,2	2,2	2,1
	2,0	2,1	2,1	2,3	2,3
	2,2	2,1	2,2	2,3	2,3
	2,1	2,0	2,3	2,2	2,3
	2,0	2,2	2,2	2,2	2,3
	1,9	2,2	2,2	2,2	2,3
	2,1	2,1	2,1	2,2	2,1
	2,0	2,2	2,2	2,2	2,0
	1,9	2,0	2,0	2,2	2,0
	2,0	2,0	2,0	2,3	2,0
PESO	1,07	1,09	1,10	1,15	1,11

As larvas foram medidas em cm e o peso registrado em g. Os grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) referem-se as seguintes concentrações: 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 µg/Kg.

FA-AT					
	G1	G2	G3	G4	G5
	2,1	2,0	2,0	2,1	2,1
	2,1	2,0	1,9	1,9	2,0
	2,0	1,9	2,1	2,0	2,0
	2,0	1,9	2,0	2,2	2,3
	2,0	1,8	2,1	2,0	2,1
	2,0	2,2	2,0	2,1	2,2
	2,1	2,1	2,0	2,0	2,0
	1,9	1,9	1,9	2,1	2,1
	2,0	2,0	2,0	2,0	1,9
	2,1	1,9	2,0	2,2	2,0
PESO	1,09	1,13	1,14	1,05	1,12

As larvas foram medidas em cm e o peso registrado em g. Os grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) referem-se as seguintes concentrações: 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 µg/Kg.

APÊNDICE B – RESUMO DO CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO SOBRE A ESPÉCIE
Annona tomentosa

PINHEIRO, A. A.; VASCONCELOS, L. N.; CAMARA, M. B. P.; ROCHA, C. Q.; TELES, A. M.; MIRANDA, A. J. A.; SANTOS, A. P. S. A.; OLIVEIRA, P. R. Aspectos taxonômicos, químicos e potencial farmacológico de *Annona tomentosa* R. E. Fr.: Uma breve revisão. In: LEMOS, J. R. (org.). **Ciências biológicas e da saúde: pesquisas básicas e aplicadas 3**. Rio Branco: Stricto Sensu, 2021. p. 50–64.

RESUMO

Annona tomentosa é uma espécie de planta frutífera, nativa do bioma Cerrado brasileiro, que apresenta usos medicinais tradicionais estabelecidos em regiões tropicais para o tratamento de patologias, como infecções microbianas. Esta revisão enfoca uma breve compreensão da taxonomia, composição química e atividades biológicas da espécie, com associações a família e ao gênero, fornecendo base para novos estudos. Investigações do extrato bruto e fração alcaloídica de *A. tomentosa* demonstraram atividades antinoceptiva, anti-inflamatória e antimicrobiana, além da presença de Universidade Federal do Maranhão como flavonoides, terpenos e alcaloides, descritos em diversas espécies de anonáceas pelo potencial farmacológico. Esses relatos evidenciam que a planta pode ser uma valiosa fonte de novas moléculas bioativas para aplicações farmacêuticas e que estudos mais aprofundados se fazem necessários a fim de esclarecer as propriedades terapêuticas de *Annona tomentosa*. Essa revisão servirá para divulgar os estudos já realizados com a espécie *Annona tomentosa* bem como impulsionar estudos químicos e biofarmacológicos com o gênero *Annona*, alertando para elaboração de estratégias de preservação da biodiversidade brasileira.

Palavras-chave: Composição química, Taxonomia e Moléculas bioativas.