

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

Mestrado

EDUARDA DOS SANTOS LIMA

**Ação anti-helmíntica *in vitro* e modificações ultraestruturais em *Haemonchus contortus*
induzidas por uma fração alcaloídica de *Annona tomentosa***

Área de concentração do orientador:

Saúde Única

Linha de Pesquisa do Professor Orientador:

Saúde Única

São Luís – MA

2023

EDUARDA DOS SANTOS LIMA

Ação anti-helmíntica *in vitro* e modificações ultraestruturais em *Haemonchus contortus* induzidas por uma fração alcaloídica de *Annona tomentosa*

Dissertação para defesa, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares

São Luís – MA

2023

EDUARDA DOS SANTOS LIMA

Ação anti-helmíntica *in vitro* e modificações ultraestruturais em *Haemonchus contortus* induzidas por uma fração alcaloídica de *Annona tomentosa*

Dissertação para defesa, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares
(Orientadora – PPGSA/UFMA)

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
(Membro – DBBM/UFC)

Prof. Dr. Hermes Ribeiro Luz
(Membro – PPGSA/UFMA)

Profa. Dra. Dauana Mesquita Sousa
(Membro – PPGCS/UFMA)

Ficha Catalográfica

Dos Santos Lima, Eduarda.

Ação anti-helmíntica in vitro e modificações ultraestruturais em *Haemonchus contortus* induzidas por uma fração alcaloídica de *Annona tomentosa* / Eduarda Dos Santos Lima. - 2023.

58 f.

Orientador(a): Profa. Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SAO LUIS, 2023.

1. Alcaloides. 2. *Annona tomentosa*. 3. Nematoides. 4. Plantas. I. Martins dos Santos Soares, Profa. Dra. Alexandra. II. Título.

Dedicatória

À minha irmã, Norma, que mesmo do céu eu sei que está orgulhosa de mim; aos meus pais, José Francisco e Rosimar por todo incentivo, paciência, apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar nos momentos difíceis, dando-me força, sabedoria e pela Sua infinita graça.

À minha família, pelo apoio, incentivo, investimentos e por acreditar em mim e nas minhas escolhas. Em especial aos meus pais, meus irmãos Norma e Ideglan pelo amor incondicional.

A minha sincera gratidão a meu amigo Maycon Douglas, cuja presença foi de suma importância ao longo do meu percurso no mestrado. Seu constante incentivo e motivação foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal.

À minha orientadora, Profa. Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares, pela confiança, paciência e incentivo durante a caminhada de mestrado. Você, sem dúvidas, é uma das minhas melhores inspirações como ser humano e educadora.

Ao Prof. Dr. Lívio Martins Costa Júnior e aos seus colaboradores, em especial a Juliana, Carolina e Caio Tavares, pela coordenação e cooperação no desenvolvimento das atividades do Laboratório de Controle de Parasitos (LCP) no qual foram realizados os testes “*in vitro*”.

À Profa. Dra. Cláudia Rocha e sua aluna de doutorado Aglaete Pinheiro, do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da UFMA, pela parceria na realização deste trabalho. E, Aglaete, sua amizade foi muito gratificante ao longo desse período de mestrado.

Aos Professores Araújo Neto, Mariana Arruda, Ana Paula Serejo e Maria Cristiane pelo carinho, incentivo e valiosos ensinamentos.

Aos alunos do Laboratório de Bioquímica Vegetal (LBV) da UFMA, ao qual faço parte: Wallyson, por seu esforço e dedicação; Cecília, por sua gentileza; Amanda e Carolina, pela parceria, principalmente no início da caminhada; Glayane, por ser sempre prestativa; Anildes, por sua amizade sincera e bons conselhos. E aos demais, pela cooperação para a realização deste trabalho.

Aos discentes do Programa Saúde e Ambiente da UFMA, pela gama de conhecimento compartilhado durante o mestrado.

Aos meus colegas de turma, em especial ao Gustavo Almeida, que fez parte da turma anterior do programa, mas que contribuiu muito com o artigo de revisão.

A todos que contribuíram, em algum momento, para o desenvolvimento deste trabalho.

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”

(Albert Einstein)

LIMA, Eduarda dos Santos. Ação anti-helmíntica *in vitro* e modificações ultraestruturais em *Haemonchus contortus* induzidas por uma fração alcaloídica de *Annona tomentosa*. 2023. 56 f. **Dissertação (mestrado em Saúde Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.**

RESUMO

Os alcaloides, metabólitos secundários de plantas, possuem diversas bioatividades, incluindo ação anti-helmíntica. Considerando a resistência dos nematoides à maioria dos medicamentos comerciais, a investigação de produtos naturais com propriedades anti-helmínticas ganha relevância para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre os parasitos de ovinos e caprinos, destaca-se o *Haemonchus contortus*, por sua alta prevalência e patogenicidade em regiões tropicais e subtropicais. Este estudo teve como objetivo obter uma fração alcaloídica (Alk.F) de *Annona tomentosa* e avaliar sua atividade anti-helmíntica *in vitro* assim como sua atividade hemolítica. A obtenção da Alk.F ocorreu a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *A. tomentosa*. A detecção e identificação de alcaloides em Alk.F foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada e espectrometria de massas, respectivamente. A avaliação da atividade anti-helmíntica *in vitro* de Alk.F em larvas de *H. contortus* foi conduzida por meio dos ensaios de desembainhamento artificial e desenvolvimento larvar. Modificações na ultraestrutura de larvas L3 de *H. contortus* induzidas por Alk.F foram avaliadas por microscopia de força atômica. A atividade hemolítica *in vitro* de Alk.F foi avaliada medindo-se a lise de eritrócitos de ovelha. Dos nove picos predominantes obtidos, sete alcalóides foram identificados em Alk.F: reticulina, N-óxido de reticulina, isômero N-óxido de reticulina, ciclanolina, assimilobina, tetrahidropalmatina e anonaína. Alk.F demonstrou baixa atividade hemolítica, com apenas 2,7% de hemólise a 0,5 mg/mL. Adicionalmente, inibiu o desenvolvimento e o desembainhamento larvar, apresentando concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀) de 0,026 mg/mL e 0,36 mg/mL, respectivamente. Alk.F, na concentração de 0,026 mg/mL, induziu alterações na cutícula de larvas de *H. contortus*, resultando na redução da adesão e aumento da altura. Em conclusão, Alk.F tem atividade *in vitro* contra larvas de *H. contortus*, desorganizando a estrutura da cutícula, sendo potencial para o desenvolvimento de novas estratégias de controle deste nematoide.

Palavras – chave: alcaloides; *Annona tomentosa*; nematoides; plantas.

LIMA, Eduarda dos Santos. In vitro anthelmintic action and ultrastructural changes in *Haemonchus contortus* induced by an alkaloid fraction of *Annona tomentosa*. 2023. **56 f. Dissertation (master's degree in Environmental Health) - Federal University of Maranhão, São Luís, 2023.**

ABSTRACT

The alkaloids, secondary metabolites of plants, exhibit diverse bioactivities, including anthelmintic effects. Considering the resistance of nematodes to most commercial drugs, the investigation of natural products with anthelmintic properties becomes increasingly relevant for the development of new anthelmintic drugs. Among the nematodes affecting sheep and goats, *Haemonchus contortus* stands out due to its high prevalence and pathogenicity in tropical and subtropical regions. This study aimed to obtain an alkaloidal fraction (Alk.F) from *Annona tomentosa* and evaluate its *in vitro* anthelmintic activity as well as its hemolytic activity. Alk.F was obtained from the methanolic extract of the stem bark of *A. tomentosa*. The detection and identification of alkaloids in Alk.F were performed through thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-IT-MS), respectively. The evaluation of Alk.F's *in vitro* anthelmintic activity on *H. contortus* larvae was conducted through artificial exsheathment and larval development assays. Changes in the ultrastructure of *H. contortus* L3 larvae induced by Alk.F were assessed through atomic force microscopy. The *in vitro* hemolytic activity of Alk.F was evaluated by measuring the lysis of sheep erythrocytes. Among the nine predominant peaks obtained, seven alkaloids were identified in Alk.F: reticuline, reticuline N-oxide, reticuline N-oxide isomer, cyclanoline, asimilobine, tetrahydropalmatine, and anonaine. Alk.F exhibited low hemolytic activity, with only 2.7% hemolysis at 0.5 mg/mL. Additionally, it inhibited larval development and exsheathment, with 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of 0.026 mg/mL and 0.36 mg/mL, respectively. At a concentration of 0.026 mg/mL, Alk.F induced changes in the cuticle of *H. contortus* larvae, resulting in reduced adhesion and increased height. In conclusion, Alk.F demonstrates *in vitro* activity against *H. contortus* larvae, disrupting the cuticle structure, and holds potential for the development of new strategies to control this nematode.

Keywords: alkaloids; *Annona tomentosa*; nematodes; plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	16
Figura 2 - Estruturas dos alcaloides isolados e presentes em fração alcaloídica, avaliados contra helmintos.....	19
Figura 3 - Espécie <i>Annona tomentosa</i>	22

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

(EC₅₀) - Concentração de Eficiência para Inibir 50% das larvas do nematoide

(ED₅₀) - Dose Efetiva para inibir 50% das larvas do nematoide

(IBGE) - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

(IC₅₀) - concentração inibitória média

(ID) - Identificação do Artigo

(ISSN) - International Standard Serial Number

(L1) - Larvas de estágio 1

(L2) - Larvas de estágio 2

(L3) - Larvas de estágio 3

(L4) - Larvas de estágio 4

(L5) - Larvas de estágio 5

(LC-ESI-IT-MS) - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com ionização por Eletrospray

(LC-MS) - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

(MSn) - Fragmentações Em Múltiplos Estágios

(m/z) - Relação massa/carga

([M+H]) - Modo de ionização positivo

(PubChem) - National Center for Biotechnology Information

(SisGen) - Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	155
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	155
3.1.	<i>Haemonchus contortus</i>	155
3.2.	Resistência anti-helmíntica e uso tradicional de plantas no controle de helmintos..	177
3.3.	Atividade anti-helmíntica de alcaloides de plantas contra nematoides gastrointestinais.....	188
3.4.	Família Annonaceae.....	20
3.5.	Considerações sobre alcaloides pertencentes à família Annonaceae.....	21
3.6.	<i>Annona tomentosa</i>	22
3.8.	Testes para avaliação de anti-helmínticos.....	24
3.9.	Microscopia de Força Atômica (AFM).....	25
4.	OBJETIVOS.....	26
4.1.	Objetivo geral.....	26
4.2.	Objetivos específicos.....	266
	CAPÍTULO 1.....	27
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	456
6.	REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por helmintos gastrointestinais compõem o grupo das doenças tropicais negligenciadas (DTN) e representam um grave problema de saúde pública recorrente em diversas regiões do mundo. Tais infecções atingem mais de 24% da população mundial, restringindo-se às mais pobres, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Flammer *et al.*, 2020). A prevalência desse tipo de DTNs está relacionada às condições sanitárias, tais como o consumo de água não tratada e nível socioeducativo da população. Adicionalmente, menos de 1% dos estudos na área da saúde se concentram em investigar as doenças causadas por parasitas, bem como no desenvolvimento e produção de novos medicamentos voltados para o tratamento dessas enfermidades. (Valentine *et al.*, 2016).

Os problemas ocasionados por helmintos gastrointestinais também se expandem para produção de pequenos e grandes ruminantes, sendo responsável por elevadas perdas na produtividade, desencadeando a redução da produção de leite e carne, baixa fertilidade e alta taxa de mortalidade dos animais (Oliveira *et al.*, 2017). Todos esses fatores acarretam grandes prejuízos para ovinocaprinocultura, atividades de grande importância produtiva em todo o continente. No Brasil, a criação de pequenos ruminantes é dominante do ponto de vista econômico, especialmente na região Nordeste, que abriga aproximadamente 71,05% do rebanho nacional. (IBGE, 2019).

No estado do Maranhão, a criação de caprinos e ovinos desempenha um papel significativo na agricultura familiar, sendo uma contribuição essencial para a economia e o comércio local. No entanto, a produção de pequenos ruminantes é prejudicada e limitada devido às dificuldades impostas pelas doenças parasitárias (Rodrigues, 2017). Entre os principais parasitos gastrintestinais responsáveis pelas verminoses, destacam-se os gêneros: *Haemonchus* e *Trichostrongylus* (Andriola *et al.*, 2011). O nematoide gastrintestinais *Haemonchus contortus* é responsável por taxas crescentes de mortalidade em decorrência dos seus hábitos hematófagos, que desencadeiam anemia severa nos animais (Araújo, 2017).

Nos últimos anos, o controle parasitário tem sido realizado com uso de produtos químicos sintéticos em larga escala, os chamados anti-helmínticos. Contudo, o uso excessivo e inadequado desses medicamentos resultou na seleção natural de cepas resistentes, o que reduziu a disponibilidade desses fármacos. (Araújo, 2017).

Além disso, a resistência aos anti-helmínticos tem ocasionado impactos econômicos na indústria de carne, leite e seus derivados, no segmento de calçados, vestuários e pecuária mundial. Como exemplo, nos três principais países produtores de ovinos (Austrália, África do

Sul e Uruguai), as perdas devido às infecções por helmintos resistentes resultaram em prejuízos de US\$ 222 milhões, US\$ 45 milhões e US\$ 42 milhões, respectivamente (Chagas *et al.*, 2022). No Brasil, segundo IBGE (2019), as perdas estimadas por menor ganho de peso e morte ocasionada por nematoides gastrointestinais na região Nordeste são de US\$73 milhões por ano.

Dessa forma, diante da baixa eficácia dos produtos sintéticos, bem como de seu alto custo, tornou-se cada vez mais imperativa a busca por novos compostos naturais que tenham a capacidade de tratar e controlar as parasitoses, oferecendo menos riscos tanto aos animais quanto ao meio ambiente (Dos Santos *et al.*, 2021). Diversos fitoterápicos, contendo metabólitos secundários com potencial ação anti-helmínticos tem sido testado como método alternativo para o controle de nematoides gastrointestinais (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2017).

Dentre as famílias botânicas com alto teor de metabólitos secundários, destaca-se a *Annonaceae*, com cerca de 122 gêneros e 2.440 espécies. Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas a extratos, frações e óleos essenciais provenientes do gênero *Annona*, tais como antioxidante, citotóxica, antimicrobiana e antidiabética (Badmus *et al.*, 2020), antitumoral (Silva *et al.*, 2018) e atividade ovicida contra ovos de *Haemonchus contortus* (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2019).

Nesse contexto, vários compostos ativos provenientes de plantas do gênero *Annona* vêm sendo estudados em virtude da sua atividade anti-helmíntica, dentre esses pode-se citar a classe dos alcaloides, metabólicos secundários que apresentam estrutura química composta por um anel heterocíclico com um ou mais átomos de nitrogênio (Aniszewski, 2007).

No estudo conduzido por Pinheiro (2019), a espécie botânica *Annona tomentosa*, pertencente ao gênero *Annona*, foi investigada. A autora identificou a presença dos alcaloides anonaina, asimilobina e norushinsunina no extrato hidroetanólico das cascas do caule. Além disso, observou-se uma atividade moderada da fração alcaloídica contra cepas bacterianas patogênicas. No entanto, não há relatos sobre a atividade anti-helmíntica dos compostos bioativos dessa planta. Portanto, este estudo visou obter uma fração alcaloídica do caule de *A. tomentosa*, identificar alcaloides presentes e investigar atividade anti-helmíntica da fração, *in vitro*, contra o nematoide *H. contortus* assim como avaliar alterações causadas na ultraestrutura da superfície do nematoide e a citotoxicidade *in vitro* da fração.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A ampla distribuição de infecções por helmintos em humanos e em animais impacta a economia, saúde e desenvolvimento socioeconômico do país (Kajero, 2022). O impacto econômico na ovinocaprinocultura, por exemplo, deve-se majoritariamente à hemoncose, doença causada pelo nematoide *H. contortus*, que ocasiona redução nos índices de crescimento, infertilidade, perda de peso, baixa produção leiteira e aumento no índice de mortalidade de caprinos e ovinos (Mendes, 2019).

Diante de um cenário de diminuição da eficácia de produtos anti-helmínticos, principalmente, devido ao seleção de populações de nematoides resistentes à maioria dos medicamentos disponíveis no mercado, e de sérios problemas de saúde pública associado a resíduos desses medicamentos na carne, leite e no meio ambiente (Canova, 2016) faz-se necessário a demanda por novas estratégias eficazes no controle de infecções causadas por nematoides e o potencial anti-helmíntico, assim levando em consideração o potencial anti-helmíntico de algumas espécies de *Annona*, (Machado *et al.* 2015, Caldeira, 2017), ressalta-se a relevância do estudo dos alcaloides do caule de *Annona tomentosa* sobre *H. contortus*.

Portanto, tem-se como hipótese do presente estudo: a fração alcaloídica obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *Annona tomentosa* pode ter a capacidade de inibir o desenvolvimento e o desembainhamento larval de *H. contortus*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Haemonchus contortus*

O *Haemonchus contortus* é o parasito de maior importância econômica por desencadear perda significativa aos rebanhos de pequenos ruminantes, afetando a produção mundial em regiões tropicais e subtropicais (Niciura *et al.*, 2019). Pertencente ao filo dos Nematelmintos e família *Trichostrongylidae*. Possui hábito hematófago, sendo conhecido pela patogenicidade, alta morbidade e mortalidade que atinge até 40% dos animais não tratados (Santos *et al.*, 2017).

Durante o seu desenvolvimento, esse nematoide passa por diversas fases, tais como ovos, larvas e o verme adulto. A cutícula do ovo apresenta três camadas: uma vitelínica, uma quitinosa, uma formada por lipídios e algumas proteínas (Mansfield *et al.*, 1992). Os lipídeos representam o principal constituinte estrutural do ovo, permitindo a fluidez e a permeabilidade da membrana. Já as proteínas desempenham a função de comunicação entre as células, transporte e reconhecimento celular, além de contribuir para respiração das células. As larvas de estágio (L₁) apresentam forma de vírgula e possuem um esôfago reto de forma rabditoide

dando forma ao seu corpo, istmo e bulbo. As larvas de (L₂) e (L₃) são semelhantes morfologicamente, porém as larvas L₃ possuem uma camada que recobre a cutícula, chamada bainha (Minho, 2014). O desembainhamento ou perda natural da bainha ocorre após a ingestão das larvas pelos animais, pois as mudanças de pH, temperatura e a exposição ao dióxido de carbono dentro do animal estimulam a secreção de fluido rico em enzimas, promovendo a digestão da bainha e a liberação das larvas no abomaso do animal (Rogers, 1966).

O ciclo biológico do *H. contortus* (Figura 1) é dividido em duas fases: fase de vida parasitária e fase de vida livre, passando por cinco estágios larvais. A fase de vida livre se inicia com os ovos presentes no meio ambiente que eclodem num período de 2-3 h e dão origem às larvas de primeiro estágio L1, que por sua vez nutrem-se de bactérias presentes no ambiente e em até 27 h se desenvolvem em larvas de segundo estágio L2 e, posteriormente, em alguns dias, transformam-se em larvas de terceiro estágio L3 (larvas infectantes), concluída a fase de vida livre (Loria *et al.*, 2009).

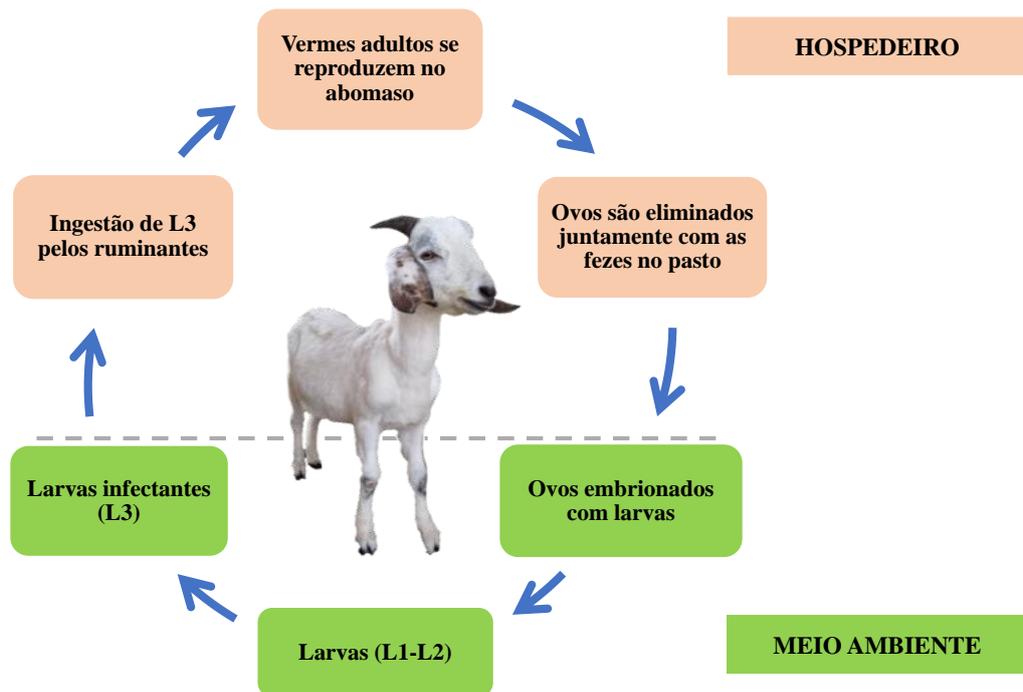


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo biológico de *Haemonchus contortus*.

Fonte: Adaptado de Sousa (2022).

As larvas infectantes presentes no pasto são ingeridas pelos animais e perdem as bainhas, assim fixam-se na mucosa do abomaso e se desenvolvem em larvas de quarto e quinto estágio (L4 e L5), respectivamente. Durante a fase parasitária, ocorre hábito de se alimentar com sangue, podendo acarretar anemia hipocromia microcítica por falta de ferro em decorrência

das lesões na mucosa nos animais hospedeiros, caracterizando a doença hemoncose, doença responsável por sérios danos à saúde do animal (Loria *et al.*, 2009). Passados alguns dias, (de 20-40 dias após a ingestão, dependendo da espécie) as larvas se tornam adultas, atingindo a maturidade sexual e prontas para se reproduzir, as fêmeas eliminam seus ovos com as fezes na pastagem, iniciando novamente o ciclo (Taylor *et al.*, 2009).

A morfologia externa deste nematoide revela um corpo longo e cilíndrico, com extremidades afiladas, sendo a cutícula espessa, predominantemente composta de colágeno, o que lhe confere robustez e proteção ao parasita, permitindo sua sobrevivência em ambientes desafiadores (Amarante, 2014). A boca do *H. contortus* é equipada com estruturas cortantes, como dentes ou placas bucais, que desempenham um papel crucial na fixação à mucosa do hospedeiro durante a alimentação (Santos *et al.*, 2014).

Internamente, o sistema digestivo é composto por uma boca, esôfago e intestino, com destaque para uma alça cecal distintiva (Amarante, 2014). No sistema reprodutivo, a espécie exibe dimorfismo sexual, com machos apresentando estruturas copulatórias específicas, como a bolsa copulatória, enquanto fêmeas possuem um útero alongado contendo ovos embrionados (Nascimento, 2013).

Estruturas sensoriais, como sensilas cuticulares, estão distribuídas ao longo do corpo do nematoide, desempenhando um papel vital na detecção de estímulos ambientais. Essa capacidade sensorial é crucial para orientar o parasita em seu ciclo de vida complexo, que envolve estágios de ovo, larva infectante, larva de vida livre e adultos (Amarante, 2014).

3.2. Resistência anti-helmíntica e uso tradicional de plantas no controle de helmintos

Os nematoides resistentes a diversas substâncias anti-helmínticas e produtos parasiticidas disponíveis comercialmente constituem um desafio permanente, não apenas no Brasil, mas em escala global (Cavalcante *et al.*, 2009). Algumas das principais classes de anti-helmínticos para o controle de nematoides gastrointestinais são: benzimidazóis e pró-benzimidazóis; imidazóis e pirimidinas; salicilanilidas e substitutos nitrofenólicos; organofosforados e lactonas macrocíclicas (Araújo, 2017). A resistência parasitária é um fenômeno que impede uma droga ativa potencialmente de manter a sua eficácia ao longo dos anos, podendo chegar ao ponto de não ter nenhuma eficiência a determinadas populações de parasitos resistentes (Coles *et al.*, 1992). A resistência é diretamente influenciada pelo grau de

infecção, diversidade da população e taxa de mutação dos genes envolvidos (Almeida *et al.*, 2010).

A utilização das plantas contra infecções por helmintos em humanos e outros animais é descrita na literatura em várias partes do mundo (Zirintunda *et al.*, 2022). As análises científicas das plantas medicinais têm fornecido à medicina moderna fármacos eficazes no tratamento de doenças ocasionados por parasitos (De Moraes, 2012). Pode-se citar como exemplos de medicamentos antiparasitários derivados de plantas: a artemisinina e cloroquina; já a anfotericina B e a ivermectina, são importantes antiparasitários isolados da bactéria *Streptomyces* (De Moraes, 2015).

Entre os metabólitos provenientes de plantas, merecem destaque os terpenos, alcaloides e compostos fenólicos (Youssef *et al.*, 2007). Esses compostos representam importantes princípios ativos que vêm sendo explorados no combate a diversos helmintos (DE MORAES, 2015).

3.3. Atividade anti-helmíntica de alcaloides de plantas contra nematoides gastrointestinais

Os alcaloides provenientes de plantas são substâncias químicas presentes em diversas espécies botânicas e têm sido amplamente estudados por suas propriedades biológicas (Chavarro *et al.*, 2020). Dentre as principais bioatividades desses compostos, destaca-se a ação contra helmintos (Lin *et al.*, 2014; Trailović *et al.*, 2015; Chan *et al.*, 2016; Chavarro *et al.*, 2020). Na figura 2, destacam-se alguns alcaloides extraídos de plantas testados contra diferentes parasitos que infectam animais.

Como exemplo, o alcaloide imidazólico episopiloturina, extraído das folhas de *Pilocarpus microphyllus* (*Rutaceae*) possui ação *in vitro* contra *S. mansoni*, levando a morte dos parasitos e impedindo a postura de ovos na concentração de 150 µg/mL (Veras *et al.*, 2012). O alcaloide sanguinarina possui alta atividade contra *S. mansoni*, resultando em 100% de mortalidade 48 h após tratamento a 3,68 µg/mL (Zhang *et al.*, 2013). Esse mesmo alcaloide apresentou atividade anti-helmíntica *in vivo* (CE₅₀ de 0,37 mg/mL⁻¹) contra *Dactylogyrus intermedius* (Wang *et al.*, 2010). A Piplartina, alcaloide presente em diversas plantas da família *Piperaceae* (De Moraes, 2015), demonstrou atividade contra vermes adultos e ovos de *S. mansoni*. Em estudo *in vivo* com camundongos infectados, a dose de 400 mg/kg de piplartina resultou em uma redução significativa de 60,4% na carga total de vermes (Mengarda *et al.*,

2020). Outros alcalóides, como a solamargina e solasonina também apresentam atividade contra *S. mansoni* (Miranda *et al.*, 2012, De Castro *et al.*, 2016).

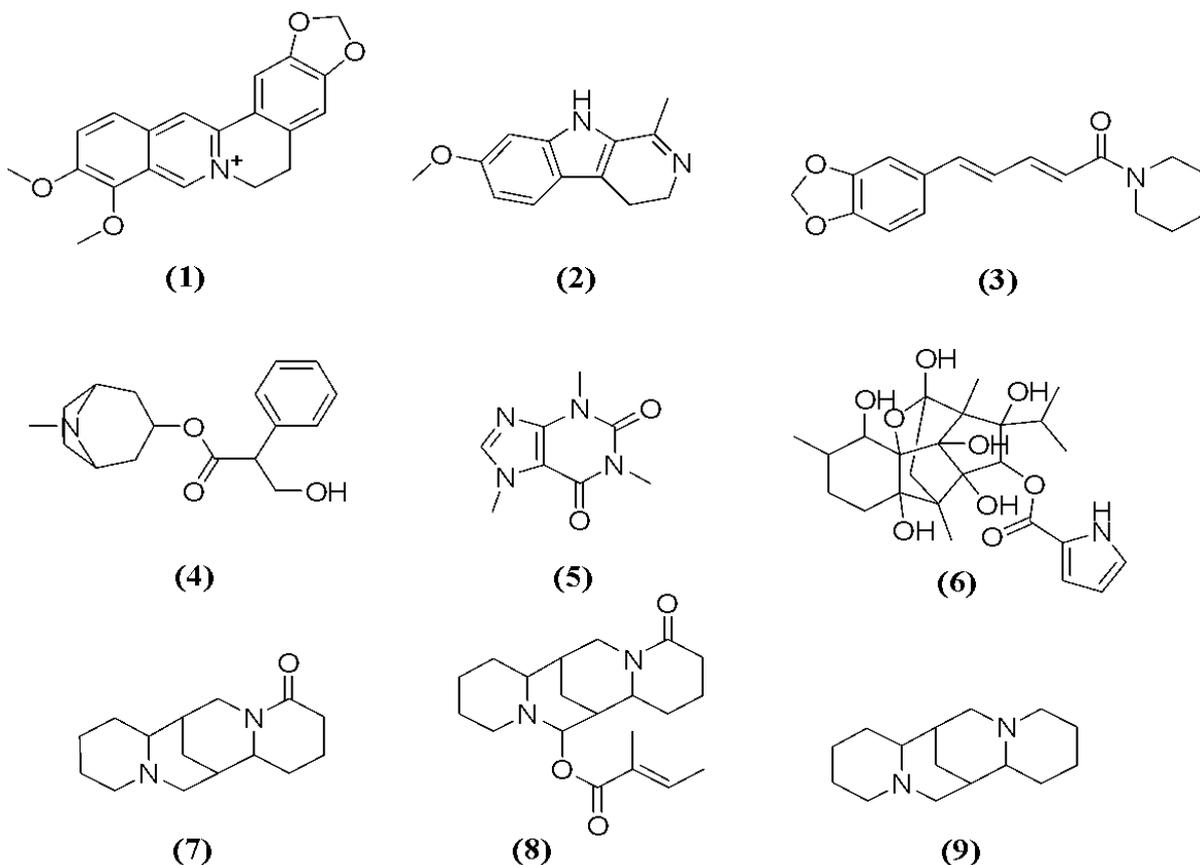


Figura 2 – Estruturas dos alcalóides isolados e presentes em fração alcaloídica, avaliados contra helmintos. Legenda: (1) Berberine, PubChem 2353; (2) Harmaline, PubChem 3564; (3) Piperine, PubChem 638024; (4) Atropina, PubChem 174174; (5) Cafeína, PubChem 2519; (6) Ryanodina, PubChem 11317883; (7) Lupanina, PubChem 91471; (8) 13-Angeloyloxy, PubChem 6427211; (9) Sparteina, PubChem 644020.

Fonte: (1) Elizondo-Luévano *et al.*, (2021); (1) (2) (3) Silva *et al.*, (2021); (4) (5) (6) Trailović *et al.*, (2015); (7) (8) (9) Dubois (2019).

Adicionalmente, a berberina tem atividade nematicida, sendo um dos principais componentes do extrato de *Argemone mexicana*. Em bioensaios anti-helmínticos *in vitro*, a berberina alcançou eficácia máxima na concentração de 1,6 µg/mL após 96 horas, contra larvas de terceiro estágio (L3) de *Strongyloides venezuelensis*, (Elizondo-Luévano *et al.*, 2021). A berberina em conjunto com harmalina e piperina foram testados *in vitro* contra ovos de

nematoides gastrointestinais (GIN) de cabra. A berberina teve concentração efetiva 50% (EC₅₀) de 1,32 mM (0,49 mg/mL), enquanto a piperina foi o composto mais ativo contra ovos com um EC₅₀ de 0,0074 mM (0,0021 mg/mL), e a harmalina (EC₅₀ = 1,6 mM - 0,34 mg/mL) apresentou ação ovicida moderada (80,30%) (Silva *et al.*, 2021).

Embora seja reconhecida a atividade de vários alcaloides contra helmintos, poucos são os relatos da ação destes compostos contra *H. contortus*. Como exemplo, uma fração alcaloídica obtida das sementes de tremoço (*Lupinus sp*), que apresentou em sua composição, os alcaloides 13-angeloiloxi e sparteine, que podem estar relacionados com a atividade da fração em causar paralisia nas larvas de *Haemonchus contortus* e *Teladorsagia circumcincta* nas concentrações 150–250 µg/mL (Dubois *et al.*, 2019).

3.4. Família *Annonaceae*

A família *Annonaceae* abrange um amplo número de espécies, totalizando cerca de 2.500, distribuídas aproximadamente em 135 gêneros (Almeida *et al.*, 2012). Encontra-se principalmente em climas tropicais e em regiões montanhosas, caatinga, savana, sendo distribuída nas Américas, África e Sudeste Asiático, onde são consumidos os seus frutos comestíveis, óleos e diversas substâncias empregadas na medicina popular (Peixoto Araújo *et al.*, 2021).

No Brasil, cerca de 32 mil espécies de angiospermas foram catalogadas, destes aproximadamente 386 pertencem à família *Annonaceae*, em sua ampla distribuição pelo território brasileiro. A maioria foi catalogada na Amazônia (259 espécies) e mais (158 espécies) são endêmicas principalmente na região da Mata Atlântica e no Cerrado (Lobão *et al.*, 2012).

A família *Annonaceae* foi catalogada por Jussieu em 1789 (Hutchinson, 1974). As suas espécies se apresentam em diferentes formas de vida vegetal (árvores, arbustos, subarbustos e lianas), além de possuírem folhas simples, alternas e dísticas, com pecíolo reduzido e sem estípulas (Lorenzi, 2002; Galastri, 2008). Possui uma diversidade de flores que podem variar em tamanho e cores, tais como esbranquiçadas, creme-amareladas, esverdeadas, alaranjadas e roxas, lembrando ao vinho (Rabêlo, 2014).

A taxonomia da família *Annonaceae* é complexa e está em constante revisão devido à descoberta de novas espécies e avanços na filogenia molecular, mas sua importância na medicina tradicional, na indústria de alimentos e na pesquisa botânica a tornam uma área de estudo fascinante (Dutra, *et al.*, 2012). A classificação taxonômica da família *Annonaceae* é baseada em características morfológicas, anatômicas e moleculares. Ela é subdividida em várias subfamílias, tribos e gêneros (Bazante *et al.*, 2020).

O gênero *Annona* é composto por mais 170 espécies, as mais comuns estão no território brasileiro, são as espécies *Annona muricata*, *Annona coriacea*, *Annona reticulata*, e *Annona squamosa* (Rabelo *et al.*, 2016). Tais espécies representam um grande valor econômico para o país, pois são fonte de frutos comestíveis, comercializados para uso *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes, além de serem utilizadas na indústria de cosméticos (Barata *et al.*, 2009).

As características que frequentemente definem os membros da família incluem folhas alternadas, simples e geralmente inteiras, flores bissexuais e frutos variando de drupas a bagas. A complexidade da taxonomia da *Annonaceae* está relacionada à variação morfológica entre suas espécies, bem como à necessidade de utilizar técnicas moleculares modernas para determinar com precisão os relacionamentos filogenéticos entre os diferentes gêneros e grupos (Schleder *et al.*, 2020).

3.5. Considerações sobre alcaloides pertencentes à família *Annonaceae*

Além do seu alto valor para indústria de alimentos, muitas espécies da família *Annonaceae* possuem indicação na medicina popular e têm sido estudadas devido às suas atividades farmacológicas e composição química. Diversos metabólitos secundários estão presentes nos extratos, frações e exsudatos provenientes das suas folhas, caules e raízes, tais como alcaloides, flavonoides, terpenoides e principalmente os diterpenos (Silva *et al.*, 2009).

Os alcaloides são compostos básicos que possuem propriedades químicas semelhantes às da amônia por apresentarem um átomo de nitrogênio que contém um par de elétrons não compartilhados. O grau de basicidade pode variar, segundo a estrutura da molécula, da presença e da localização de outros grupos funcionais (Robbers *et al.*, 1997). Por possuírem um caráter de base fraca, são convertidos na forma de sal em soluções aquosas de ácidos minerais, e quando tratados com soluções alcalinas, o nitrogênio libera o íon hidrogênio formando uma amina livre, facilitando a sua extração e isolamento de outros constituintes vegetais (Henriques *et al.*, 2003).

A família *Annonaceae* possui plantas com alta concentração de alcaloides, se destacando o gênero *Annona*. De acordo com Lúcio (2011), os alcaloides mais comumente encontrados são os dos tipos benziltetraidroisoquinolínico, benzildiidroisoquinolínico, aporfínico, pró-aporfínico, oxoaporfínico, tetraidroisoquinolínico, protoberberínico. Os alcaloides anonaina, asimilobina, liriodenina e reticulina, são do tipo benzilisoquinolínico. Eles têm sido encontrados e isolados de inúmeras espécies do gênero *Annona*, podendo ser considerados marcadores quimiotaxonômicos deste gênero (Da cruz *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2008).

Além desses, outros alcaloides têm sido descritos em algumas espécies de *Annona*. Dentre eles, pode-se citar a cafeína, encontrada nas sementes de *A. cherimola* (Leboeuf *et al.*, 1982); romucosina, xilopina e anoretina das folhas de *Annona crassiflora* (Egydio *et al.*, 2013); N-hidroxiannomontina das cascas de *Annona foetida* (Costa *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2011); metoxiannomontina da planta *Annona impressivenia* (Costa *et al.*, 2008), dentre outros.

3.6. *Annona tomentosa*

Annona tomentosa R. E. Fr é popularmente conhecida como “araticum rasteiro” ou “araticum de moita”. No Brasil, é encontrada 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) nas áreas de biomas Amazônia, Cerrado e pantanal (Carneiro *et al.*, 2017; Pinheiro, 2022).

Os frutos são comestíveis, como a maioria das espécies de *Annona*, e o chá das folhas são amplamente utilizados na medicina popular como antiinflamatório no tratamento de picadas de cobras, infecções parasitárias por piolhos em humanos, diarreias, estomatites, dentre outras doenças (Pinheiro, 2022).



Figura 3 - Espécie *Annona tomentosa*

Fonte: a autora (2023).

Há poucos estudos fitoquímicos sobre *A. tomentosa*. Santos e Salatino (2002), publicaram um dos primeiros estudos a relatar a presença de flavonoides, quercetina 3-O-glucósidos e luteolina-7-O-glicosídeo em extratos das folhas desta planta. Diterpenos, flavonoides e compostos esteroides, taninos, saponinas e alcaloides foram identificados em *A. tomentosa* (Mota 2016, Carneiro, 2017, Pinheiro, 2022).

3.7. Atividade anti-helmíntica do gênero *Annona*

Muitos extratos e compostos obtidos de espécies de *Annona* têm sido testadas contra nematoides. As plantas se defendem dos estresses bióticos e abióticos por meio de diferentes mecanismos, como por meio de compostos de defesa. Para exemplificar, sementes de *A. squamosa*, possuem compostos anti-helmínticos, contra os fitonematóides *Meloidogyne incognita* e *Bursaphelenchu xylophilus* (Dang *et al.*, 2011).

Estes compostos de defesa vegetal não têm bioatividade exclusiva sobre pragas que afetam as plantas. Por exemplo, o extrato aquoso de *Annona senegalensis* é capaz de reduzir o desenvolvimento de ovos do nematoide gastrointestinal *Haemonchus contortus* (Alawa *et al.*, 2003). Ademais, foi verificada a eficácia do extrato aquoso de *Annona muricata* contra ovos, larvas e vermes adultos de *H. contortus* (Ferreira *et al.*, 2013).

Dessa forma, diversos estudos têm demonstrado que os extratos obtidos das diferentes espécies de *Annona* exibem atividade anti-helmíntica contra parasitos intestinais, como vermes nematódeos e cestóides (Dang *et al.*, 2011; Alawa *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2013). Como mencionado antes, essa atividade tem sido atribuída a diversos compostos presentes nas plantas, como acetogeninas, alcaloides e flavonoides. Esses compostos têm a capacidade de interferir no desenvolvimento, reprodução e sobrevivência dos helmintos, resultando na diminuição da carga parasitária (Ferreira *et al.*, 2013).

Além disso, algumas espécies de *Annona* têm demonstrado efetividade sobre a eclosão de ovos de *H. contortus*, como por exemplo a espécie *A. crassiflora*. Caldeira (2017) avaliou os efeitos do extrato aquoso das folhas dessa espécie, sem o tanino, sobre a eclodibilidade e desenvolvimento larval de *H. contortus* e comprovou a eficácia a partir da concentração de 5 mg/mL superior a 90%. Machado *et al.* (2015) revelou que o extrato de folhas de *A. crassiflora* apresentou alta atividade contra *Caenorhabditi selegans* quando comparadas com o controle positivo sintético.

Os estudos dedicados à análise das espécies de *Annona* como potenciais agentes efetivos no controle de nematoides têm revelado propriedades promissoras e inovadora na

pesquisa agrícola (Ferreira *et al.*, 2013). Pesquisas indicam que as espécies de *Annona*, como *Annona muricata* e *Annona squamosa*, possuem atividades nematicidas e anti-helmínticas e nematicidas possibilitando estratégias sustentáveis e ecologicamente conscientes no manejo e controle de nematoides, um desafio significativo na agricultura contemporânea (Nugrah *et al.*, 2019). À medida que os estudos e entendimento sobre os compostos bioativos presentes nas *Annonaceae* e seu impacto sobre os nematoides, torna-se cada vez mais evidente que essas plantas têm o potencial de se tornar uma alternativa valiosa aos métodos convencionais de controle dessa classe de parasitos (Nunes *et al.*, 2012). Além disso, a exploração dessas espécies pode contribuir para a redução do uso de agentes químicos sintéticos, promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis e benéficas para o meio ambiente (Ferreira *et al.*, 2013).

3.8. Testes para avaliação de anti-helmínticos

Os testes *in vitro* são amplamente utilizados em parasitologia veterinária e tem como finalidade avaliar a prospecção de novos agentes anti-helmínticos sobre o ciclo de vida do nematoide (Costa *et al.*, 2002, Vasconcelos *et al.*, 2007). O Testes de Inibição de Desenvolvimento (Jackson e Gordon, 2008), por exemplo, têm a vantagem de economizar tempo e dinheiro, visto que os compostos ou materiais a serem testados são colocados diretamente com os diferentes estágios do ciclo de vida do parasita (Ferreira *et al.*, 2013).

Esse teste tem grande significância para estudos referentes a resistência das drogas benzimidazóis e levamisol, por sua vez, também tem aplicação a pesquisa de extratos ou frações com atividade biológica, sendo um dos testes mais utilizados (Costa *et al.*, 2002). Sabe-se que os nematoides possuem organismo complexo, em que o equilíbrio dinâmico entre seus diversos sistemas orgânicos é imprescindível ao seu desenvolvimento, assim os compostos que tenham a capacidade de comprometer qualquer ponto que desestabilize a homeostase desses sistemas, podem ser identificados facilmente através desse teste (Jackson e Gordon, 2008).

Mesmo sendo um teste de alta acurácia, sua implantação no estudo da resistência aos antiparasitários ou mesmo em ensaios de bioprospecção sofrer limitações, pois o longo período de incubação faz com que poucos laboratórios tenham utilizado este teste como uma triagem primária *in vitro*. Além disso, o Testes de desenvolvimento larval é mais usual a as espécies de helmintos de ovinos e caprinos, suínos e eqüinos no entanto, para nematoides de bovinos é pouco descrito na literatura e os mesmos se restringem ao gênero *Cooperia* (Taylor, 1990; Oliveira 2017).

Outro teste *in vitro* de grande importância é o teste de desembainhamento larvar Artificial que utiliza L3 em um processo que objetiva examinar o efeito dos compostos testados

sobre a perda da cutícula induzida pela exposição ao hipoclorito de sódio diluído. As larvas devem apresentar uma perda de cutícula progressiva ao exame de microscópio óptico. Para o material controle, 100% das larvas devem perder a cutícula entre 60 à 70 minutos (Brunet e Hoste, 2006). A compreensão aprofundada dos mecanismos de inibição do desembainhamento larvar permitirá o desenvolvimento de estratégias mais eficientes e duradouras, considerando a evolução potencial da resistência. A inibição do desembainhamento larvar de *H. contortus* representa, assim, um campo dinâmico de pesquisa com implicações significativas na saúde animal, bem-estar pecuário e sustentabilidade econômica da produção de ovinos (Paiva e Freitas, 2018).

3.9. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) é uma forma de microscopia de varredura avançada por sonda que fornece imagens com resolução quase atômica para medir a topografia da superfície (Pinto *et al.*, 2013). AFM também é conhecida como microscopia de varredura por sonda, pois é capaz de quantificar a rugosidade superficial de amostras até a escala angstrom (Ferreira, 2006).

Essa técnica, apresenta uma imagem de superfície e medições quantitativas de tamanhos de recursos, como alturas de degraus e outras dimensões. Além disso, modos avançados de medições de microscopia de força atômica permitem o mapeamento qualitativo de várias outras propriedades físicas, como adesão, módulo, distribuição de dopantes, condutividade, potencial de superfície, campo elétrico e domínios magnéticos (Aliofkhazraei, 2014). AFM é uma ferramenta incrivelmente útil para caracterização e análise de materiais em muitas disciplinas, incluindo biologia, química e física (Aliofkhazraei, 2014). Alguns estudos demonstraram que a AFM é uma ferramenta versátil e estabelecida para estudar as propriedades superficiais de espécimes biológicos, tais como importantes parâmetros de superfície de apenas algumas espécies de nematoides (Haase *et al.*, 2015).

Costa júnior *et al.*, (2020) relata, pela primeira vez, a caracterização topográfica e biomecânica de ovos, larvas e cutículas adultas de *H. contortus* por AFM, revelando estruturas nunca antes vistas com outras técnicas de microscopia. Outro estudo realizado por SOARES *et al.*, (2021), demorou através de AFM um mecanismo por trás do peptídeo RcAlb-PepIII contra o nematoide *H. contortus*, demonstrando uma alteração na estrutura e em decorrência da alta afinidade de RcAlb-PepIII com a cutícula de *H. contortus* no estágio L2. Esses estudos comprovam a eficácia da AFM para fornecer achados sobre a morfologia biofísica das superfícies de vermes em seus diferentes estágios de vidas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar atividade anti-helmíntica de uma fração alcaloídica extraída das cascas do caule de *Annona tomentosa* sobre o nematoide *H. contortus*, bem como possível atividade hemolítica frente a eritrócitos de carneiro.

4.2. Objetivos específicos

- ❖ Identificar alcaloides majoritários de uma fração alcaloídica das cascas do caule de *A. tomentosa*;
- ❖ Avaliar se a fração alcaloídica, extraída de cascas do caule de *A. tomentosa*, promove algum efeito deletério ao nematoide gastrintestinal *H. contortus*;
- ❖ Examinar, por microscopia de força atômica, se há modificações ultraestruturais da superfície das larvas de *H. contortus*, após tratamento com a fração alcaloídica extraída de cascas do caule de *A. tomentosa*;
- ❖ Avaliar se fração alcaloídica, das cascas do caule de *A. tomentosa*, possui atividade hemolítica frente a eritrócitos de carneiro.

CAPÍTULO 1

An alkaloidal fraction of *Annona tomentosa* possesses anthelmintic activity and induces surface modifications in *Haemonchus contortus*

Abstract

The nematode *Haemonchus contortus* is the parasite that is responsible for most mortality of small ruminants, causing significant economic losses. Numerous plant-derived compounds have exhibited promising anthelmintic activities against this nematode. Notably, the *Annona* genus stands out for demonstrated anthelmintic effects by extracts from several of its species against different nematodes. This study aimed to assess the effect of an *Annona tomentosa* fraction, rich in alkaloids, on *H. contortus*. This fraction, named Alk.F, is derived from the methanolic extract of the plant's stem bark. Chemical characterization of Alk.F was performed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Among the nine predominant peaks obtained, seven alkaloids were identified: reticuline, reticuline N-oxide, reticuline N-oxide isomer, cyclanoline, asimilobine, tetrahydropalmatine and anonaine. Alk.F inhibited the larval development of *H. contortus* with an IC₅₀ of 0.026 mg/mL, inhibited larval exsheathment with an IC₅₀ of 0.38 mg/mL, and displayed low hemolytic activity towards sheep erythrocytes. Furthermore, atomic force microscopy revealed that Alk.F altered adhesive forces and the height profile on the surface of *H. contortus* larvae. In conclusion, *A. tomentosa* alkaloids alter the cuticle structure of *H. contortus*, inhibiting larval development and exsheathment, thus offering possibilities for contributing to the development of new anthelmintic drugs.

Keywords: *Anthelmintic; atomic force microscopy; plant products*

1. Introduction

Gastrointestinal nematode infections impact human and animal health, with *Haemonchus contortus*, a parasite of small ruminants, exerting globally significant economic consequences (Borges et al., 2013; Martínez-Valladares et al., 2013; Wang et al., 2017). Given the increasing emergence of resistance in *H. contortus* populations to conventional anthelmintic drugs (Gilleard, 2013), there is an urgent demand for the development of novel potent medicines to mitigate the associated economic losses and animal welfare concerns (Sargison, 2016).

Plant-derived compounds have demonstrated anthelmintic properties against *H. contortus*, prompting intensified exploration as potential sources for such activity (Manjusa et al., 2022). Many alkaloids, such as piplartine, epiisopiloturine, solamargine, and solasonine, have demonstrated anthelmintic efficacy (Mengarda, et al., 2020; De Moraes, 2015; De Moraes et al., 2011; Guimaraes et al., 2014; Miranda et al., 2012).

Annona tomentosa, a plant species belonging to the *Annonaceae* family, is native to the Brazilian Amazon, Cerrado, and Pantanal (Carneiro et al., 2017). While previous research has highlighted its anti-nociceptive and anti-inflammatory properties in leaf extracts (Carneiro et al., 2017), there is, to the best of our knowledge, a lack of information on its other biological effects, particularly its impact on nematodes.

Given the scientific and economic significance of developing effective compounds against *H. contortus*, this study aimed to obtain an alkaloidal fraction of *A. tomentosa* leaves and verify its *in vitro* efficacy on *H. contortus*, enhancing our understanding of its therapeutic potential and paving the way for the development of novel treatments of animal gastrointestinal nematode infections.

2. Methodology

2.1 Obtaining the alkaloidal fraction

Stem barks of *A. tomentosa* were collected in the municipality of Vargem Grande (03°32'06.0" S and 43°56'48.7" W), Maranhão, Brazil. The plant was identified at the Rosa Mochel Herbarium of the State University of Maranhão (UEMA), with specimen voucher number 3773. The collection was performed under the authorization of the Brazilian government under number SISGEN A039D1F.

Plant material was cleaned, dried and pulverized. The obtained powder (1350.0 g) was subjected to maceration with methanol (3.80 L). The resulting powder, obtained after

evaporating to dryness under a vacuum and subsequent lyophilization, was dissolved in water/methanol (7:3) (100 mL) and acidified to pH 2.0 using a 37% HCl solution. After ethyl ether partitioning (100 mL), and pH adjustment of the remaining aqueous phase to 11 with 10% NH₄OH, the solution underwent CHCl₃ partitioning (3x 100 mL), resulting in the alkaloid fraction Alk.F which was rota-evaporated and lyophilized (Tavares et al., 2005). Alkaloid presence was confirmed using thin layer chromatography (TLC) with Dragendorff developer (Matos, 1997).

2.2 Chemical characterization of alkaloids from the stem bark of *Annona tomentosa*

Alkaloids present in Alk.F were characterized by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization (LC-ESI-IT-MS), using a 5 µm C18 (pore size: 100 Å) column (250 x 4.6 mm). The binary gradient mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in methanol (solvent B). Compounds were eluted from the column with a 40 min gradient ranging from 5% to 100% solvent B at a 1 mL/min flow rate. The column compartment temperature was set to 40 °C.

Data acquisition was performed in positive ionization mode with fragmentation in multiple stages (MSⁿ), using the following parameters: nebulization gas pressure, 50.0 psi; capillary temperature, 300 °C; transfer capillary input voltage, -4500 V; desolvation gas, Nitrogen (N₂), flow 10 L/min; collision gas, helium (He); range acquisition, *m/z* 50-1200. The raw data were analyzed using Data Analysis 4.3 software (Bruker®). Compounds were identified after fragmentation mechanisms in positive mode, comparing mass spectral data from the literature.

2.3 *In vitro* assays on *Haemonchus contortus*

2.3.1. Larval exsheathment inhibition assay

The effect of Alk.F on *H. contortus* larval exsheathment was determined as described by Bahuaud et al. (2006), in quadruplicate. First, 2 mg of the alkaloid fraction was diluted in 1 mL PBS (4.76 mM Na₂HPO₄; 1.76 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl), pH 7.2 and assessed at concentrations ranging from 0.062 to 1 mg/ mL. The samples were incubated with 100 L3 larvae of *H. contortus* at 21 °C and 80% relative humidity for 3 h. After three washes in distilled water with centrifugation at 2540 × *g* for 3 min, artificial exsheathment was induced by adding 160 µL of 2% (v/v) sodium hypochlorite solution. Lugol's iodine solution was added every 20 minutes to stop the exsheathment. Larvae treated with PBS were used as a control.

The larval exsheathment was monitored by optical microscopy (40×) (Carl Zeiss). The percentage of sheathed larvae was identified at 20-minute intervals for 60 minutes. The IC₅₀ was estimated using the data at the end of the experiment (60 min) and the data of inhibition of exsheathment (100 – percentage of sheathed larvae).

2.3.2. *In vitro* inhibition on larval development

The effect of Alk.F on the development of *H. contortus* larvae was evaluated according to Hubert and Kerboeuf (1992). The Alk.F was dissolved in PBS, pH 7.2, and used in the assay at final concentrations ranging from 0.001 to 1.0 mg/mL.

To obtain first-stage (L1) larvae, the eggs were incubated in 96-well plates with distilled water for 24 hours at 27 ± 1 °C. Subsequently, a nutritive medium, which contained lyophilized *Escherichia coli* (Sigma), yeast extract, and Earle's balanced salt solution, along with Amphotericin B, was added to the wells. Samples of Alk.F were then added to the wells. PBS was used as a control. After 5 days of incubation, the number of L1 and L3 larvae in each well was counted using an inverted microscope. Experiments were performed in quadruplicate.

2.4 Hemolytic effect of *A. tomentosa* alkaloids

The hemolytic activity of *A. tomentosa* alkaloids on sheep erythrocytes was evaluated according to Oliveira et al. (2019). The study adhered to ethical standards and animal welfare guidelines established by the Ethics Committee on Animal Experimentation of UFMA, Brazil, under protocol 23115.002637/2023-43.

Sheep blood (10 mL) was collected in an EDTA-containing tube and subjected to three washes with 0.15 M NaCl. Red blood cells (RBC) were recovered by centrifugation (Mikro 200R centrifuge, Hettich, Germany) at 300 x g for 5 min at 4 °C and resuspended in 0.15 M NaCl. Aliquots (100 µL) of a 2.5% RBC suspension were incubated for 30 min at 37 °C with 100 µL of the alkaloid fraction at concentrations ranging from 0.001 to 1.0 mg/mL. After centrifugation at 300 x g for 5 min at 4 °C, the supernatant (100 µL) was transferred to flat-bottom 96-well culture plates, and hemolysis (%) was calculated by measuring the absorbance at 490 nm using an automated microplate reader (Epoch, BioTek Instruments Inc., USA).

The negative (0%) and positive (100%) controls for hemolysis used PBS and 0.1% (v/v) Triton X-100, respectively. Hemolysis was calculated as $[(\text{Abs}_{490\text{nm}}$ from Alk-F treated RBC – $\text{Abs}_{490\text{nm}}$ from RBC treated with PBS) / ($\text{Abs}_{490\text{nm}}$ from RBC treated with 0.1% Triton X-100 –

AbS_{490nm} of RBC treated with PBS)] x 100 (Silva et al., 2016). Experiments were conducted in triplicate.

2.5 Ultrastructural and nanomechanical characteristics of *Haemonchus contortus* larvae treated with Alk.F

The larval development assay (Section 2.3.2 of the methodology) was conducted to assess the topography and mechanical characteristics of *H. contortus* L3 treated with Alk.F from *A. tomentosa* (IC₅₀: 0.026 mg/mL). The control group consisted of larvae treated with PBS, pH 7.2. L3 was collected and fixed in 5% formalin (Costa-Júnior et al., 2020). AFM measurements were performed in three representative *H. contortus* L3 using a Multimode 8 microscope (Bruker, Santa Barbara, CA) in PeakForce Tapping Quantitative Nanomechanics mode, using probes model SCANASYST-AIR (Bruker), with nominal spring constant of 0.4 N/m and nominal tip ratio of approximately 2 nm. However, the thermal noise method measured the actual spring constant of each probe used in this work. Images were taken at the center region of L3, with a size of 1x1 µm and 5x5 µm. The resolution of images was 256 lines per sample. Topographic images and data on height and adhesion were obtained through ASCII matrices (Costa-Júnior et al., 2020).

2.6 Statistical analysis

For the exsheathment, larval development and hemolytic assay tests, data were expressed as mean ± standard deviation. The exsheathment and larval development tests were analyzed by Analysis of Variance (one-way ANOVA), followed by Student test ($p < 0.05$). To obtain the IC₅₀ values, the results were initially transformed to log (X), and the percentage was normalized; subsequently, non-linear regression was performed using GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). AFM data were analyzed using D'Agostino & Pearson for normality, and the means were compared using the Kolmogorov-Smirnov test ($P < 0.05$).

3. Results

3.1 Alkaloids from the stem bark of *A. tomentosa*

The chromatographic profile of Alk.F revealed nine main peaks (Figure 1), with complete separation of all major components at 35 min. Utilizing chemical characterization through LC-ESI (+)-IT/MS, seven alkaloids were successfully identified, while compounds 7

and **8** remained unidentified. Supplementary Table 1 provides information on the retention time, fragmentation, and identification of the compounds detected in positive mode, aligned with existing literature references. The chemical structures are available in Supplementary Figure 1.

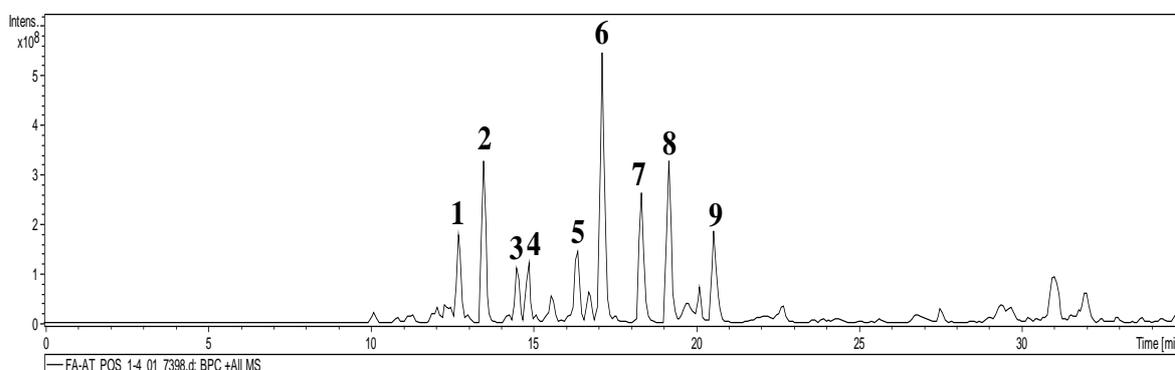


Figure 1. Total ion chromatogram of the alkaloid fraction. Peaks: 1. reticuline *N*-oxide; 2. reticuline; 3. cyclanoline; 4. reticuline *N*-oxide isomer; 5. asimilobine; 6. tetrahydropalmatine; 7. unidentified; 8. unidentified; 9. anonaine.

3.2 *In vitro* anthelmintic assays on *H. contortus* and hemolytic effect of *A. tomentosa* alkaloids

The Alk.F from *A. tomentosa* significantly inhibits the *in vitro* larval exsheathment process of *H. contortus* (Figure 2A) with an IC_{50} value of 0.38 mg/mL (confidence interval, CI: 0.25 - 0.53 mg/mL). Additionally, Alk.F inhibits larval development, with an IC_{50} value of 0.026 mg/mL (CI: 0.021 - 0.031 mg/mL) (Figure 2B).

The hemolytic activity of Alk.F towards sheep erythrocytes was minimal, with only 2.7% hemolysis at the highest concentration tested (1.0 mg/mL) (Figure 2B).

3.3 Ultrastructural and nanomechanical characteristics of *Haemonchus contortus* larvae treated with Alk.F

In this study, treatment with Alk.F at the IC_{50} concentration of 0.026 mg/mL induced cuticular changes in third-stage larvae (L3) of *H. contortus* (Figure 3), as measured by AFM. Mean adhesion values were 21.3 (\pm 14.8) for the control group and 11.5 (\pm 11.0) for the treated group, while mean height measurements were 53.3 (\pm 30.8) for the control group and 270.9 nm (\pm 157.3) for the treated group.

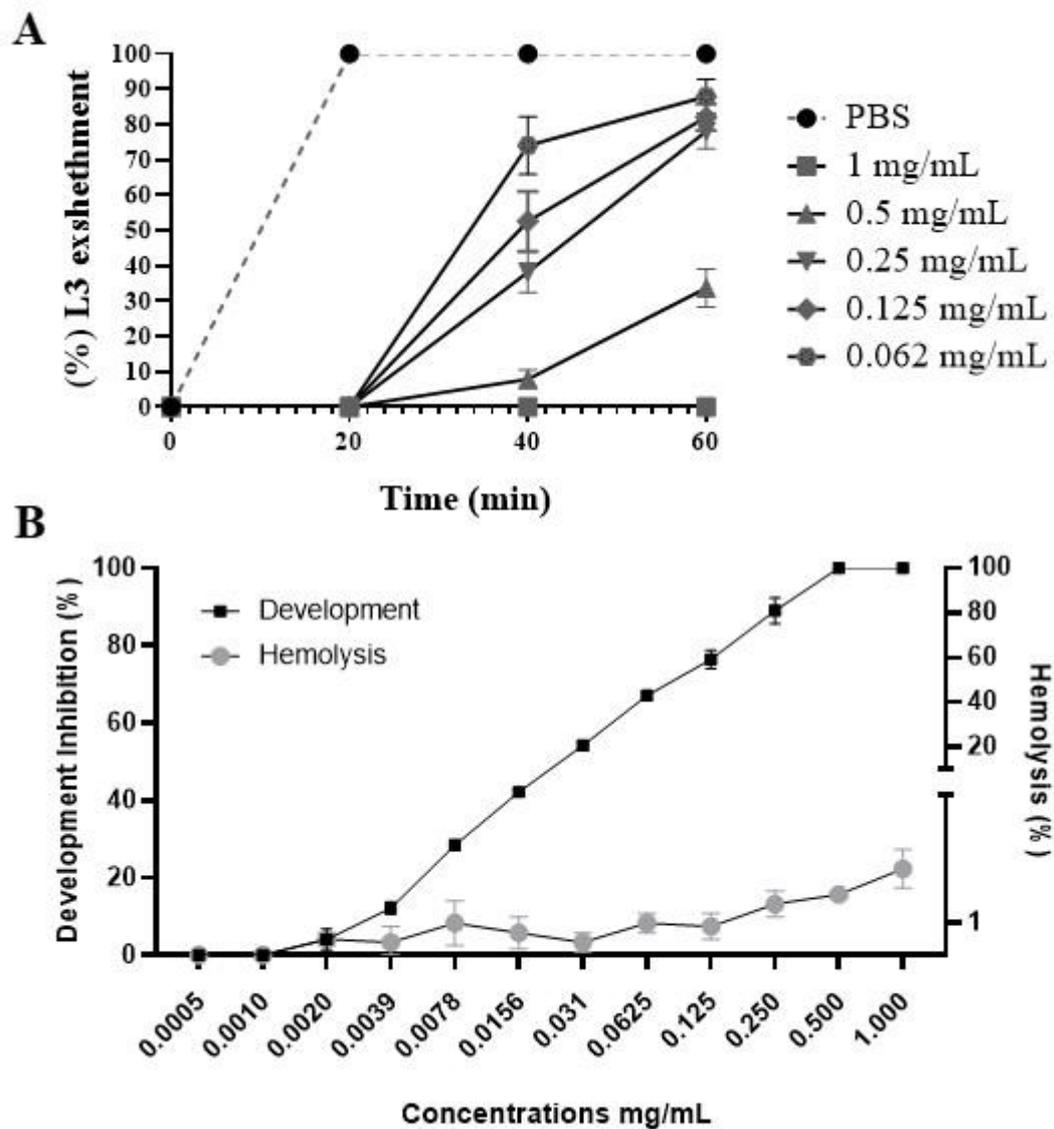


Figure 2. *In vitro* effects of Alk.F on (A) unsheathing of third stage (L3) larvae of *H. contortus*; (B) development of *H. contortus* larvae and integrity of sheep erythrocytes after a hemolysis assay.

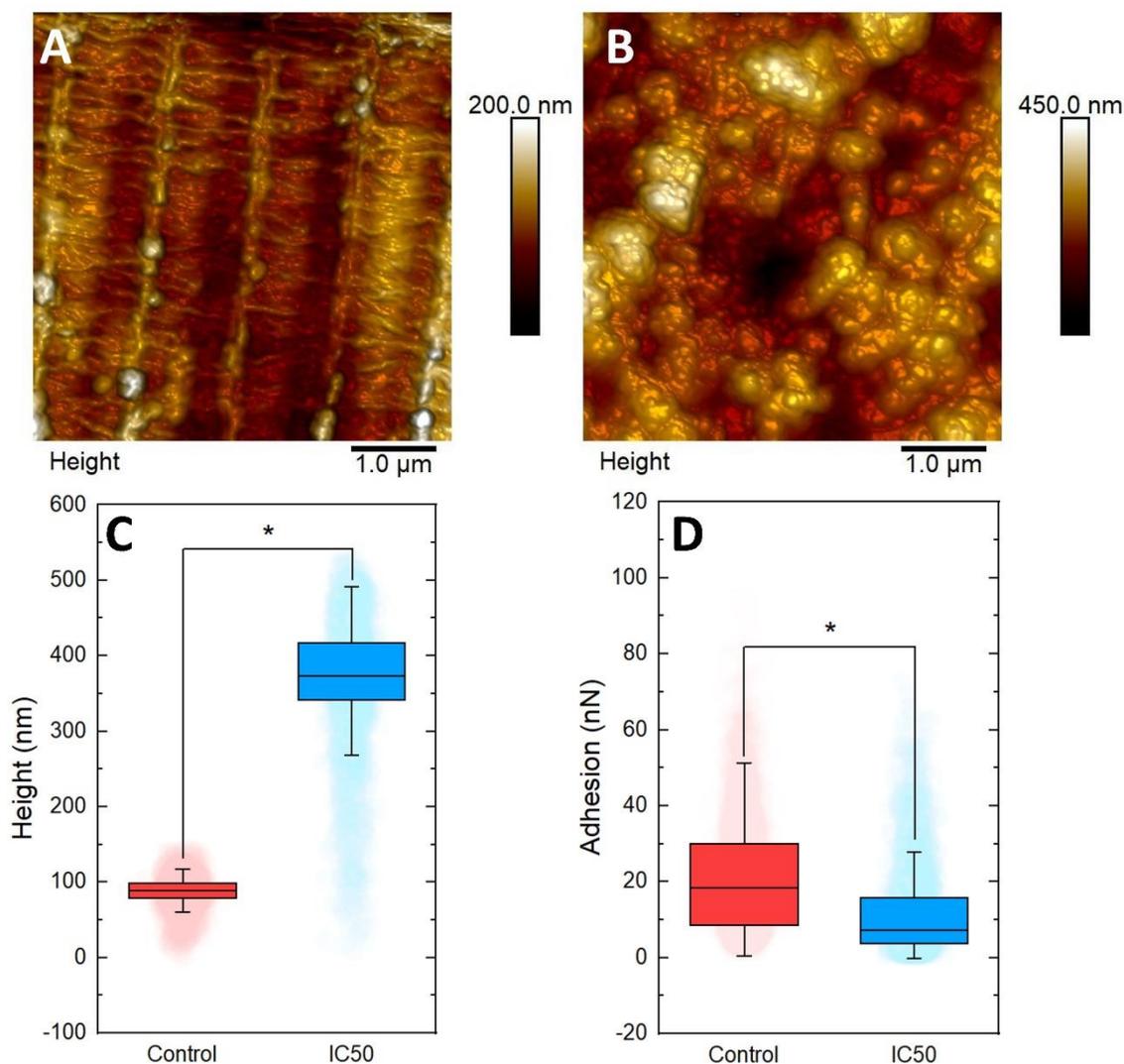


Figure 3. Effect of Alk.F at the IC₅₀ concentration of 0.026 mg/mL on third-stage larvae (L3) of *H. contortus* by atomic force microscopy (AFM). Topographic images of PBS control (A) and Alk.F treated larvae (B). In the images, lower structures appear as darker regions, while lighter regions represent higher structures. The box plot shows adhesion (C) and height (D), with statistical significance denoted by * $p < 0.05$.

4. Discussion

Considering the importance of control strategies for small ruminant gastrointestinal nematodes, this study assessed the effect of an *A. tomentosa* fraction, rich in alkaloids, on *H. contortus*.

Seven alkaloids were identified in Alk.F (Supplementary Figure 1; Supplementary Table 1). Compound **1** was proposed as reticuline *N*-oxide with molecular ion m/z 691 [2M+H]⁺, and a molecular formula C₁₉H₂₄NO₅. The loss of -79 Da resulted in the ion fragment

m/z 267, corresponding to the *N*-methyl *N*-oxide (-47 Da) and CH₃OH (-32 Da) moieties. Fragment ions at m/z 192, 175, and 137 were also observed and associated with vicinal methoxy and hydroxy groups of the A ring. Compound **4**, following a similar fragmentation pattern, was suggested as an isomer of reticuline *N*-oxide. Compound **2** was suggested as reticuline with a molecular ion m/z 330 [M+H]⁺, and a molecular formula C₁₉H₂₄NO₄. Fragment ions at m/z 192 and 175 were attributed to the loss of the isoquinoline and phenyl portion of the deaminated ion (m/z 299), respectively.

Compound **3**, m/z 342 (C₂₀H₂₄NO₄), generated a fragment ion in m/z 311 due to a loss of -31 Da, associated with the methoxy group (-OCH₃). The ion fragment at m/z 192 potentially formed through a Retro-Diels-Alder (RDA) reaction. Therefore, the compound was proposed to be cyclanoline. Two aporphine alkaloids commonly found in *Annona* species were also identified. Compounds **5** and **9**, m/z 268 [M+H]⁺ and m/z 266 [M+H]⁺, respectively, are suggested to be asimilobine (C₁₇H₁₈NO₂) and anonaine (C₁₇H₁₆NO₂). Asimilobine was observed in fragment ions at m/z 251, 219, and 191, indicating the loss of NH₃, CH₃OH, and CO, respectively. For aporphine alkaloid anonaine, fragment ions at m/z 249, 219, and 191 were observed, representing the initial loss of the amine group and CH₂O and CO groups. Compound **6** was identified as tetrahydropalmatine (C₂₁H₂₆NO₄). Fragment ions resulting from Retro-Diels-Alder (RDA) and B ring cleavage were observed at m/z 192 and m/z 165, respectively.

The compounds in the Alk.F fraction were previously documented in the genus *Annona*. Reticuline *N*-oxide, cyclanoline, and reticuline demonstrated antimicrobial, antibacterial, antitumor activities, as reported in the literature (Dembitsky et al., 2015; Fadaeinasab et al., 2015), and tetrahydropalmatine is known for its anthelmintic effect against *Raeillietina echinobothrida*, a tapeworm known to infect domestic birds (Das et al., 2009).

The Alk.F inhibited the *in vitro* larval exsheathment (Figure 2A) and larval development (Figure 2B). It is known that the inhibition of sheath loss in *H. contortus* larvae disrupts the parasite's life cycle, preventing infection in the host (Bahuaud et al., 2006; Alonso-Díaz et al., 2011). Several studies have documented the anthelmintic activity of various *Annona* species (Ngwewondo et al., 2019; Machado et al., 2015; Kamaraj and Rahuman 2011). For instance, (-)-anonaine and (-)-asimilobin, at 100 μM, caused 100% lethality to *Hymenolepis nana* (Lin et al., 2014). However, to the best of our knowledge, this study presents the first report on the identification of an alkaloids-rich *Annona* fraction (Alk.F, containing reticuline *N*-oxide, reticuline, cyclanoline, reticuline *N*-oxide isomer, asimilobine, tetrahydropalmatine, and anonaine) with activity against *H. contortus*.

Following future isolation and individual testing of each alkaloid to identify the active constituent(s) within Alk.F, and to explore potential synergistic effects, as well as conducting *in vivo* experiments, the alkaloidal fraction identified holds potential for the development of novel drugs. The constituent(s) may also be considered for combination with existing anthelmintic drugs to enhance their efficacy.

In vitro hemolytic assays, serving as an initial toxicity model, was used to evaluate a drug's ability to cause damage to the RBC membrane (Lustosa et al., 2016). In this study, the Alk.F displayed only 2.7% hemolysis at the highest concentration tested (Figure 2B). Values below 5% typically indicate low cytotoxicity to erythrocytes (Moreno et al., 2018; Oliveira et al., 2021). *In vitro* cytotoxicity tests have been employed to evaluate the potential adverse effects of natural anthelmintics (Tchetan et al., 2022; Aziz et al., 2014) and hold significant importance in the early stages of drug development (Niles et al., 2008; Li et al., 2015). Nevertheless, further *in vivo* investigations are essential to ascertain the toxicological profile of Alk.F and/or its constituent alkaloids.

The treatment with Alk.F caused reduced adhesion forces and increased height profile in the larval surface. Recently, AFM was also used to analyze the anthelmintic mechanism of a synthetic peptide against *H. contortus*, revealing alterations in cuticle structure (reduced adhesion and height), and deposition of the peptide on the nematode surface (Soares et al., 2021). Considering that the alkaloids berberine (1.0 mg/mL) and piperine (0.03125 mg/mL) induce the formation of aggregates on the surface of first-stage larvae (L1) of gastrointestinal nematodes in goats, including *H. contortus* (56.4%) (Da Silva et al., 2021), it is suggestive that Alk.F may also interact with the nematode surface, potentially interfering with the development of the larvae.

Plant compounds can have diverse effects on nematode cuticles. For instance, methanolic extracts of *Rumex crispus* induce cuticle depression in *Caenorhabditis elegans* at 2 mg/mL (Idris et al., 2022), despite causing only a slight decrease in adult viability. While previous studies have explored alkaloids' impact on gastrointestinal nematodes (Gill and Lacey, 1993; Ademola et al., 2009; Aderibigbe et al., 2021; Da Silva et al., 2021), this study demonstrates the inhibition of *H. contortus* larval development and unsheathing by an *A. tomentosa* alkaloidal fraction, along with ultrastructural alterations on the nematode's surface.

Considering the inhibitory effect of alkaloids from a plant methanolic extract on *H. contortus* larval development and the *in vivo* effects, along with the known activity of various nutraceuticals and commercial drugs on nematodes (Mravčáková et al., 2019; Dubois et al.,

2019), Alk.F emerges as a lead for anthelmintic drug development. Future investigations should be conducted to isolate and individually identify each Alk.F constituent alkaloid and to evaluate potential synergistic effects, besides testing their *in vivo* activity alone or in combination with each other and with existing anti-helminthic drugs.

5. Conclusion

This study has demonstrated the *in vitro* anthelmintic efficacy of an alkaloidal fraction derived from *A. tomentosa* against *H. contortus*, with alterations in the cuticle structure and minimal cytotoxicity as preliminarily assessed on sheep RBCs. Consequently, these alkaloids present a promising avenue for the development of novel anthelmintic drugs.

6. References:

- Ali, R., Rومان, M., Mussarat, S., Mussarat, S., Norin, S., Ali, S., Adnan, M., Khan, S.N., 2021. A Systematic Review on Comparative Analysis, Toxicology, and Pharmacology of Medicinal Plants Against *Haemonchus contortus*. *Front Pharmacol.*12, 1-30.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2011. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 181. 2-4, 360-364.
- Ademola, I.O., Fagbemi, B.O., Idowu, S.O., 2009. Bioseparation and activity of *Khaya senegalensis* fractions against infective larvae of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 165, 170-174.
- Aderibigbe, S.A., Idowu, S.O., Olaniyi, A.A., Wright, C.W., Fatokun, A.A., 2021. Bioactivity and cytotoxicity profiling of vincosamide and strictosamide, anthelmintic epimers from *Sarcocephalus latifolius* (Smith) Bruce leaf. *J. Ethnopharmacol.* 265, 113142.
- Aziz, A., Raju, G.S., Das, A., Ahmed, J., Moghal, M.M.R., 2014. Evaluation of *in vitro* anthelmintic activity, total phenolic content and cytotoxic activity of *Crinum latifolium* L. (Family: Amaryllidaceae). *Adv Pharm Bull.*4, 1-15.
- Borges, F.A., Almeida, G.D., Heckler, R.P., Lemes, R.T., Onizuka, M.K.V., Borges, D.G.L., 2013. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. *Trop Anim Health Prod.*, 45, 723-727.

- Bahuaud, D., De Montellano, C.M.O., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology*. 132, 545-554.
- Carneiro, L.U., Silva, I.G., Souza, M.E.A., Côrtes, W.S., Carvalho, M.G., Marinho, B.G., 2017. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of leaf extracts from *Annona tomentosa* R.E.Fr. *J Integr Med* 15, 379-387.
- Carrara, V. S., Vieira, S. C. H., De Paula, R. G., Rodrigues, V., Magalhães, L. G., Cortez, D. A. G., & Da Silva Filho, A. A., 2014. *In vitro* schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of Piper species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). *J Helminthol*. 88(3), 321-326.
- Costa-Junior, L.M., Silva, C.R., Soares, A.M., Menezes, A.S., Silva, M.R., Amarante, A.F., Alencar, L.M., 2020. Assessment of biophysical properties of *Haemonchus contortus* from different life cycle stages with atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 209, 112862.
- Demeler, J., Küttler, U., Von Samson-Himmelstjerna, G., 2010. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastrointestinal nematodes of cattle. *Vet. Parasitol*. 170, p. 61-70.
- Dembitsky, V.M., Glorizova, T.A., Poroikov, V.V., 2015. Naturally occurring plant isoquinoline N-oxide alkaloids: Their pharmacological and SAR activities. *Phytomedicine*, 22, 183-202.
- Das B., Tandon, V., Lyndem, L.M., Gray, A.I., Ferro, V.A., 2009. Phytochemicals from *Flemingia vestita* (Fabaceae) and *Stephania glabra* (Menispermaceae) alter cGMP concentration in the cestode *Raillietina echinobothrida*. Part C: Toxicology and Pharmacology (CBPC) 149, 397-403.
- Da Silva, G.D., De Lima, H.G., De Sousa, N.B., De Jesus Genipapeiro, I.L., Uzêda, R.S., Branco, A., Botura, M.B., 2021. *In vitro* anthelmintic evaluation of three alkaloids against gastrointestinal nematodes of goats. *Vet. Parasitol* 296, 109505.
- Dubois, O., Allanic, C., Charvet, C.L., Guégnard, F., Février, H., They-Koné, I., Sallé, G., 2019. Lupin (*Lupinus* spp.) seeds exert anthelmintic activity associated with their alkaloid content. *Sci Rep*. 9, 9070.

- De Moraes, J., Nascimento, C., Lopes, P. O., Nakano, E., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., & Kawano, T., 2011. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of pipartine. *Exp Parasitol.* . 127(2), 357-364.
- De Moraes, J., 2015. Natural products with antischistosomal activity. *Future Med Chem.* 7(6), 801-820.
- Fadaeinasab, M., Taha, H., Fauzi, P.N.M., Ali, H.M., Widyawaruyanti, A., 2015. Anti-malarial activity of isoquinoline alkaloids from the stem bark of *Actinodaphne macrophylla*. *Nat Prod Commun.* 10, 1934578X1501000913.
- Gilleard, J.S., 2013. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology.* 140, 1506-1522.
- Guimaraes, M. A., Campelo, Y. D., Veras, L., Colhone, M. C., Lima, D. F., Ciancaglini, P., & de SA Leite, J. R., 2014. Nanopharmaceutical approach of episopiloturine alkaloid carried in liposome system: preparation and *in vitro* schistosomicidal activity. *J Nanosci Nanotechnol.* 14(6), 4519-4528.
- Gill, J.H., & Lacey, E., 1993. *In vitro* activity of paraherquamide against the free-living stages of *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagiacircumcincta*. *Int J Parasitol.* 23, 375-381.
- Idris, O. A., Wintola, O. A., Afolayan, A. J., 2022. Anthelmintic potency of *Rumex crispus L.* extracts against *Caenorhabditis elegans* and non-targeted identification of the bioactive compounds. *Saudi J Biol Sci.* 29, 541-549.
- Jiao, Q.S., Xu, L.L., Zhang, J. Y., Wang, Z.J., Jiang, Y.Y., Liu, B., 2018. Rapid characterization and identification of Non-Diterpenoid constituents in *Tinospora sinensis* by HPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ. *Molecules.* 23, 274.
- Justino, A.B., Florentino, R.M., França, A., L. Filho, A.C.M., Franco, R.R., Saraiva, A.L., Fonseca, M.C., Leite, M.F., Espindola, F.S., 2021. Alkaloid and acetogenin-rich fraction from *Annona crassiflora* fruit peel inhibits proliferation and migration of human liver cancer HepG2 cells. *PloS One.* 16, 1-16.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet Rec.* 130, 442-446.

- Kamaraj, C., Rahuman, A., Abdul., 2011. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. Res Vet Sci. 91, 400-404.
- Lima, J., Leme, G. M., Costa, E. V., Cass, Q. B., 2021. LC-HRMS and cetylcholinesterase affinity assay as a workflow for profiling alkaloids in *Annona salzmannii* extract. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci .1164, 122493.
- Lin, R. J., Wu, M. H., Ma, Y. H., Chung, L. Y., Chen, C.Y., Yen, C. M., 2014. Anthelmintic Activities of Aporphine from *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. *Rosa-plena* against *Hymenolepis nana*. Int. J. Mol. Sci. 15, 3624-3639.
- Li, W., Zhou, J., Xu, Y., 2015. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. Biomed Rep. 3, 617-620.
- Lustosa, A. K. M., Arcanjo, D. D., Ribeiro, R. G., Rodrigues, K. A. F., Passos, F. F. B., Piauilino, C. A., Citó, A. M. D. G. L., 2016. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. Rev Bras Farmacogn. 26, 77-82.
- Macedo, A. L., Boaretto, A. G., Silva, A. N. D., Maia, D. S., Siqueira, J. M. D., Silva, D. B., Carollo, C. A., 2021. Evaluation of the Effect of Brazilian Savanna (Cerrado) Seasons in Flavonoids and Alkaloids Accumulation: The Case of *Duguetia furfuracea*. J Braz Chem Soc. 32, 1840-1850.
- Miranda, M. A., Magalhães, L. G., Tioffi, R. F. J., Kuehn, C. C., Oliveira, L. G. R., Rodrigues, V., & Bastos, J. K., 2012. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. Parasitol Res. 111, 257-262.
- Mravčáková, D., Váradyová, Z., Kopčáková, A., Čobanová, K., Grešáková, E., Kišidayová, S., Várady, M., 2019. Natural chemotherapeutic alternatives for controlling of haemonchosis in sheep. BMC Vet Res. 15, 1-13.
- Mengarda, A. C., Mendonca, P. S., Morais, C. S., Cogo, R. M., Mazloum, S. F., Salvadori, M. C., Teixeira, F. S., Morais, T. R., Antar, G. M., Lago J. H. G., Josué Moraes Moraes, J., 2020. Antiparasitic activity of piplartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. Acta Trop. 205, 105350.

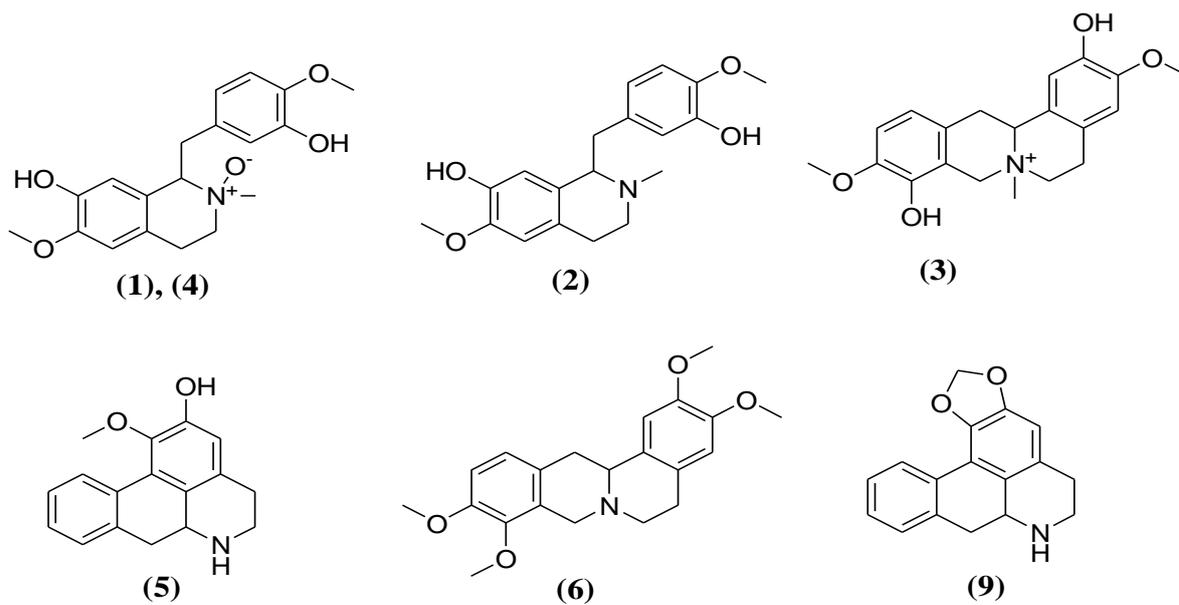
- Moreno, A. H., Possebon, L., ana, M. S., Souza, H. R., Pilon, M. M. I., Girol, A. P., 2018 Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. Arch. Health Sci. Archives of Health Sciences. 25, 11–12.
- Martínez-Valladares, M., Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Cordero-Pérez C., Famularo, M. d. R., Fernández-Pato, N., González-Lanza, C., Castañón-Ordóñez, L., Rojo-Vázquez, F. A., 2013. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. Parasit Vectors. 6, 282.
- Manjusa, A., Pradeep, K., 2022. Herbal anthelmintic agents: a narrative review. J Tradit Chin Med. 42, 641.
- Machado, A. R. T., Ferreira, S. R., Da Silva M., F., Fujiwara, R. T., De Souza Filho, J. D., Pimenta, L. P. S., 2015. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. Parasit Vectors. 8, 1-5.
- Matos, F. J. A. (Ed.) 1, 1997. Introdução à fitoquímica experimental. UFC, 141 pp.
- Ngwewondo, A., Manfo, F.P.T., Samje, M., Monya, E., Cho-Ngwa, F., 2019. Macro and microfilaricidal activities of extracts of *Annona senegalensis* and *Milletia comosa* against *Onchocerca ochengi* and *Loa loa*. Exp Parasitol. 198, 71-78.
- Niles, A. L., Moravec, R. A., Riss, T. L., 2008. Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. Expert Opin Drug Discov. 3, 655-669.
- Oliveira, J. T., Souza, P. F., Vasconcelos, I. M., Dias, L. P., Martins, T. F., Van Tilburg, M. F., Sousa, D. O., 2019. Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. Biochimie. 157, 10-21.
- Oliveira, G. P. Gomes, L. S. S., Venâncio, G. N., Lima, E. S., Souza, T. P., Bandeira, M. F. C. L., Toda, C., Conde, N. C. O., 2021. Citotoxicidade de uma formulação em orabase de *Libidibia ferrea*. Res., Soc. Dev. 10, e133101018713.
- Pinheiro, A. D. A., 2022. Caracterização química, avaliação do potencial antioxidante, hipoglicemiante e antimicrobiano de *Annona tomentosa* R. E. Fr. (ANNONACEAE). 1-84.

- Soares, A. M., Alencar, L. M., Dias, L. P., Lima, R. C., Rocha Silva, C., Santos-Oliveira, R., Souza, P. F., 2021. New insights into anthelmintic mechanisms of action of a synthetic peptide: an ultrastructural and nanomechanical approach. *Polymers*. 13, 2370.
- Sargison, N. D., 2016. Keys to solving health problems in small ruminants: Anthelmintic resistance as a threat to sustainable nematode control. *Small Rumin Res.* 142, 11-15.
- Silva, A. P. S. A. D., Nascimento da Silva, L. C., Martins da Fonseca, C. S., De Araujo, J. M., Correia, M. T. D. S., Cavalcanti, M. D. S., Lima, V. L. D. M., 2016. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of Organic Extracts from *cleome spinosa* Jaqc. *Front Microbiol.* 7, 963.
- Tchetan, E., Olounladé, P. A., Azando, E. V. B., Khaliq, H. A., Ortiz, S., Houngbeme, A., Quetin-Leclercq, J., 2022. Anthelmintic Activity, Cytotoxicity, and Phytochemical Screening of Plants Used to Treat Digestive Parasitosis of Small Ruminants in Benin (West Africa). *Animals.* 12, 2718.
- Tavares, E. S., Julião, L. S., Lopes, D., Bizzo, H. R., Lage, C. L. S., & Leitão, S. G., 2005. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15, 1-5.
- Wang, C., Li, F., Zhang, Z., Yang, X., Ahmad, AA., Li, X., Du, A., Hu, M., 2017. Recent Research Progress in China on *Haemonchus contortus*. *Front. Microbiol.* 8, 1-11.

Supplementary Table 1. Identified compounds in the alkaloid fraction of *Annona tomentosa* (Alk.F)

Peak	Retention time (min)	[M+H] / fragment ions	Compound	Molecular formula	References
1	12,7	691 [2M+H] ⁺ ; 346; 346; 267; 192; 175; 137.	Reticuline <i>N</i> -oxide	C ₁₉ H ₂₄ NO ₅	(Lima et al., 2021)
2	13,5	330 [M+H] ⁺ ; 299; 192; 175.	Reticuline	C ₁₉ H ₂₄ NO ₄	(Macedo et al., 2021)
3	14,5	342 [M+H] ⁺ ; 282; 265; 222.	Cyclanoline	C ₂₀ H ₂₅ NO ₄ +	(Jiao et al., 2018)
4	14,9	691 [2M+H] ⁺ ; 346; 346; 267; 175; 137.	Reticuline <i>N</i> -oxide isomer	C ₁₉ H ₂₄ NO ₅	(Lima et al., 2021)
5	16,4	268 [M+H] ⁺ ; 251; 219; 191.	Asimilobine	C ₁₇ H ₁₈ NO ₂	(Macedo et al., 2021)
6	17,1	356 [M+H] ⁺ ; 192; 165.	Tetrahydropalmatine	C ₂₁ H ₂₆ NO ₄	(Jiao et al., 2018)
7	18,4	743[M+H] ⁺ ; 372; 338; 354; 324.	NI*	-	-
8	19,2	743[M+H] ⁺ ; 372; 354; 324; 289.	NI*	-	-
9	20,6	266 [M+H] ⁺ ; 249; 219; 191.	Anonaine	C ₁₇ H ₁₆ NO ₂	(Justino et al., 2021)

*NI = Not identified. [M+H]: ionization in positive mode.



Supplementary Figure 1. Chemical structures of the alkaloids identified in the alkaloid fraction of *Annona tomentosa*. Compounds 7 and 8 remained thus far unidentified.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base neste estudo, verifica-se que a fração alcaloídica de *Annona tomentosa* inibe o desenvolvimento e desembainhamento de larvas de *H. contortus*, *in vitro*. A fração desestrutura a cutícula do nematoide e tem baixo potencial hemolítico.

Desta forma, após o isolamento e testes individuais de cada alcaloide para identificar o (s) constituinte (s) ativo (s) da fração e para explorar potenciais efeitos sinérgicos, bem como conduzir experimentos *in vivo*, os alcaloides identificados possuem potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-helmínticos. Eles também podem ser considerados para combinação com anti-helmínticos existentes para aumentar sua eficácia.

6. REFERÊNCIAS GERAIS

- ANISZEWSKI, Tadeusz. **Alkaloids - Secrets of Life**: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Joensuu: Elsevier Bv, 2007. 89 p.
- ARAÚJO, S. A. **Potencial anti-helmíntico de extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* (Linn.) (Fabaceae) e *Spigelia anthelmia* (Linn.) (Loganiaceae) contra *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)**. 2017. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Ma, 2017. Cap. 2.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; OLIVEIRA, H. R.; OLIVEIRA, M. R.; MEIRA, P. R.; LÚCIO, A. S. BARBOSA FILHO, J. M.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; Antinociceptive activity of discretamine isolated from *Duguetia moricandiana*. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 25, n. 20, p. 1908-1915, 2012.
- AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini do. Os parasitas de ovinos. **Editora Unesp Português Español English**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 1-264, nov. 2014.
- ALMEIDA F.A., GARCIA K.C., TORGERSON P.R., Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, n. 4, p. 622-625, dez. 2010.
- ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva; ARAUJO, Edigênia Cavalcante da Cruz; RIBEIRO, Luciano Augusto de Araújo; LIMA, Julianeli Tolentino de; NUNES, Xirley Pereira; LOCIO, Ana Sílvia Suassuna Carneiro; AGRA, Maria de Fátima; BARBOSA FILHO, José Maria. Antinociceptive Activity of Ethanol Extract from *Duguetia chrysocarpa* Maas (*Annonaceae*). **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- ALAWA, C.B.I; ADAMU, A.M; GEFU, J.O; AJANUSI, O.J; ABDU, P.A; CHIEZEY, N.P; ALAWA, J.N; BOWMAN, D.D. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 73-81, abr. 2003.
- ANDRIOLA, L.C.; OLIVEIRA, S.V.F.B.; PEREIRA, J.s.; COELHO, W.A.C.; AHID, S.M.M. Diagnóstico de Principais Helmintos em Caprinos no Município de Grossos-RN. **Revista Científica de Produção Animal**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 141-144, 30 jun. 2011.

- ARAUJO, Nayara Macêdo Peixoto; ARRUDA, Henrique Silvano; MARQUES, David Roger Paixão; OLIVEIRA, Williara Queiroz de; PEREIRA, Gustavo Araujo; PASTORE, Glaucia Maria. Functional and nutritional properties of selected Amazon fruits: a review. **Food Research International**, [S.L.], v. 147, p. 110520, set. 2021.
- ALIOFKHAZRAEI, M.; ALI, N. AFM Applications in Micro/Nanostructured Coatings. **Comprehensive Materials Processing**, [S.L.], p. 191-241, 2014.
- BADMUS, J.A.; OYEMOMI, S.A.; ADEDOSU, O.T.; YEKEEN, T.A.; AZEEZ, M.A.; ADEBAYO, E.A.; LATEEF, A.; BADEGGI, U.M.; BOTHA, S.; HUSSEIN, A.A.. Photo-assisted bio-fabrication of silver nanoparticles using *Annona muricata* leaf extract: exploring the antioxidant, anti-diabetic, antimicrobial, and cytotoxic activities. **Heliyon**, [S.L.], v. 6, n. 11, p. 1-9, nov. 2020.
- BRUNET, Severine, HOSTE, Herve. Monomers of Condensed Tannins Affect the Larval Exsheathment of Parasitic Nematodes of Ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7481-7, 2006.
- BAZANTE, Márcio Lucas; MELO, Aline; ALVES, Marccus. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: *Annonaceae*. **Rodriguésia**, [S.L.], FapUNIFESP (SciELO), v. 71, p. 1-13, 2020.
- Tamashiro, J. Plantas Medicinais Brasileiras. IV. *Annona* BARATA, L. E. S. Alencar, A. A. J. Tascone, M. *muricata* L. (Graviola). *Revista Fitos*, [S.L.], v. 4, n. 01, p. 132-138, 2013.
- CHAGAS, Ana Carolina de Souza; TUPY, Oscar; SANTOS, Isabella Barbosa dos; ESTEVES, Sérgio Novita. Economic impact of gastrointestinal nematodes in Morada Nova sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 1-12, 2022. FapUNIFESP (SciELO).
- COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.e.; PRICHARD, R.K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 136, n. 3-4, p. 167-185, mar. 2006.
- CHAN, John D.; ACHARYA, Sreemoyee; DAY, Timothy A.; MARCHANT, Jonathan S. Pharmacological profiling an abundantly expressed schistosome serotonergic GPCR identifies nuciferine as a potent antagonist. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 364-370, 2016.

- CANOVA, Érika Breda. **Eficiência de plantas taniníferas no controle de helmintos gastrintestinais de ovinos**. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2016.
- CALDEIRA, Marco Antonio Martins. **Folhas de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) no controle de *Haemonchus contortus***. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Produção Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2017. 60 f. Cap. 2.
- CAVALCANTE, Antônio Cezar Rocha; VIEIRA, Luiz da Silva; CHAGAS, Ana Carolina de Souza; MOLENTO., Marcelo Beltrão. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2012.
- CASTAÑEDA-RAMÍREZ, G.S.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; TUNGARRIDO, J.; ROSADO-AGUILAR, J.A.; CHAN-PÉREZ, J.I.; HERNÁNDEZ-BOLIO, G.I.; VENTURA-CORDERO, J.; ACOSTA-VIANA, K.y.; JÍMENEZ-COELLO, M. Effects of different extracts of three *Annonas* species on egg-hatching processes of *Haemonchus contortus*. **Journal Of Helminthology**, [S.L.], v. 94, p. 1-8, 28 ago. 2019.
- CASTAÑEDA-RAMÍREZ, G.s.; MATHIEU, C.; VILAREM, G.; HOSTE, H.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; GONZÁLEZ-PECH, P.G.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.. Age of *Haemonchus contortus* third stage infective larvae is a factor influencing the *in vitro* assessment of anthelmintic properties of tannin containing plant extracts. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 243, p. 130-134, ago. 2017.
- COSTA, Emmanoel V.; PINHEIRO, Maria Lúcia B.; XAVIER, Clahildek M.; SILVA, Jefferson R. A.; AMARAL, Ana Cláudia F.; SOUZA, Afonso D. L.; BARISON, Andersson; CAMPOS, Francinete R.; FERREIRA, Antonio G.; MACHADO, Gézia M. C. A Pyrimidine- β -carboline and Other Alkaloids from *Annona foetida* with Antileishmanial Activity. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 69, n. 2, p. 292-294, 1 fev. 2006.
- COSTA, Emmanoel Vilaça; PINHEIRO, Maria Lúcia Belém; SOUZA, Afonso Duarte Leão de; BARISON, Andersson; CAMPOS, Francinete Ramos; VALDEZ, Rodrigo Hinojosa; UEDANAKAMURA, Tânia; DIAS FILHO, Benedito Prado; NAKAMURA, Celso Vataru. Trypanocidal Activity of Oxoaporphine and Pyrimidine- β -Carboline Alkaloids from the Branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, [S.L.], v. 16, n. 11, p. 9714-9720, 23 nov. 2011.

- COSTA-JUNIOR, Livio M.; SILVA, Carolina R.; SOARES, Alexandra M.s.; MENEZES, Alan S.; SILVA, Maria R.L.; AMARANTE, Alessandro F.T.; COSTA, Erivelton F.; ALENCAR, Luciana M.R. Assessment of biophysical properties of *Haemonchus contortus* from different life cycle stages with atomic force microscopy. **Ultramicroscopy**, [S.L.], v. 209, p. 112862, fev. 2020.
- CARNEIRO, Lilian Uchoa; SILVA, Ilna Gomes da; SOUZA, Mirian Eliza Alves de; CÔRTEZ, Wellington da Silva; CARVALHO, Mário Geraldo de; MARINHO, Bruno Guimarães. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of leaf extracts from *Annona tomentosa* R.E.Fr. **Journal Of Integrative Medicine**, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 379-387, set. 2017.
- COSTA, Emmanoel Vilaça; PINHEIRO, Maria Lúcia Belém; SOUZA, Afonso Duarte Leão de; SANTOS, Adriane Gama dos; CAMPOS, Francinete Ramos; FERREIRA, Antonio Gilberto; BARISON, Andersson. Full NMR analysis of annomontine, methoxy- annomontine and N-hydroxyannomontine pyrimidine- β -carboline alkaloids. **Magnetic Resonance In Chemistry**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 69-74, 20 dez. 2007.
- CAMPOS, Francinete R.; BATISTA, Regiane L.; BATISTA, Cristiane L.; COSTA, Emmanoel V.; BARISON, Andersson; SANTOS, Adriane G. dos; PINHEIRO, Maria Lúcia B.. Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sericea* (*Annonaceae*). **Biochemical Systematics And Ecology**, [S.L.], v. 36, n. 10, p. 804-806, out. 2008.
- CHAVARRO, Carlos Felipe Gonzalez; GUTIÉRREZ, Marco Cabezas; BLANCO, Victor Camilo Pulido; RUIZ, Xiomara Melissa Celis. Amaryllidaceae: fuente potencial de alcaloides. actividades biológicas y farmacológicas. **Ciencia y Agricultura**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 78-94, 28 ago. 2020.
- CRUZ, Pedro Ernesto Oliveira da; COSTA, Emmanoel Vilaça; MORAES, Valéria Regina de Souza; NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima; VENDRAMIN, Mayara Evelyn; BARISON, Andersson; FERREIRA, Antonio Gilberto; PRATA, Ana Paula do Nascimento. Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (*Annonaceae*). **Biochemical Systematics And Ecology**, [S.L.], v. 39, n. 4-6, p. 872-875, ago. 2011.
- CASTRO, Andreísa Teixeira de; CASTRO, Aline Pereira; SILVA, Matheus Siqueira; SOUZA, Isabella Maria Monteiro de; MARTINS-SOUZA, Raquel Lopes; CHAGAS-PAULA, Daniela Aparecida; COELHO, Luiz Felipe Leomil; BOLZANI, Vanderlan da Silva; PIVATTO, Marcos; VIEGAS, Claudio. In vitro evaluation of the schistosomicidal effect of the extracts,

- fractions and major 3-hydroxy-2,6-dialkyl-substituted piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 26, n. 17, p. 4197-4204, 2016.
- DE MORAES, Josué. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. **Current topics in tropical medicine**, p. 333-358, 2012.
- DE MORAES, Josué. Natural products with antischistosomal activity. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 801-820, 2015.
- DUTRA, Saulo Moreira; SALIMENA, Fátima Regina Gonçalves; MENINI NETO, Luiz. *Annonaceae* na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 785-793, dez. 2012.
- DUTRA, Saulo Moreira; SALIMENA, Fátima Regina Gonçalves; MENINI NETO, Luiz. *Annonaceae* na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 785-793, 2012.
- CASTRO, Andreísa Teixeira de; CASTRO, Aline Pereira; SILVA, Matheus Siqueira; SOUZA, Isabella Maria Monteiro de; MARTINS-SOUZA, Raquel Lopes; CHAGAS-PAULA, Daniela Aparecida; COELHO, Luiz Felipe Leomil; BOLZANI, Vanderlan da Silva; PIVATTO, Marcos; VIEGAS, Claudio. *In vitro* evaluation of the schistosomicidal effect of the extracts, fractions and major 3-hydroxy-2,6-dialkyl-substituted piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 26, n. 17, p. 4197-4204.
- CARNEIRO, Lúcio, Ana Silvia Suassuna. **Alcaloides azafenantrenos isolados de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague e *Sandwith* (Annonaceae)**. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. João pessoa, PB, 2011.
- DANG, Quang Le; KIM, Won Ki; NGUYEN, Cuong Mai; CHOI, Yong Ho; CHOI, Gyung Ja; JANG, Kyoung Soo; PARK, Myung Soo; LIM, Chi Hwan; LUU, Ngoc Hoang; KIM, Jin-Cheol. Nematicidal and Antifungal Activities of Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa* against Various Plant Pathogens. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 59, n. 20, p. 11160-11167, 26 set. 2011.
- DUBOIS, O.; ALLANIC, C.; CHARVET, C. L.; GUÉGNARD, F.; FÉVRIER, H.; THÉRY-KONÉ, I.; CORTET, J.; KOCH, C.; BOUVIER, F.; FASSIER, T. Lupin (*Lupinus* spp.) seeds exert

- anthelmintic activity associated with their alkaloid content. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-12, 21 jun. 2019.
- EGYDIO, Anary Priscila M.; VALVASSOURA, Thaís A.; SANTOS, Déborah Yara A.C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Biochemical Systematics And Ecology**, [S.L.], v. 46, p. 145-151, fev. 2013.
- ELIZONDO-LUÉVANO, Joel H.; CASTRO-RÍOS, Rocío; LÓPEZ-ABÁN, Julio; GORGOJO-GALINDO, Oscar; FERNÁNDEZ-SOTO, Pedro; VICENTE, Belén; MURO, Antonio; CHÁVEZ-MONTES, Abelardo. Berberine: a nematocidal alkaloid from argemone mexicana against *strongyloides venezuelensis*. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 220, p. 1-15, jan. 2021.
- FLAMMER, Patrik G.; RYAN, Hannah; PRESTON, Stephen G.; WARREN, Sylvia; PRICHYSTALOVÁ, Renáta; WEISS, Rainer; PALMOWSKI, Valerie; BOSCHERT, Sonja; FELLGIEBEL, Katarina; JASCH-BOLEY, Isabelle. Epidemiological insights from a large-scale investigation of intestinal helminths in Medieval Europe. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 1-15, 27 ago. 2020.
- FERREIRA, Antonio Aparecido Pupim; YAMANAKA, Hideko. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 137-142, fev. 2006.
- FERREIRA, L.; CASTRO, P.M.N.; CHAGAS, A.C.s.; FRANÇA, S.C.; BELEBONI, R.O. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (*Annonaceae*) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 134, n. 3, p. 327-332, 2013.
- GALASTRI, N. **Morfoanatomia e ontogênese de frutos e sementes de *Annona dioica* (A. St.-Hil.), *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. e *Xylopia emarginata* Mart. (*Annonaceae*)**. 2008. Tese de Doutorado. M. Sc. thesis. Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil.
- HARDCOVER. **THE GENERA OF FLOWERING PLANTS: angiospermae**. based principally on the genera plantarum of g. bentham and j. d. hooker. Oxford: Clarendon Press, 1967. 660 p.
- HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alkaloids: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.;

- MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 2003, Cap. 29, p. 765-791.
- HAASE, Kristina; PELLING, Andrew E. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. **Jornal Off The Royal Society Interface**, [S.L.], v. 12, n. 104, p. 1-16, mar. 2015.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Sistema do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística de Recuperação Automática – SIDRA [online]. 2019 Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?z=ato=26&i=P> Acesso: 25 de setembro de 2022.
- KAJERO, Olumayowa T; JANOULKOVÁ, Eva; A BAKARE, Emmanuel; BELIZARIO, Vicente; DIVINA, Billy; ALONTE, Allen Jethro; MANALO, Sheina Macy; PALLER, Vachel Gay; BETSON, Martha; PRADA, Joaquin M. Co-infection of intestinal helminths in humans and animals in the Philippines. **Transactions Of the Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 116, n. 8, p. 727-735, 16 fev. 2022.
- LORIA, Antonio di; VENEZIANO, Vincenzo; PIANTEDOSI, Diego; RINALDI, Laura; CORTESE, Laura; MEZZINO, Laura; CRINGOLI, Giuseppe; CIARAMELLA, Paolo. Evaluation of the FAMACHA system for detecting the severity of anemia in sheep from southern Italy. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 161, n. 1-2, p. 53-59, abr. 2009.
- LIN, Rong-Jyh; WU, Mei-Hsuan; MA, Yi-Hsuan; CHUNG, Li-Yu; CHEN, Chung-Yi; YEN, Chuan-Min. Anthelmintic Activities of Aporphine from *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. *Rosa-plena* against *Hymenolepis nana*. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 3624-3639, 27 fev. 2014.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the *Annonaceae*. **Phytochemistry, New York**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.
- LORENZI, H., MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, **Nova Odessa**, 2002.
- LOBÃO, Adriana Quintella; MELLO-SILVA, Renato de; FORZZA, Rafaela Campostrini. Guatteria (*Annonaceae*) da Floresta Atlântica brasileira. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 1039-1064, dez. 2012.

- MACHADO, Alan; FERREIRA, Sebastião; MEDEIROS, Felipe da Silva; FUJIWARA, Ricardo; SOUZA FILHO, José de; PIMENTA, Lúcia. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extracton *Caenorhabditi selegans*. **Parasites & Vectors**, v.8, p.113, 2015.
- MENDES, Francisca Wladyanne Vasconcelos. **Análise comparativa dos custos do controle de *Haemonchus contortus* através de vacinação e do controle tradicional com anti-helmínticos em caprinos leiteiros**. 2019. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral – CE, 2019. Cap. 2.
- MENGARDA, Ana. C.; MENDONÇA, Poliana S.; MORAIS, Cristiane S.; COGO, Ramon M.; MAZLOUM, Susana F.; SALVADORI, Maria C.; TEIXEIRA, Fernanda S.; MORAIS, Thiago R.; ANTAR, Guilherme M.; LAGO, João Henrique G. Antiparasitic activity of piplartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 205, p. 105350, maio 2020.
- MANSFIELD, L.s.; GAMBLE, H.R.; FETTERER, R.H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus* I. Structural components. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, [S.L.], v. 103, n. 3, p. 681-686, nov. 1992.
- MINHO, A. P.; GRANADA, R. L.; DOMINGUES, R. Teste de inibição do desembainhamento larvar. **Comunicado técnico, Embrapa**, 2014.
- MIRANDA, Mariza Abreu; MAGALHÃES, Lizandra Guidi; TIOSSI, Renata Fabiane Jorge; KUEHN, Christian Collins; OLIVEIRA, Luiz Gustavo Rodrigues; RODRIGUES, Vanderlei; MCCHESENEY, James Dewey; BASTOS, Jairo Kenupp. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 111, n. 1, p. 257-262, 27 jan. 2012.
- MOTA, Ana Cristina Costa. 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: < <https://monografias.ufma.br/jspui/handle/123456789/1419> > Acesso em: 15 fev. 2023.
- NUGRAHA, Ari Satia; DAMAYANTI, Yuvita Dian; WANGCHUK, Phurpa; KELLER, Paul A.. Anti-Infective and Anti-Cancer Properties of the *Annona* Species: their ethnomedicinal uses, alkaloid diversity, and pharmacological activities. **Molecules**, [S.L.], v. 24, n. 23, p. 4419-4425, 3 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24234419>.

- NICIURA SCM, CRUVINEL GG, MORAES CV, CHAGAS ACS, ESTEVES SN, BENAVIDES MV, et al. In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel. **Journal of helminthology**, v. 94, p. e46, 2020.
- NASCIMENTO, Janilene de Oliveira; PEREIRA, Josivania Soares; FONSECA, Zuliete Aliona Araujo de Souza; COELHO, Wesley Adson Costa; BESSA, Ericka Natalia; AHID, Silvia Maria Mendes. Aspectos morfométricos de *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) procedentes de caprinos (*Capra hircus*) da região semiárida do Rio Grande do Norte, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S.L.], v. 80, n. 4, p. 447-449, 2013.
- OLIVEIRA, Andreia F.; COSTA JUNIOR, Livio M.; LIMA, Aldilene S.; SILVA, Carolina R.; RIBEIRO, Maria N.S.; MESQUISTA, José W.C.; ROCHA, Cláudia Q.; TANGERINA, Marcelo M.P.; VILEGAS, Wagner. Anthelmintic activity of plant extracts from Brazilian savanna. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 236, p. 121-127, mar. 2017.
- PINHEIRO, A. A. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, HIPOGLICEMIANTE E ANTIMICROBIANO DE *Annona tomentosa* R. E. Fr. (ANNONACEAE)**. 2022. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA, 2022. Cap. 1.
- PINHEIRO, A. A. **Caracterização química, atividade antimicrobiana e citotóxica da entrecasca do caule de *Annona tomentosa* RE Fr.** 2019. 45 f. trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Curso de Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA, 2019. Cap. 1.
- PINTO, Erveton Pinheiro, RAMOS, Glenda Quaresma; FONSECA FILHO, Henrique Duarte. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 3, n. 2, p. 41-50, 2013.
- ROGERS, W. P., Exsheathment and hatching mechanisms in helminths. **In Biology of Parasites**. (ed. E. J. L. Soulsby), New York, London: Academic Press. p. 33-40, 1966.
- RODRIGUES, Thamirys Freitas. **Sistemas de produção da ovinocaprinocultura no município de Vargem Grande, Maranhão**. 56 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2017.
- RABÊLO, Suzana Vieira. **REVISÃO DE ALCALOIDES DO GÊNERO *Annona*, ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ATEMOIA (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*)**. 2014. 223 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de

Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina – PE, 2014. Cap. 4.

RABELO, Suzana Vieira; QUINTANS, Jullyana de Sousa Siqueira; COSTA, Emmanoel Vilaça; ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva; QUINTANS JÚNIOR, Lucindo José. *Annona Species (Annonaceae) Oils. Essential Oils In Food Preservation, Flavor And Safety*, [S.L.], p. 221-229, 2016.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e Farmacobiocotecnologia. **São Paulo: Editorial Premier**, 1997, 372 p.

SANTOS D.Y., SALATINO M.L. Foliar flavonoid of *Annonaceae* from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**. 55(6): 567–573, 2002.

SANTOS, Michelle Cardoso dos; AMARANTE, Mônica Regina Vendrame; SILVA, Maria Regina Lucas da; AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini do. Differentiation of *Haemonchus placei* from *Haemonchus contortus* by PCR and by morphometrics of adult parasites and third stage larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 495-500, dez. 2014.

SANTOS, Jessica Maria Leite dos; VASCONCELOS, Janaelia Ferreira; FROTA, Gracielle Araújo; RIBEIRO, Wesley Lyeverton Correia; ANDRÉ, Weibson Paz Pinheiro; VIEIRA, Luiz da Silva; TEIXEIRA, Marcel; BEVILAQUA, Claudia Maria Leal; MONTEIRO, Jomar Patrício. *Haemonchus contortus* β -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 248, p. 90-95, dez. 2017.

SANTOS, Camila Vogt dos; MALLMANN, Ana Paula; TOLEDO, Adrieli Gorlin; BANDEIRA, Débora Marina; COSTA, Willian Ferreira da; MARINS, Daíse Miranda Ávila; CORRÊA, Juliana Moço; PINTO, Fabiana Gisele da Silva. Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas *Myrcia palustris* DC. (MYRTACEAE). **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 1-15, 12 mar. 2021.

SCHLEDER, E. J. D.; AGUIAR, E. B.; MATIAS, R. Material didático: introdução a taxonomia e sistemática vegetal. **Editora Científica**, 2020.

SILVA, Gisele Dias da; LIMA, Hélimar Gonçalves de; SOUSA, Nilmara Borges de; GENIPAPEIRO, Igor Leonardo de Jesus; UZEDA, Rosângela Soares; BRANCO, Alessandro; COSTA, Silvia Lima; BATATINHA, Maria José Moreira; BOTURA, Mariana Borges. *In vitro*

anthelmintic evaluation of three alkaloids against gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 296, p. 1-15, ago. 2021.

SILVA, Viviane A. O.; ALVES, Ana Laura V.; ROSA, Marcela N.; SILVA, Larissa R. V.; MELENDEZ, Matias E.; CURY, Fernanda P.; GOMES, Izabela N. F.; TANSINI, Aline; LONGATO, Giovanna B.; MARTINHO, Olga. Hexane partition from *Annona crassiflora* Mart. promotes cytotoxicity and apoptosis on human cervical cancer cell lines. **Investigational New Drugs**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 602-615, 29 ago. 2018.

SOUSA, Anildes Iran Pereira. **Óleos essenciais e terpenos como estratégia de controle de carrapatos e nematoides**. 2022. 80 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

SILVA, Ana P. Sant'Anna da; SILVA, Luís C. Nascimento da; FONSECA, Caíque S. Martins da; ARAËJO, Janete M. de; CORREIA, Maria T. dos Santos; CAVALCANTI, Marilene da Silva; LIMA, Vera L. de Menezes. Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Organic Extracts from *Cleome spinosa* Jacq. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 1-15, 28 jun. 2016.

SILVA, Marcelo Sobral da; TAVARES, Josean Fechine; QUEIROGA, Karine Formiga; AGRA, Maria de Fátima; BARBOSA FILHO, José Maria; ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva; SILVA, Sâmia Andrícia Souza da. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (*Annonaceae*). **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 1566-1570, 2009.

FORTES, Elinor. Parasitologia veterinária. 3. ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2009. 742 p.

TRAILOVIĆ, Saša M.; MARINKOVIĆ, Darko; TRAILOVIĆ, Jelena Nedeljković; MILOVANOVIĆ, Mirjana; MARJANOVIĆ, Djordje S.; ANIČIĆ, Milan R. Pharmacological and morphological characteristics of the muscular system of the giant liver fluke (*Fascioloides magna* – Bassi 1875). **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 159, p. 136-142, dez. 2015.

VALENTINE, Allison; WEXLER, Adam; KATES, Jennifer. The US Global Health Budget: Analysis of the Fiscal Year 2017 Budget Request, **Menlo Park: Kaiser Family Foundation**, **March** 22(1): 1-10; 2016.

VERAS, L. M.; GUIMARAES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C..

Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 1 mar. 2012. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986712800167347>.

WANG, Gao-Xue; ZHOU, Zhuang; JIANG, Dong-Xin; HAN, Jing; WANG, Jian-Fu; ZHAO, Liang-Wei; LI, Jun. In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 171, n. 3-4, p. 305-313, ago. 2010.

YOUSSEF, N.; SIMPSON, D.; DUNCAN, K.; MCINERNEY, M.; FOLMSBEE M. In-situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a lime to ne petroleum reservoir. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 1239-1247, 2007.

ZHANG, Si-Ming; COULTAS, Kristen A. Identification of plumbagin and sanguinarine as effective chemotherapeutic agents for treatment of schistosomiasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S.L.], v. 3, p. 28-34, dez. 2013.

ZIRINTUNDA, Gerald; BIRYOMUMAISHO, Savino; KASOZI, Keneth Iceland; BATIHA, Gaber El-Saber; KATEREGGA, John; VUDRIKO, Patrick; NALULE, Sarah; OLILA, Deogracious; KAJOBA, Mariam; MATAMA, Kevin. Emerging Anthelmintic Resistance in Poultry: can ethnopharmacological approaches offer a solution? **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 12, p. 1-10, 14 fev. 2022.