

Prospecção fitoquímica, identificação e avaliação da atividade microbiológica de metabólitos secundário de *Annona mucosa* Jacq

Matheus Henrique Oliveira de Sousa
Universidade Federal do Rio Grande – RS

Gilvan de Oliveira Costa Dias
Universidade Federal do Maranhão – MA

Joselene Ribeiro de Jesus Santos
Universidade Federal do Maranhão – MA

RESUMO

O presente trabalho descreve os resultados obtidos para os estudos fitoquímico e microbiológico do extrato hidroetanólico a 70%, suas frações e metabólitos isolados a partir das folhas do Biribazeiro (*Annona mucosa* Jacq.). Inicialmente realizou-se a preparação do extrato hidroetanólico (70%) das folhas do vegetal e uma triagem fitoquímica em busca dos metabólitos secundários de estudo. Os testes confirmaram a presença de taninos, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas, leucoantocianidinas, antocianidinas, esteroides livres, saponinas e alcaloides. Em seguida realizou-se o fracionamento orgânico do extrato bruto, e através de cromatografia em camada delgada da fração clorofórmica realizou-se a separação de misturas de alcaloides e flavonoides que foram identificados, através de técnicas hífenadas de LC-ESI-IT-MS/MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ, como o alcaloide romucosina e a antocianidina delfinidina-3-O- β -glucopiranosídeo. Além do isolamento e identificação de metabólitos secundários, esse trabalho apresenta resultados para a avaliação microbiológica através da técnica de difusão em meio sólido de perfuração em poços com amostras do extrato hidroetanólico 70% bruto bem como de frações e metabólitos isolados. Através desses ensaios foram obtidos resultados satisfatórios frente a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC, ao fungo *Candida albicans* e ao isolado clínico de *Salmonella spp* atribuindo-se essas atividades a presença dos alcaloides e flavonoides identificados. Os resultados fitoquímicos obtidos corroboram a identificação botânica da espécie estudada *Annona mucosa* Jacq. como pertencente à família Annonaceae, devido a presença de substâncias que são comumente encontradas em vegetais pertencentes a essa família e através da avaliação microbiológica como importante fonte de substâncias químicas na produção de novos medicamentos.

Palavras-chave: Prospecção fitoquímica, Alcaloides, Flavonoides, Atividade microbiológica, *Annona mucosa*.

1 INTRODUÇÃO

As anonáceas pertencem a ordem da Magnoliales, sendo esta ordem subdivida nas famílias das Annonaceae, Magnoliaceae e Myristicaceae, compreendendo cerca de 120 espécies. No Brasil é possível encontrar, dessa família, 29 gêneros e cerca de 392 espécies (BARON, 2010; MAAS et al., 2011), distribuídas em todo o território nacional. A família Annonaceae apresenta distribuição nas regiões tropicais observando-se sua maior ocorrência na América Central e do Sul, no continente Asiático e na África (CHATROU et al., 2012; MAAS et al., 2011). Os vegetais dessa família são cultivados por apresentarem

bom potencial comercial, na utilização de sua madeira, ou na produção de frutos, além da obtenção do óleo essencial a partir de suas flores (GALASTRI, 2008; JUDD et al., 2002; LORENZI; MATOS, 2002).

Na medicina popular, diversas partes desses vegetais são utilizados na cura de males, sendo atribuídas suas atividades biológicas a presença principalmente de alcaloides, acetogeninas, terpenos e flavonoides (SILVA et al., 2009). Estudos demonstram atividade antileishmania (RAYNAUD-LE GRANDIC et al., 2004), antioxidante e citoprotetora (BARRECA et al., 2011), citotóxica, apresentado potencial antitumoral (BETANCUR-GALVIS et al., 1999; FORMAGIO et al., 2013a), anti-inflamatória (FORMAGIO et al., 2013a, 2013b), antiviral (BETANCUR-GALVIS et al., 1999), além de hipoglicemiante, atribuindo esses efeitos a presença de flavonoides no extrato e frações avaliadas (FORMAGIO et al., 2013b).

O gênero *Annona* é amplamente estudado devido a presença de diversos constituintes sintetizados através do metabolismo secundário desses vegetais. Os principais metabólitos estudados para essa classe de vegetais são as acetogeninas, os alcaloides isoquinolínicos, os diterpenos, esteroides, monoterpênicos, sesquiterpenos, triterpenos, lactonas, flavonoides e cetonas (RODRIGUES, 2016). Os alcaloides de maior ocorrência são a liriodenina, reticulina e anonaina, sendo considerados marcadores quimiotaxônomicos do gênero (LEBOEUF et al., 1980), entre as acetogeninas, exclusivas da anonáceas, anossenegalina, xilomaticina, bulatanocina, anomontacina, anonacina, goniolaticimina e isoanonacina, isoladas de extratos de *Annona muricata*, apresentam toxicidade frente a caramujos (*Biomphalaria glabrata*) e larvas do mosquito da dengue (*Aedes aegypti*) (LUNA, 2006). Dentre os flavonoides, flavonas e flavonóis e seus derivados glicosilados são os mais comuns (SANTOS; SALATINO, 2000), sendo indicados como os responsáveis por atividades antioxidantes (RICE-EVANS et al., 1995; ROY et al., 2022), cardioprotetora e anti-inflamatória (ROY et al., 2022), anticarcinogênica (LIU; JIANG; XIE, 2010) e antivirais (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

O biribazeiro (*Annona mucosa* sinm. *Rollinia mucosa*) é uma árvore de médio porte, com flores de coloração verde-amarelado, sendo encontrado em vários estados do território brasileiro (LORENZI et al., 2006). Na medicina popular, várias partes desse vegetal são utilizadas, e suas folhas, na forma de chás, são utilizadas como medicação sudorífica, carminativa, estomáquica, antirreumática e anti-helmíntica, sendo também utilizadas no tratamento de estomatites e cefaleias. Para esta espécie, os alcaloides romucosina, anonaína, glaucina, purpureína, liriodenina, oxoglucina, oxopurpureína, berberina, e tetrahydroberberina foram isolados e identificados (CHEN; CHANG; WU, 1996). Estudos realizados demonstram as atividades antiplaquetária de alcaloides isolados (KUO et al., 2001), leishmanicida para a fração diclorometano (BARBOZA, 2013; LIMA et al., 2012), inseticida, para extratos das folhas, galhos e semente (RIBEIRO et al., 2013; TURCHEN et al., 2016) e citotóxica, para os extratos e acetogeninas isoladas da espécie (GU et al., 1997).

A espécie vegetal apresenta atividades biológicas e químicas documentadas, para algumas classes de compostos naturais presentes, entretanto, poucos estudos que avaliem a atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico das folhas, desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar biologicamente o extrato bruto do vegetal, e identificar compostos oriundos do metabolismo secundário presentes.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO, OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO E FRACIONAMENTO ORGÂNICO

Folhas de *A. mucosa* foram coletadas no mês de agosto de 2015, em São Luís – MA, as partes aéreas foram secas sob proteção da incidência solar direta por cerca de uma semana. Após esse período de secagem, o material foi separado entre folhas e caules, limpo, triturado, pesado e reservado para etapa posterior.

O extrato hidroetanólico das folhas (200 g) foi obtido através de maceração exaustiva a frio, com uma mistura etanol:água (70:30). O extrato obtido foi filtrado, e concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo, para a obtenção do extrato bruto concentrado. A determinação do rendimento da extração foi realizada transferindo-se alíquotas de 1 mL do extrato para frascos previamente pesados. O material foi seco em circulação de ar aquecido e novamente pesado, para a obtenção da massa seca.

Do extrato bruto concentrado, uma parte foi separada para o fracionamento orgânico com solventes em ordem crescente de polaridade, hexano, seguido de clorofórmio e por fim acetato de etila. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo e secas totalmente sob corrente de ar aquecido.

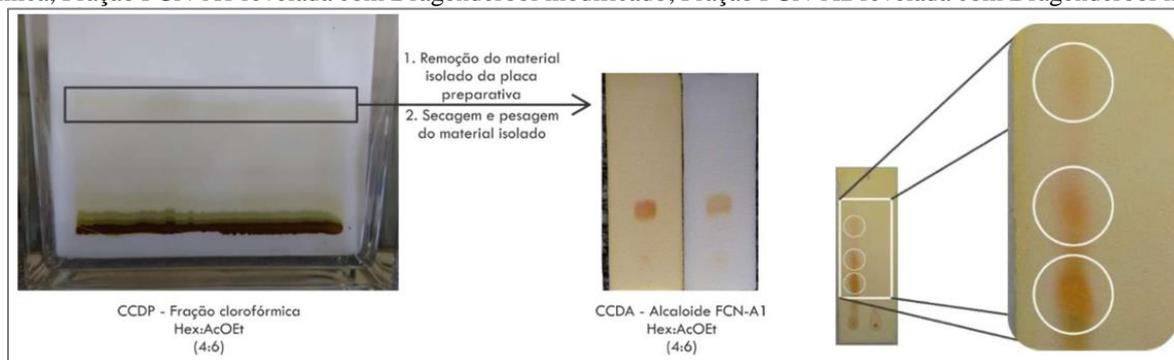
2.2 OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ALCALOÍDICAS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Solubilizou-se com 20mL de clorofórmio uma parte da fração clorofórmica (0,44g), procedendo-se a lavagem dessa fração, em um funil de separação, com 25mL de solução de HCl 3%, reservando-se a fração aquosa. A lavagem foi efetuada por três vezes consecutivas, totalizando 100 mL de solução ácida.

A fração aquosa ácida foi então basificada com hidróxido de amônio até pH 11. Essa fração foi extraída sucessivamente por 4 vezes com 30mL de clorofórmio. Após a extração a fração alcaloídica foi seca, pesada e reservada para tratamentos posteriores.

A fração clorofórmica foi separada através de cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP), e separadas em duas subfrações, FCN-A1 e FCN-A2. As subfrações foram reveladas com reagente de Dragendorff modificado, confirmando a presença de alcaloides, conforme **Figura 01**, abaixo.

Figura 01: Frações alcaloídicas separadas. Da esquerda para a direita: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa da fração clorofórmica; Fração FCN-A1 revelada com Dragenderoof modificado; Fração FCN-A2 revelada com Dragenderoof modificado



2.3 ANÁLISES DAS AMOSTRAS POR LC-ESI-IT-MS/MS E FIA-ESI-IT-MS^N

2.3.1 Preparo das amostras FCN-A1 e FCN-A2

Após secas, as amostras foram solubilizadas em metanol e filtradas através de um filtro PTFE 0,22 µm para um *vial* de HPLC. A amostra FCN-A2 foi passada em um cartucho de C18 (Chromabond C18ec). O solvente foi removido, e após secas, as amostras foram novamente plaqueadas para confirmar a presença de alcaloides nas frações preparadas.

2.3.2 Condições experimentais das análises por LC-ESI-IT-MS/MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ

A análise das frações foi realizada num sistema de HPLC modelo SHIMADZU (Shimadzu Corp. Quioto, Japão), com coluna Luna C18, 100 Å, com poros de 5µm, e dimensões 150 x 4,6 mm. A fase móvel utilizada consistiu em água:ácido fórmico (0.01%) (A) e metanol:ácido fórmico (0,01%) (B). Utilizou-se um gradiente de eluição de 10 a 100% de B em 10 minutos, com um fluxo de fase móvel de 1mL/min, e um volume de injeção de 20µL. Para o ensaio com FIA-ESI-IT-MSⁿ, dissolveu-se as amostras secas em 1mL de metanol, grau HLPC, e utilizou-se o banho de ultrassom durante 5 minutos para a solubilização das amostras. Ao fim as amostras foram filtradas através de um filtro PTFE de 0,22µm e alíquotas de 20µL foram injetadas diretamente no LC-MS para as análises por FIA-ESI-IT-MSⁿ. A análise das amostras foi realizada em um analisador do tipo *ion trap* linear (Thermo Scientific LTQ XL), equipado com fonte de ionização por *eletronspray* (ESI), utilizando-se o modo positivo (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

A análise completa de varredura foi registrada na faixa de *m/z* de 100 – 1000. As demais fragmentações realizadas em estágios múltiplos (ESI-MSⁿ) foram realizadas utilizando-se o método de dissociação por colisão (CID) contra hélio, para a ativação dos íons. O primeiro evento de varredura foi um espectro de massa completo para adquirir dados sobre íons nessa faixa de *m/z*. O segundo evento de varredura foi uma experiência MS/MS realizada com uma varredura de dados dependente nas moléculas [M+H]⁺ dos compostos de interesse com energia de colisão de 30 %, e tempo de ativação 30 ms. Os íons produzidos foram então submetidos a novas fragmentações obedecendo-se as mesmas condições da primeira



fragmentação, até não serem observados a produção de novos fragmentos. A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico das frações analisadas foi feita comparando seus tempos de retenção com dados obtidos da literatura, além dos dados dos fragmentos obtidos através da espectrometria de massas.

2.4 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Para os ensaios microbiológicos, utilizou-se a metodologia de difusão microbiológica em meio sólido, a técnica utilizada foi a de perfuração de poços. Foram testados o extrato bruto concentrado as frações hexânica, clorofórmica, acetato, a fração alcaloídica total e a fração FCN-A1.

2.4.1 Microrganismos utilizados

Foram utilizadas cepas da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella spp.* (isolado clínico), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 35218 e do fungo *Candida albicans* ATCC 9002.

2.4.2 Preparo das suspensões microbianas

Os microrganismos foram inicialmente reativados a partir das suas culturas originais e mantidas em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) à 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram cultivadas em placas de Ágar Nutriente a 37°C por 24 horas. As colônias isoladas foram então retiradas do meio de cultura, com o auxílio de uma alça de platina, e ressuspensas em 3mL de solução fisiológica NaCl 0.89% estéril, até atingir uma turbidez equivalente na escala 0,5 de Mc. Farland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ bact/mL.

2.4.3 Preparo das amostras utilizadas nos ensaios microbiológicos

As amostras vegetais testadas foram o extrato hidroetanólico das folhas, as frações hexânica, clorofórmica, acetato, a fração de alcaloides totais e a subfração FCN-A1. Todas as frações foram secas, de seus respectivos solventes orgânicos, pesadas, e ressuspensas com 2mL de álcool etílico a 70%, para que se mantivesse um controle das concentrações das amostras testadas.

2.4.4 Teste de perfuração em meio sólido

O potencial antimicrobiano das amostras foi avaliado pela técnica de perfuração de poços em meio ágar Müller Hinton, para os ensaios com bactérias, e ágar Sabourad 4% dextrose, para a amostra fúngica. Inicialmente realizou-se o semeio dos microrganismos nas placas, com o auxílio de um *swab* estéril sendo em seguida o meio perfurado com cilindros de 6mm de diâmetro. Colocou-se em cada um dos poços alíquotas de 50 µL de cada um dos extratos e frações testados e seus respectivos controles. Utilizou-se como

controle negativo álcool etílico 70%, utilizado para ressuspender as amostras, e como controle positivo cloranfenicol (0,02mg/ml) para as bactérias e nistatina em suspensão 100.000 UI/mL para a amostra fúngica. As placas foram incubadas a 37 °C por um período de 24 horas. Após incubação, foi medido o diâmetro do halo de inibição (mm) do crescimento quando presente (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

3 RESULTADOS

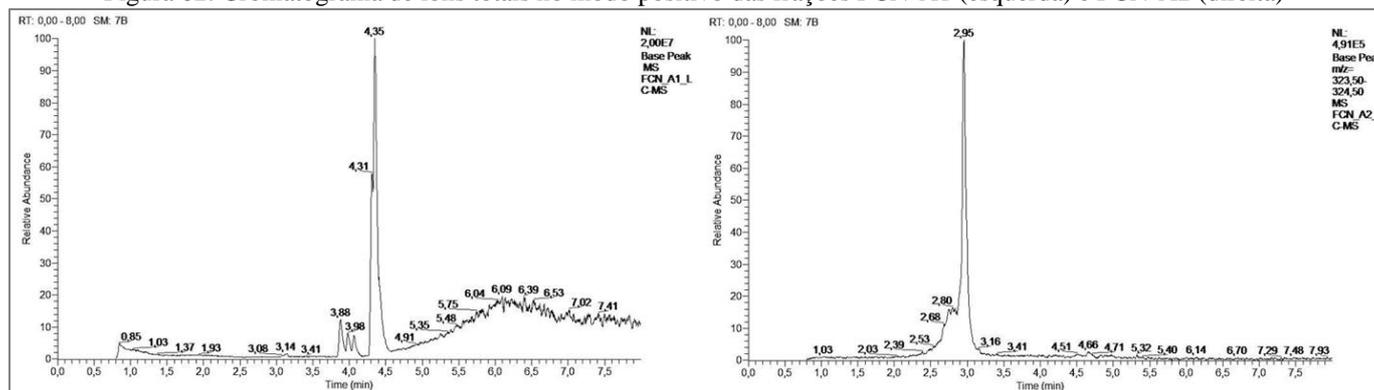
3.1 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO E SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS

A partir das médias das massas obtidas foi possível determinar a concentração do extrato bruto, sendo esta igual a 0,0670 g/mL. Através de análise gravimétrica, o rendimento da extração foi calculado como sendo igual a 16,67 %.

3.1.1 Cromatogramas de íons totais e compostos identificados nas frações FCN-A1 e FCN-A2

Nos cromatogramas de íon totais é possível observar, para as amostras FCN-A1 e FCN-A2 a presença de pouco picos, **Figura 02**

Figura 02: Cromatograma de íons totais no modo positivo das frações FCN-A1 (esquerda) e FCN-A2 (direita)



A subfração FCN-A1 foi separada por CCDP, pesando 33,1 mg, apresentando aspecto oleoso e coloração alaranjada. Apesar de aparecer como um único *spot* quando revelada em placa cromatográfica, a subfração FCN-A1 apresenta cromatograma de íons totais para uma mistura de substâncias químicas. E por co-eluírem, não apareciam quando revelados com o reagente de Dragendorff modificado, ou com vapores de iodo. A partir dos espectros de massas obtidos para o sinal com tempo de retenção (RT) 4,35, 4,31, 3,88 e 3,98, não foi possível realizar a identificação dos compostos presentes nessa amostra.

Para a subfração FCN-A2, separada como um sólido amorfo marrom, pesando 16,1 mg, foi possível realizar a identificação dos compostos com sinais em tempo de retenção 2,95 e 4,21. Na **Figura 03** observa-se o espectro de massas para uma substância com pico base de m/z : 324 $[M+H]^+$, e demais fragmentos com m/z : 309 $[M+H -CH_3]^+$, m/z : 278 $[M+H -CH_2O_2]^+$ e m/z : 217 $[M+H -C_3H_7O_4]^+$. Tais dados foram

atribuídos ao alcaloide isoquinolínico romucosina, a partir de dados obtidos da literatura. A substâncias já havia sido anteriormente identificada nos extratos de folhas de *Rollinia mucosa* (sinm. *Annona mucosa*) (CHEN; CHANG; WU, 1996), *Annona cherimola* (CHEN et al., 2001) e no extrato do caule de *Annona cassiflora* (EGYDIO; VALVASSOURA; SANTOS, 2013).

Na **Figura 04**, abaixo, observa-se o espectrograma para uma substância com pico íon molecular m/z : 465 $[M+H]^+$ e pico base de m/z : 255. Além disso há também fragmentos com m/z : 435 $[M+H -CH_2O]^+$; m/z : 347 $[M+H -C_4H_6O_4]^+$; m/z : 301 $[M+H -C_6H_{12}O_5]^+$. Com os fragmentos obtidos, e a partir de dados consultados na literatura, identificou-se a substância isolada como as antocianidina, delfinidina-3-O-glucosideo (KOH; YOUN; KIM, 2014), sendo este o primeiro trabalho a indicar a presença dessa antocianidina nos extratos das folhas de *Annona mucosa*.

Figura 03: Espectro de massas para o composto identificado como romucosina

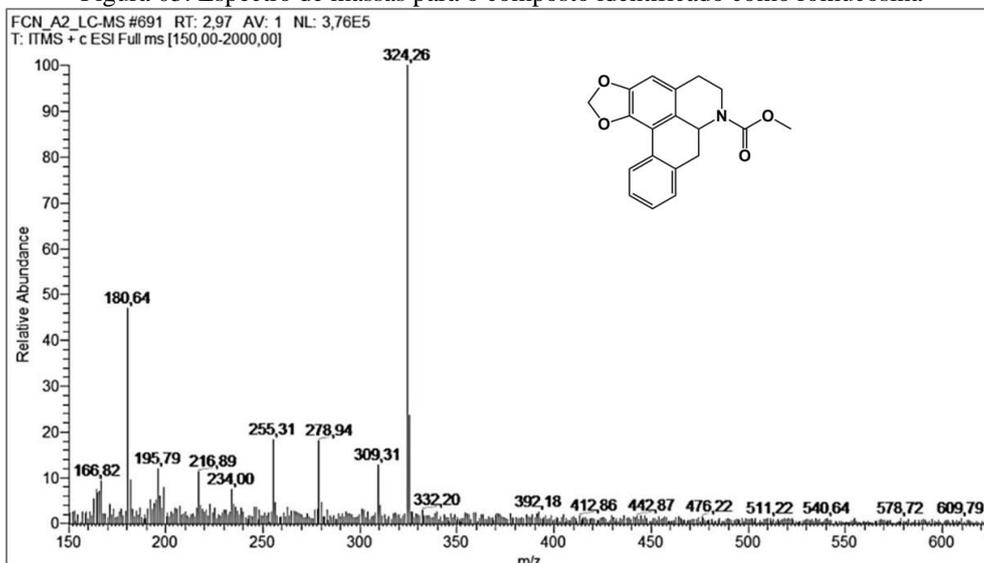
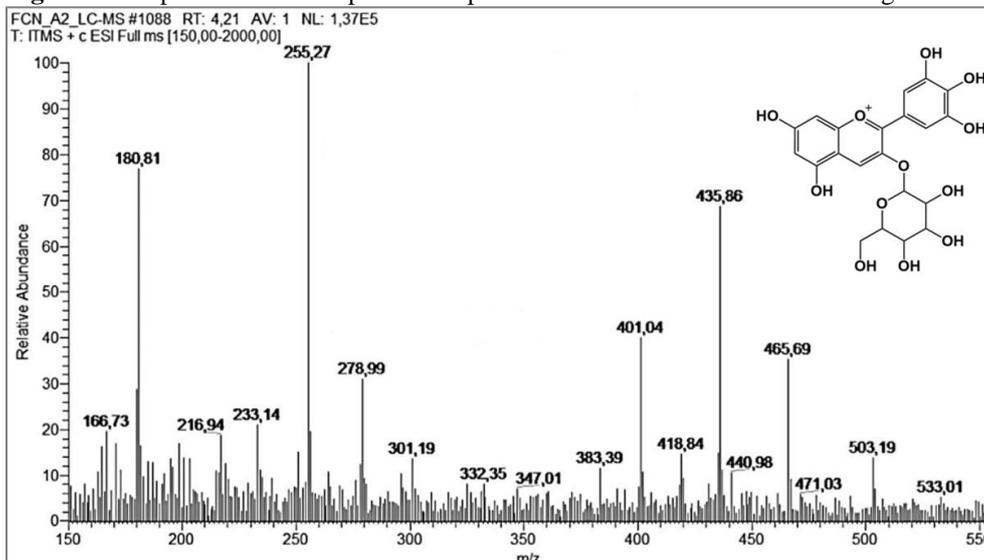


Figura 04: Espectro de massas para o composto identificado como delfinidina-3-glucosideo



3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

No **Quadro 01**, abaixo estão apresentados os halos de inibição medidos para o extrato hidroalcoólico, frações e a subfração FCN-A1. Os resultados foram avaliados considerando como forte inibição, halos com diâmetro maiores ou iguais a 15 mm, média inibição, halos com diâmetros entre 10 e 15 mm, e inativos, quando os halos observados forem menores que 10 mm (CIMANGA et al., 2002).

Quadro 01: Diâmetro dos halos de inibição do crescimento de bactérias e fungos avaliados pelo teste de difusão de poços

Microrganismos testados	Amostra/Diâmetro halos de inibição (mm)					
	EhF	FH	FC	FA	FAT	FCN-A1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13	7	10	10	16	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	NM	NM	NM	NM	8	NM
<i>Salmonella spp.</i> (isolado clínico)	NM	NM	NM	NM	7	8
<i>Candida albicans</i> ATCC 9002	NM	NM	NM	NM	12	9

EhF – Extrato hidroetanólico 70% das folhas; FH – Fração hexânica; FC – Fração clorofórmica; FA – Fração Acetato; FAT – Fração alcaloídica total; FCN-A1 – Fração clorofórmica neutra, alcaloide 1; NM – Não mensurável. Concentrações (em µg/mL): EhF= 67000; FH= 49800; FC= 53500; FA= 56900; FAT= 11000, FCN-A1= 76300.

Dos dados obtidos observa-se que os extratos apresentaram atividades microbiológicas para algumas das amostras testadas, principalmente nos ensaios realizados frente a bactéria gram-positivas *Staphylococcus aureus*, onde se observou forte inibição no crescimento para as frações de alcaloides totais (FAT) e FCN-A1. Não se observaram atividades inibitórias, através da metodologia de difusão em poços, em nenhuma das amostras testadas para as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*. Além disso, observou-se que algumas das amostras realizadas apresentaram halos de inibição de tamanhos irregulares, de forma que eles não foram medidos, apresentados como “NM” no **Quadro 01**.

A presença de compostos bioativos nos extratos e frações testados podem ser responsáveis pelas atividades observadas, visto que alguns tipos de flavonoides são capazes de formar complexos com proteínas solúveis e a parede celular de bactérias e fungos (ARIF et al., 2009; COWAN, 1999) inibindo assim seu crescimento, e que metabólitos como acetogeninas, comuns em anonáceas, e os alcaloides, presentes no extrato vegetal estudado, também possuem atividades antimicrobianas frente a diversos tipos de microrganismos. O potencial microbiológico da espécie *Annona mucosa* frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* já havia sido previamente avaliado, demonstrando a atividade do extrato frente a alguns microrganismos (SIMINSKI et al., 2015).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram o potencial dessa espécie para o estudo e desenvolvimento fármacos para o controle e tratamento de *S. aureus*, já que essa bactéria é considerada um importante agente patógeno visto sua resistência a antimicrobianos e associação a doenças e enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, e infecções de diversos tipos (ARDURA, 2009; LOWY, 1998).



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de cromatografia em camada delgada permitiram o isolamento de frações contendo alcaloides como constituintes majoritários, e a técnica foi aplicada como uma etapa de separação de frações contendo tais metabólitos.

A aplicação de técnicas acopladas de LC-MS, e das fragmentações múltiplas utilizadas permitiram a identificação estrutural do alcaloide romucosina, comum ao gênero *Annona*, e da antocianidina delfinidina-3-glucosídeo, sendo este o primeiro estudo em que houve o isolamento e identificação dessa antocianidina na espécie *Annona mucosa*.

Os ensaios microbiológicos indicam a presença de compostos ativos na fração alcaloídica total, bem como nas demais frações orgânicas, frente ao isolado clínico da bactéria *Staphylococcus aureus*, e para as frações alcaloídica total e FCN-A1 frente ao fungo *Candida albicans*, possibilitando a continuidade do estudo através da caracterização e avaliação da toxicidade desses metabólitos, afim de avaliar a possibilidade do desenvolvimento de fármacos.



REFERÊNCIAS

- ARDURA, M. I. Staphylococcus aureus: Vieja bacteria con nuevos trucos. Revista chilena de infectología, v. 26, n. 5, out. 2009.
- ARIF, T. et al. Natural products – antifungal agents derived from plants. Journal of Asian Natural Products Research, v. 11, n. 7, p. 621–638, jul. 2009.
- BARBOZA, T. J. DE S. Avaliação do potencial leishmanicida e antibacteriano de *Annona mucosa* Jacq. – Annonaceae cultivada in vivo e in vitro. Dissertação (mestrado em Biologia Vegetal)—Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 27 fev. 2013.
- BARON, D. Desenvolvimento de plantas jovens de *Annona emarginata* (SHLTDL.) H. Rainer (Araticum-de-terra-fria) cultivadas e solução nutritiva. Dissertação (Mestrado)—Botucatu - SP: Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2010.
- BARRECA, D. et al. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). Food Research International, v. 44, n. 7, p. 2302–2310, ago. 2011.
- BETANCUR-GALVIS, L. et al. Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94, n. 4, p. 531–535, jul. 1999.
- CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 169, n. 1, p. 5–40, maio 2012.
- CHEN, C.-Y. et al. Four alkaloids from *Annona cherimola*. Phytochemistry, v. 56, n. 7, p. 753–757, abr. 2001.
- CHEN, Y.-Y.; CHANG, F.-R.; WU, Y.-C. Isoquinoline Alkaloids and Lignans from *Rollinia mucosa*. Journal of Natural Products, v. 59, n. 9, p. 904–906, 1 jan. 1996.
- CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology, v. 79, n. 2, p. 213–220, fev. 2002.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of New Antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. Em: LORIAN, V. (Ed.). Antibiotics in Laboratory Medicine. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991.
- COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, v. 12, n. 4, p. 564–582, out. 1999.
- EGYDIO, A. P. M.; VALVASSOURA, T. A.; SANTOS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. Biochemical Systematics and Ecology, v. 46, p. 145–151, fev. 2013.
- FORMAGIO, A. S. N. et al. Composition and Evaluation of the Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of the Essential Oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. Journal of Medicinal Food, v. 16, n. 1, p. 20–25, jan. 2013a.



FORMAGIO, A. S. N. et al. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 13, n. 1, p. 14, 11 dez. 2013b.

GALASTRI, N. A. Morfoanatomia e ontogênese de frutos e sementes de *Annona dioica* A. St.-Hil., *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. e *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae). Dissertação (mestrado)—Botucatu - SP: Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2008.

GU, Z. et al. Isolation of new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chromatography/mass spectrometry. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 5, n. 10, p. 1911–1916, out. 1997.

JUDD, W. S. et al. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. 2. ed. [s.l.] Sinauer Associates Inc, 2002.

KOH, K.; YOUN, J. E.; KIM, H.-S. Identification of anthocyanins in black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties. Journal of Food Science and Technology, v. 51, n. 2, p. 377–381, 17 fev. 2014.

KUO, R.-Y. et al. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. Phytochemistry, v. 57, n. 3, p. 421–425, jun. 2001.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the annonaceae. Phytochemistry, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, jan. 1980.

LIMA, J. P. S. DE et al. In Vitro Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). Revista Virtual de Química, v. 4, n. 6, 2012.

LIU, H.; JIANG, W.; XIE, M. Flavonoids: Recent Advances as Anticancer Drugs. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, v. 5, n. 2, p. 152–164, 1 jun. 2010.

LORENZI, H. et al. Frutas Brasileiras Exóticas e Cultivadas: (de consumo in natura). [s.l.] Instituto Plantarum, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais do Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. Nova Odessa - SP: Instituto Planarum de Estudos de Flora LTDA, 2002.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. New England Journal of Medicine, v. 339, n. 8, p. 520–532, 20 ago. 1998.

LUNA, J. DE S. Estudo de Plantas Bioativas. Tese (doutorado em Química)—Recife - PE: Universidade federal de Pernambuco - UFPE, 2006.

MAAS, P. J. M. et al. An updated index to genera, species, and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. Nordic Journal of Botany, v. 29, n. 3, p. 257–356, jun. 2011.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological reviews, v. 52, n. 4, p. 673–751, dez. 2000.

RAYNAUD-LE GRANDIC, S. et al. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 58, n. 6–7, p. 388–392, jul. 2004.



RIBEIRO, L. DOP. et al. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, v. 55, p. 6–14, out. 2013.

RICE-EVANS, C. A. et al. The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free Radical Research*, v. 22, n. 4, p. 375–383, 7 jan. 1995.

RODRIGUES, C. M. S. DE C. Estudo Fitoquímico e avaliação biológica de *Annona leptopetala* (Annonaceae). Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais)—Petrolina - PE: Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, 2016.

ROY, A. et al. Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications. *BioMed Research International*, v. 2022, p. 1–9, 6 jun. 2022.

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

SILVA, M. S. DA et al. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1566–1570, 2009.

SIMINSKI, T. et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS ESPÉCIES *Aspidosperma nitidum*, *Annona crassiflora* e *Annona mucosa* FRENTE A CEPAS ATCC. *Enciclopédia Biosfera*, v. 11, n. 22, p. 2882–2892, 1 dez. 2015.

TURCHEN, L. M. et al. Potential phytoinsecticide of *Annona mucosa* (Jacq) (Annonaceae) in the control of brown stink bug. *Bioscience Journal*, v. 32, n. 3, p. 581–587, 2016.