

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA *in vitro* DE EXTRATOS VEGETAIS DA FAMÍLIA ANNONACEAE**

***In vitro* ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF VEGETABLE EXTRACTS OF THE FAMILY ANNONACEAE**

<sup>1\*</sup>Marcia Bay, <sup>2</sup>Anderson Rogério dos Santos, <sup>3</sup>Fernanda Bay Hurtado, <sup>4</sup>Ivanildes dos Santos Bastos, <sup>4</sup>Patrícia Puccinelli Orlandi, <sup>1</sup>Paulo Teixeira de Sousa Júnior.

<sup>1</sup> PPG-Bionorte, Universidade Federal do Mato Grosso, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Departamento de Química, 78060-900, Cuiabá-MT, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Campus Calama, 76820-441, Porto Velho-RO, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Rondônia, Departamento Acadêmico de Zootecnia, 76916-000, Presidente Médice-RO, Brasil.

<sup>4</sup>Coordenação de Biodiversidade em Saúde, Instituto Leônidas & Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, 69057-070, Manaus-AM, Brasil.

\*Autora correspondente: [marcia.bay@ifro.edu.br](mailto:marcia.bay@ifro.edu.br)

**RESUMO**

Neste trabalho foram descritas as avaliações das atividades antioxidante e antibacteriana dos extratos brutos etanólicos e metanólicos das espécies *Bocageopsis multiflora* (Mart.) R. E. Fr., *Duguetia quitarensis* (Benth.) R. E. Fr., *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff., e *Guatteria punctata* (Aubl.) R. A. Howard pertencentes à família Annonaceae. Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e os resultados foram expressos em termos da CE<sub>50</sub>. Dentre as espécies testadas os extratos alcoólicos da *B. multiflora* foram os que apresentaram o melhor resultado. A atividade antibacteriana dos extratos brutos foi avaliada por dois métodos distintos: difusão em Ágar – técnica do poço e através da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para ambos os métodos foram utilizados os microrganismos Gram-negativos: *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica* subsp. *typhimurium* e Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sumulans*. Os resultados obtidos para o ensaio antibacteriano pelo método de difusão em Ágar mostraram que os extratos alcoólicos de todas as espécies foram inativos frente aos microrganismos testados, no entanto quando avaliado através da CIM foi observada atividade para os extratos brutos alcoólicos frente aos microrganismos Gram-positivos destacando a melhor atividade para o extrato metanólico da *B. multiflora* (CIM = 2,5 mg/mL).

**Palavras-chave:** *Bocageopsis multiflora*. *Duguetia quitarensis*. *Fusaea longifolia*. *Guatteria punctata*.

**ABSTRACT**

In this work, the evaluations of the antioxidant and antibacterial activities of the crude ethanolic and methanolic extracts of the species *Bocageopsis multiflora* (Mart.) R. E. Fr., *Duguetia quitarensis* (Benth.) R. E. Fr., *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff., and *Guatteria punctata* (Aubl.) R. A. Howard belonging to the family Annonaceae were described. For the evaluation of antioxidant activity, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) free radical scavenging method was used and the results were expressed in terms of the EC<sub>50</sub>. Among the tested species, the alcoholic extracts of *B. multiflora* were the ones that presented the best result. The antibacterial activity of the crude extracts was evaluated by two different methods: diffusion in Agar - well technique and through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). For both methods were used microorganisms: Gram-negative Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* subsp. *typhimurium* and Gram-positive: *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus sumulans*. The results observed for the antibacterial assay by the Agar diffusion method showed that the alcoholic extracts of all species were inactive in relation to the tested microorganisms, however when evaluated through the MIC, some degree of activity was observed for the crude alcoholic extracts against the microorganisms Gram-positives highlighting the best activity presented for *B. multiflora* methanolic extract (MIC = 2.5 mg / mL).

**Key words:** *Bocageopsis multiflora*. *Duguetia quitarensis*. *Fusaea longifolia*. *Guatteria punctata*.

## 1. INTRODUÇÃO

Annonaceae é uma família de plantas Pantropical importante com 110 gêneros e aproximadamente 2.450 espécies, ocorrendo em todas as florestas tropicais maiores e menores do mundo [1].

No Brasil, esta família é representada por 29 gêneros, sendo 1 endêmico e 386 espécies. A maior distribuição de espécies da família Annonaceae é encontrada na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica [2].

Quimicamente, a família Annonaceae é constituída por diversas classes de metabólitos primários e secundários, dentre elas: carboidratos, lipídios, aminoácidos, polifenóis (ácidos fenólicos, catequinas, proantocianidinas e taninos), flavonoides, terpenos, compostos aromáticos, acetogeninas (compostos poliacetilênicos), vitaminas, carotenos, glicosídeos cianogênicos, amidas e, principalmente, alcaloides derivados do núcleo isoquinolínico [3,4,5]. Do ponto de vista biológico, destacamos as propriedades dos alcaloides e flavonoides.

Os alcaloides derivados do núcleo isoquinolínico têm demonstrado promissora atividade tranquilizante em ensaios preliminares, no entanto, poucos compostos dessa natureza têm sido empregados nessa terapêutica. Há relatos também de propriedades analgésicas, antitussígena, antiarrítmica, antiviral e antiprotozoária [6,7].

Os flavonoides constituem uma classe de compostos fenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal e apresentam diversas propriedades biológicas, no entanto, existem três propriedades pelas quais os flavonoides são bem reconhecidos. 1) antioxidante, 2) antiproliferativa e 3) anti-inflamatória [8].

O gênero *Bocageopsis* (R.E.Fr.) é constituído por quatro espécies: *B. canescens* (Benth.) R.E.Fr., *B. mattogrossensis* (R.E.Fr.) R.E.Fr., *B. multiflora* (Mart.) R.E.Fr. e, mais recentemente, *B. pleiosperma* Maas [9]. No Brasil, a espécie *B. multiflora* é, popularmente, conhecida como envira-surucucu, envira-ferro e envira-preta [10].

O gênero *Duguetia* A. St.-Hil. compreende 94 espécies, das quais 89 ocorrem em regiões Neotropicais e 4 na África. No Brasil, o gênero é um dos mais representados na flora brasileira [11]. A espécie *D. quitarensis* (sinônimas: *Aberemoa quitarensis* Benth. R.E.Fr., *Duguetia ibonensis* Rusby, e *Duguetia tessmannii* R.E.Fr.) é uma das espécies mais comuns do gênero e está distribuída na região Amazônica e da Venezuela até a

Bolívia. Economicamente, a sua madeira é explorada no segmento de construção civil [12,13,14].

*Fusaea* (Baill.) Saff. é outro gênero da família Annonaceae que foi encontrado por Safford em 1914. A espécie *F. longifolia* (Aubl.) Saff. foi, originalmente, descrita por Aublet (1775) como *Annona longifolia* que, posteriormente, foi colocada no gênero *Duguetia* separada do resto do gênero sob o nome seccional de *Fusaea*. Atualmente, o gênero *Fusaea* é constituído por três espécies: *F. longifolia*, *F. decurrens* e *F. peruviana* [15]. A espécie *F. longifolia* (sinonímias: *Annona longifolia* Aubl., *Fusaea rhombipetala* Ruiz e Pav. Ex G. Don JFMacbr. e *Duguetia longifolia* Aubl. Bail.) é conhecida no Nordeste do Brasil como envira e envireira e é encontrada nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso e Pará [16].

*Guatteria* Ruiz & Pav. é o maior gênero da família Annonaceae com 177 espécies que ocorre desde o Sudeste do México até a Bolívia. No Brasil, ocorre na região Sudeste com grande diversidade na região Amazônica [17,18]. A espécie *Guatteria punctata* (Aubl.) R.A.Howard (sinonímia: *Annona punctata*) de distribuição nativa e não endêmica, ocorre nas regiões Norte (Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia), Nordeste (Maranhão) e Amazônia [19].

Recentemente, os estudos sobre fitoquímica e atividade biológica das annonaceas estão sendo intensificados, diante da importância que as mesmas apresentam. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo determinar os teores de fenóis e flavonoides totais, assim como avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Bocageopsis multiflora*, *Duguetia quitarensis*, *Fusae longifolia* e *Guatteria punctata*. Para estas espécies não foram encontrados relatos de estudos etnofarmacológicos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

As espécies, *B. multiflora* (Mart.) R.E.Fr. e *F. longifolia* (Aubl.) Saff., foram coletadas, em julho de 2018, na Floresta Nacional Bom Futuro (-9.34392015, -63.84703397) na cidade de Porto Velho/Rondônia e uma amostra de cada espécie foi depositada no Herbário Rondoniense da Universidade Federal de Rondônia e registrada sob os números RON 16576 e RON 16560, respectivamente. A espécie *D. quitarensis* (Benth.) foi coletada, em julho de 2018, às margens do Rio Jaci Paraná (-10.3047867, -

64.2095641) e uma amostra foi depositada no Herbário Rondoniense da Universidade Federal de Rondônia e registrada sob o número RON 648. A espécie *G. punctata* (Aubl.) Saff. foi coletada, em setembro de 2018, em um fragmento de mata às margens do *Campus* da Universidade Federal de Rondônia – BR 364 (-11.41593905, -61.45440246) e, uma amostra, foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Acre e registrada sob o número UFACPZ 20683.

## 2.2. Preparação dos extratos brutos vegetais

As partes aéreas: folhas e galhos finos das espécies *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* foram secas ao ar livre a temperatura ambiente e trituradas, separadamente, em triturador (JBM 58 Profissional, copo Inox). Foram utilizados (250,0 g) do material obtido, que foi submetido ao processo de maceração a frio por 15 dias com troca de solvente (700 mL) a cada 48 horas. O material filtrado foi concentrado em evaporador rotativo para obtenção do extrato bruto. As extrações foram realizadas, separadamente, utilizando como solventes: etanol 95% (Neon) e metanol P.A. (Neon). Desta forma, foram obtidos o Extrato Bruto Etanólico de *B. multiflora* (**EBEBM**), Extrato Bruto Metanólico de *B. multiflora* (**EBMBM**), Extrato Bruto Etanólico de *D. quitarensis* (**EBEDQ**), Extrato Bruto Metanólico de *D. quitarensis* (**EBMDQ**), Extrato Bruto Etanólico de *F. longifolia* (**EBEFL**), Extrato Bruto Metanólico de *F. longifolia* (**EBMFL**), Extrato Bruto Etanólico de *G. punctata* (**EBEGP**) e Extrato Bruto Metanólico de *G. punctata* (**EBMGP**). Na Tabela 1 estão os rendimentos, em porcentagem, dos extratos vegetais obtidos.

**Tabela 1.** Rendimento dos extratos brutos vegetais alcoólicos.

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
<b>EBEBM</b>	18	7,2
<b>EBMBM</b>	26	10,4
<b>EBEDQ</b>	15	6,0
<b>EBMDQ</b>	18	7,2
<b>EBEFL</b>	18	7,2
<b>EBMFL</b>	23	9,2
<b>EBEGP</b>	13	5,2
<b>EBMGP</b>	15	6,0

### 2.3. Triagem fitoquímica

Os extratos brutos alcoólicos foram testados para alcaloides (reativo de Bouchardat, reativo de Dragendorff e reativo de Mayer), fenóis, taninos, flavonoides e esteroides/triterpenoides. A triagem fitoquímica foi realizada usando procedimentos padrões [20].

### 2.4. Determinação dos fenólicos totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras dos extratos alcoólicos das espécies estudadas foi realizada por espectroscopia na região visível através do método de Folin-Ciocalteu [21]. Os extratos brutos foram diluídos em etanol para obter soluções com concentrações de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A uma alíquota de 0,1 mL de cada solução foram adicionados 7,0 mL de água, 0,8 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:3 de água) e 1,2 mL de solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20%. Após 2 horas, as absorbâncias das amostras foram medidas a 760 nm. A curva padrão foi preparada usando soluções etanólicas de ácido gálico nas concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 e  $70 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os valores dos teores de fenóis totais foram expressos em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG/g de extrato bruto).

### 2.5. Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2,-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

Os ensaios de atividade antioxidante dos extratos brutos etanólico e metanólico das partes aéreas das espécies vegetais *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* foram avaliados através do método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) [22]. Foram preparadas soluções estoques dos extratos e do padrão ácido ascórbico na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A partir dessas soluções foram realizadas diluições nas concentrações finais de 1, 3, 9, 27, 81 e  $243 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  em etanol absoluto. Uma solução do radical DPPH foi preparada em etanol, na concentração de  $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em seguida, foi adicionado 1 mL desta solução a 2,5 mL de cada uma das diluições dos extratos. A mistura reacional foi mantida em repouso a temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante 30 minutos e, posteriormente, foram realizadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro (UV-Vis Shimadzu 1800) em 518 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em percentual de atividade antioxidante através da equação: AA (%)

=  $100 - (\Delta\text{Abs} \times 100) / \text{Abs}_{\text{controle}}$  onde  $\Delta\text{Abs}$  é a diferença entre as absorbâncias da amostra e do branco e  $\text{Abs}_{\text{controle}}$  representa a absorbância do controle negativo (1 mL da solução de DPPH + 2,5 mL de etanol absoluto). Como branco foram utilizadas soluções de etanol (1 mL) com as amostras (2,5 mL). As medidas foram realizadas em triplicatas.

## 2.6. Ensaio da atividade antibacteriana pelo método de difusão em Ágar – técnica do poço

Os ensaios de atividade antibacteriana pelo método de difusão em Ágar foram realizados frente às bactérias *Gram*-negativas: *Escherichia coli* enterohemorrágica – EHEC (CDC-EDL 933-171-0157:H3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC CDC-EDL 1284), *Salmonella enterica subsp. typhimurium* (ATCC 13311-084) e *Gram*-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 80958) e *Staphylococcus sumulans* (ATCC 27851). As linhagens bacterianas utilizadas pertencem à bacterioteca da Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos (RPT11H), do Instituto Leônidas Marques e Maria Deana (ILMD) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Manaus, AM, Brasil. Os **(EBEBM)**, **(EBMBM)**, **(EBEDQ)**, **(EBMDQ)**, **(EBEFL)**, **(EBMFL)**, **(EBEGP)** e **(EBMGP)** foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e a concentração inicial da amostra foi de 5 mg/mL no poço. As linhagens foram cultivadas previamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI)(HIMEDIA). As culturas microbianas foram, então, diluídas em meio de cultura conforme a escala de 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A determinação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em Ágar, pela técnica do poço, foi realizada conforme descrito por Groove e Randall [23], com modificações. Foi utilizado o meio de cultura Ágar Müeller Hinton (AMH)(HIMEDIA) para a realização dos testes. Como controle positivo foram utilizadas as drogas TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500 µg/mL. As placas foram incubadas a 37° C por 24 h, em seguida adicionado uma solução corante de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) a 0,01% acrescido de 0,1% de Ágar bacteriológico, ocorrendo uma reincubação por 30 minutos. Após a conversão de coloração na sobrecamada foi feita a medição dos halos de inibição.

## 2.7. Ensaio da atividade antibacteriana pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antibacteriana pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados para as mesmas amostras e linhagens microbianas testadas no método de difusão em Ágar. As amostras foram inicialmente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, sendo que a concentração final nos poços foi de 2,5%. Oito concentrações foram avaliadas que variaram de 5 mg/mL a 0,039 mg/mL no poço. As linhagens foram cultivadas previamente em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI)(HIMEDIA). As culturas microbianas foram diluídas em meio de cultura conforme a escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os valores de CMI foram determinados utilizando o método de microdiluição em placa de 96 poços, de acordo com CLSI [24], com modificações. Cada orifício foi colocado o inoculo bacteriano padronizado, as quais foram avaliadas em concentrações que variaram de 5 mg/mL a 0,039 mg/mL. Em seguida foram acrescentados 50  $\mu$ L de *Müller Hinton Broth* (MH)(HIMEDIA) em todos os 96 orifícios, sendo que nos primeiros orifícios, foram adicionados mais 50  $\mu$ L do extrato a ser testado, completando um volume de 100  $\mu$ L, posteriormente realizou-se uma diluição 1:2, após foi retirado e descartado 50  $\mu$ L. Para completar um volume final de 100  $\mu$ L/poço foram adicionados 20  $\mu$ L de inoculo bacteriano, 30  $\mu$ L de MH e, em seguida, as placas foram incubadas a 37° C por 24 h, seguido por adição de 10  $\mu$ L de resazurina a 0,01% reincubação por 2 h. Como controle negativo foi utilizado o DMSO 2,5% e o inoculo bacteriano foi utilizado como controle positivo. A droga controle TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) foi utilizada nas mesmas concentrações das amostras teste. Em seguida, as placas foram incubadas a 37° C por 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento bacteriano indicado pela permanência da coloração azul da resazurina. Foi realizada leitura do comprimento de onda no leitor de microplacas Sunrise Tecan a cada 24 horas.

## 2.8. Análise Estatística

Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de três repetições (n=3) e desvio padrão da média. Através do teste *t* de Student para as atividades antioxidantes foi verificado que os experimentos realizados com cada extrato são, estatisticamente, equivalentes. A eficiência antiradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão não linear no intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) e os resultados foram expressos através do valor de CE<sub>50</sub>, que representa a concentração da amostra

necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH. Para o teor de fenólicos totais foi utilizado ANOVA e as comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas e a determinação dos valores de CE<sub>50</sub> foram realizadas no software GraphPad Prism versão 8<sup>®</sup>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fitoquímica preliminar mostrou a presença de fenóis e taninos, alcaloides, esteroides e triterpenos. A atividade antioxidante está geralmente relacionada à quantidade de compostos fenólicos presentes nas plantas [25], desta forma, o teor destes compostos, assim como a presença de outras classes de metabólitos secundários foram determinadas nos extratos estudados, conforme apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Metabólitos secundários dos extratos vegetais das espécies *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata*.

Teste	Fenóis e Taninos	Flavonoides	Alcaloides	Esteroides e triterpenos
<b>EBEBM</b>	+	-	-	+
<b>EBMBM</b>	+	-	-	-
<b>EBEDQ</b>	-	+	+	-
<b>EBMDQ</b>	-	+	+	-
<b>EBEFL</b>	+	-	-	+
<b>EBMFL</b>	+	-	-	+
<b>EBEGP</b>	+	-	+	+
<b>EBMGP</b>	+	-	+	+

Os extratos brutos etanólicos e metanólicos de *B. multiflora* mostraram a presença de fenóis e taninos, enquanto o extrato etanólico etanólico desta espécie mostrou resultado positivo para esteroides e triterpenos. Os resultados obtidos para os extratos brutos etanólicos e metanólicos de *D. quitarensis* mostraram a presença de flavonoides e alcaloides que são metabólitos secundários característicos de espécies pertencentes a este gênero [26]. Os ensaios para os extratos brutos de *F. longifolia* apresentaram a presença de fenóis, taninos, esteroides e triterpenos. A presença de alcaloides, muito comuns em

espécies da família Annonaceae não foi verificada nos extratos desta espécie e a ausência foi corroborada através de análise dos extratos brutos por cromatografia em camada delgada analítica utilizando o reagente de Dragendorff como revelador. Os extratos alcoólicos da espécie *G. punctata* foram os que apresentaram maior diversidade em metabólitos secundários. A avaliação preliminar qualitativa dos extratos brutos alcoólicos revelando a presença de compostos fenólicos sugeriu a avaliação do potencial antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) dos extratos alcoólicos das espécies estudadas, conforme apresentado na Tabela 3.

A importância dos radicais livres no metabolismo celular vem se tornando clara em função da intensa investigação em vários campos, incluindo estudos de peroxidação lipídica, sistemas de oxi redutase e no papel do superóxido dismutase. O interesse por radicais livres e antioxidantes tem se intensificado ultimamente, pelo possível papel dessas substâncias na patogênese de diversas doenças [27].

**Tabela 3.** Percentagem da atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos vegetais em diferentes concentrações.

Amostra	Concentrações ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
	1	3	9	27	81	243
<b>EBEBM</b>	14,78±3,41	27,66±2,33	43,62±3,07	78,96±6,25	89,36±2,16	93,14±0,20
<b>EBMBM</b>	24,09±2,59	41,08±1,78	71,61±1,16	87,31±1,34	89,57±0,81	88,71±0,56
<b>EBEDQ</b>	1,01±0,67	6,30±0,76	18,14±0,67	56,17±0,25	89,59±0,15	89,42±0,44
<b>EBMDQ</b>	0,00±0,00	1,94±1,45	9,48±3,76	22,63±2,21	53,72±5,92	92,35±1,70
<b>EBEFL</b>	13,67±9,84	26,54±3,26	30,47±5,29	40,93±7,18	86,95±3,85	91,60±1,74
<b>EBMFL</b>	2,55±5,55	11,41±4,46	16,16±2,90	33,75±2,32	80,15±0,74	93,23±2,02
<b>EBEGP</b>	36,12±2,91	39,34±3,99	41,43±3,01	54,13±2,19	82,94±1,99	88,86±2,19
<b>EBMGP</b>	18,58±3,23	24,05±0,71	35,50±1,29	63,16±1,93	91,02±0,31	90,51±0,36
<b>AA</b>	20,02±1,47	63,27±3,44	89,40±2,19	93,89±0,51	95,17±0,25	96,86±0,82

AA: Ácido ascórbico

Através do ensaio de atividade antioxidante dos extratos vegetais verificou-se que em todos os extratos o percentual de atividade antioxidante aumentou proporcionalmente com a concentração do extrato. Analisando os resultados na concentração de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foi verificado que os extratos brutos metanólico de *B. multiflora* ( $24,09 \pm 2,59$ ) e o extrato bruto etanólico de *G. punctata* ( $36,12 \pm 2,91$ ) apresentaram maior atividade antioxidante do que o ácido ascórbico utilizado como controle positivo. Nas demais concentrações nenhuma das amostras testadas foram mais ativas que o ácido ascórbico. Esta alta atividade sequestradora de radicais livres pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos ( $31,89 \pm 1,04$ ) *Bocageopsis multiflora* e ( $38,39 \pm 6,68$ ) para a *Gutteria punctata* em maior concentração quando comparados aos outros extratos.

O conteúdo total de constituintes fenólicos dos extratos alcoólicos usando o reagente de Folin-Ciocalteu foi expresso em termos de equivalente de ácido gálico (equação da curva padrão:  $y = 0,004057 - 0,01924x$ ;  $R^2 = 0,9975$ ). Na Tabela 4 são apresentados os teores de fenóis totais e os valores de  $CE_{50}$  para os extratos brutos alcoólicos das espécies *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata*.

**Tabela 4.** Teor de fenólicos totais (mg de EAG/g de extrato) e valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os extratos brutos.

Amostra	Fenóis Totais (mg EAG/g Extrato)			
	Extrato Etanólico	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Extrato Metanólico	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
<i>B. multiflora</i>	$9,77 \pm 0,11^a$	$11,91 \pm 0,24$	$31,89 \pm 1,04^a$	$4,91 \pm 0,75$
<i>D. quitarensis</i>	$28,45 \pm 0,07^b$	$21,32 \pm 0,37$	$15,16 \pm 0,10^b$	$88,59 \pm 1,93$
<i>F. longifolia</i>	$13,04 \pm 0,02^c$	$36,83 \pm 6,56$	$26,15 \pm 0,54^c$	$40,53 \pm 4,05$
<i>G. punctata</i>	$16,02 \pm 0,31^d$	$38,39 \pm 6,68$	$28,50 \pm 1,77^{c,d}$	$20,69 \pm 1,95$
Ácido Ascórbico	-	$1,88 \pm 0,89$		$1,88 \pm 0,89$

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ); médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); EAG (Equivalente de Ácido Gálico)

Os valores obtidos para a concentração de fenóis totais foram expressos como mg de EAG/g de extrato. Através dos resultados obtidos foi possível verificar que os extratos alcoólicos de todas as espécies apresentaram atividade antioxidante. A maior atividade apresentada, verificada através dos valores de  $CE_{50}$ , foi para o **EMBM** ( $4,91 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )

$\pm 0,75$ ). Esse resultado apresentou correlação direta com o teor de fenóis totais para a espécie ( $31,84 \pm 1,04$  mg EAG/g de extrato). Foi observado também que o **EBEBM** apresentou o menor teor de fenólicos ( $9,77 \pm 0,11$  mg de EAG/g de extrato) entre todos, no entanto a atividade do **EBEBM** foi a maior dentre elas ( $CE_{50} 11,91 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \pm 0,24$ ). Esta análise sugere a presença de constituintes que contribuem efetivamente para a ação sequestradora de radicais livres no extrato desta espécie [28]. Estatisticamente foi verificado que os extratos etanólicos das espécies estudadas apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no teor de fenóis totais, conforme mostra a tabela 4. Para o extrato metanólico diferenças significativas também foram observadas com exceção à composição do teor de fenóis totais dos extratos de *F. longifolia* e *G. punctata*.

Os extratos brutos alcoólicos das espécies *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* foram avaliados quanto às suas atividades antibacterianas por dois métodos distintos: método de difusão em Ágar – técnica do poço e através da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Através do ensaio de atividade antibacteriana, Tabela 5, pelo método de difusão em Ágar – técnica do poço foi verificado que os extratos brutos alcoólicos das quatro espécies foram inativos frente aos microrganismos testados. Os ensaios realizados através da CIM mostraram que os extratos alcoólicos das quatro espécies estudadas não foram ativos frente às bactérias *Gram*-negativas testadas. Notadamente, microrganismos *Gram*-negativos mostram-se mais resistentes à ação de antimicrobianos, uma vez que sua parede celular se encontra protegida por uma camada de lipopolissacarídeos [29]. Os **EBEBM** e **EBMBM** e o **EBMDQ** foram ativos frente à bactéria *S. aureus* (CIM = 5 mg/mL). Os extratos alcoólicos quando avaliados frente à bactéria *Gram*-positiva *S. sumulans* revelou que apenas os **EBMBM** e **EBMDQ** foram ativos com valores de CIM de 2,5 e 5 mg/mL, respectivamente.

**Tabela 5.** Atividade antibacteriana dos extratos brutos etanólicos e metanólicos de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* pelos métodos de difusão em Ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Amostra	<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. enterica subsp.</i> <i>typhimurium</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. sumulans</i>	
	Dif. (mm)	CIM (mg/mL)	Dif. (mm)	CIM (mg/mL)	Dif. (mm)	CIM (mg/mL)	Dif. (mm)	CIM (mg/mL)	Dif. (mm)	CIM (mg/mL)
EBEBM	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-
EBMBM	-	-	-	-	-	-	-	5	-	2,5
EBEDQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EBMDQ	-	-	-	-	-	-	-	5	-	5
EBEFL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EBMFL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EBEGP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EBMGP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TIENAM	33,66±0,57	0,00117	29,33±0,57	0,00117	34,33±0,57	0,00117	35,66±0,57	0,00468	36,66±0,57	0,00468

## CONCLUSÕES

Através deste estudo verificou-se, pela primeira vez, que as quatro espécies investigadas pertencentes à família Annonaceae apresentaram diferentes graus de atividade antioxidante e, em sua composição, teores variados de compostos fenólicos. A espécie *B. multiflora* foi a que apresentou os melhores resultados de atividade antioxidante para ambos os extratos. A menor atividade foi apresentada para o extrato metanólico de *D. quitarensis* mesmo sendo observada, através da triagem fitoquímica, a presença de flavonoides, sugerindo que os flavonoides presentes nesta espécie, não contribuem efetivamente para a atividade antioxidante. Os resultados da atividade antibacteriana mostram que os extratos brutos alcoólicos das quatro espécies não apresentaram atividade antibacteriana frente a nenhuma das linhagens testadas pelo método de difusão em Ágar – técnica do poço. Quando avaliadas através da Concentração Inibitória Mínima os resultados mostraram que os **EBEBM**, **EBMBM** e **EBMDQ** foram ativos frente à *S. aureus*. Os **EBMBM** e **EBMDQ** foram ativos frente à *S. sumulans*, sendo que a atividade antibacteriana de **EBMBM** foi a melhor apresentada neste estudo. O isolamento dos constituintes químicos, presentes nas espécies estudadas, encontra-se em andamento e a avaliação das atividades antioxidante e antibacteriana dos constituintes puros e majoritários serão realizadas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Leônidas & Maria Deane (Fiocruz) Manaus-AM, pelos ensaios de atividade antibacteriana e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO).

## REFERÊNCIAS

- [1] COUVREUR, T. L. P.; HELMSTETTER, A. J.; KOENEN, E. J. M., BETHUNE, K.; BRANDÃO, R. D.; LITTLE, S. A.; SAUQUET, H.; ERKENS, R. H. J. Phylogenomics of the major tropical plant family Annonaceae using targeted enrichment of nuclear genes. **Front Plant Sci.**, v. 9, p. 1941, 2019.
- [2] RIBEIRO, L. P.; VENDRAMIM, J. D.; GONÇALVES, G. L. P.; ANSANTE, T. F.; DA GLÓRIA, E. M.; LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R.; FERNANDES, J. B. Searching for promising sources of grain protectors in extracts from Neotropical Annonaceae. **Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromát.**, v. 15, n. 4, p. 215-232, 2016.

- [3] LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.
- [4] SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 567-573, 2000.
- [5] CORTES, D.; FIGADERE, B.; CAVÉ, A. Bis-tetrahydrofuran acetogenins from Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1467-1473, 1993.
- [6] CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M. Em **Química dos Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; Orgs.; Univali editora, 2009, cap. XI.
- [7] TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; DE ANDRADE JUNIOR, H. F.; GUALDA, N. C. A.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005.
- [8] MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Em **Química dos Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; Orgs.; Univali editora, 2009, cap. VIII.
- [9] MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y.; VERMEER, M. Revision of the neotropical genera *Bocagopsis*, *Onychopetalum* and *Unonopsis* (Annonaceae). **Blumea**, v. 52, n. 3, p. 413-554, 2007.
- [10] ALARCÓN, J. G. S.; PEIXOTO, A. L. Florística e fitossociologia de um trecho de um hectare de floresta de terra firme, em Caracaraí, Roraima, Brasil. **Bol Mus Para Emílio Goeldi, sér. Ciências Naturais**, v. 2, n. 2, p. 33-60, 2007.
- [11] BAZANTE, M.; ALVES, M. A new species of *Duguetia* (Annonaceae) from the atlantic forest of northeastern Brazil. **Phytotaxa**, v. 314, n. 2, p. 266-272, 2017.
- [12] MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Q.; ERKENS, R. H. J. An updated index to genera, species, and infraspecific taxa of neotropical Annonaceae. **Nordic J Bot**, v. 29, n.3, p. 257-356, 2011.
- [13] FLORES BENDEZÚ, Y. **Catálogo de espécies aboreas del anexo experimental Alexander von Humboldt, Ucayali**, 1a. ed., Ultra Color E.I.R.L: Pucallpa, Ucayali, 2017.
- [14] FLORES BENDEZÚ, Y. **Árboles nativos de la región Ucayali**. 1a. ed., Imprenta Davidson: Pucallpa, 2018.
- [15] CHATROU, L. W.; HE, P. Studies in Annonaceae XXXIII. A revision of *Fusaea* (Baill.) Saff. **Brittonia**, v. 51, n. 2, p. 181-203, 1999.

- [16] TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; DA CUNHA, E. V. L. Alkaloids and volatile constituents from the stem of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n. 2, p. 115-118, 2005.
- [17] LOBÃO, A. Q. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Annonaceae. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5, p. 1205-1209, 2016.
- [18] DOS SANTOS, A. R.; PIRES, C.; MARQUES, F. A.; LOBÃO, A. Q.; MAIA, B. H. L. N. S. Isoquinoline alkaloids isolated from three *Guatteria* species. **Biochem Syst Ecol**, v. 73, p. 1-2, 2017.
- [19] MAAS, P.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Em **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, FORZZA, R. C.; LEITMAN, P.; Orgs.; Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, vol. 2, Scielo Books: Rio de Janeiro, 2010, vol. 1.
- [20] BARBOSA, W. L. R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I. C. C.; PINTO, L. N.; DE OLIVEIRA, F. Q.; DE OLIVEIRA, R. M. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Rev Cient Univers Federal do Pará**, v. 4, n. 5, 1-19, 2004.
- [21] SANTI, M. M.; SANCHES, F. S.; SILVA, J. F. M.; SANTOS, P. M. L. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenácea* DC. por HPLC-DAD. **Rev Bras Plant Med**, v. 16, n. 2, p. 256-261, 2014.
- [22] TORRES, D. S.; PEREIRA, E. C. V.; SAMPAIO, P. A.; DE SOUZA, N. A. C.; FERRAZ, C. A. A.; DE OLIVEIRA, A. P.; MOURA, C. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ROLIM-NETO, P.J.; DE OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G.; ROLIM, L. A. Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidoscolus quercifolius* POHL (Euphorbiaceae) e atividade antioxidante. **Quim Nova**, v. 41, n. 7, p. 743-747, 2018.
- [23] GROOVE, D. C.; RANDALL, W. A.; **Métodos de Ensaio de Antibióticos**, Nova Iorque, 1955.
- [24] CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- [25] MAGINA, M. A.; GILIOLI, A.; MORESCO, H. H.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Lat Am J Pharm**, v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.
- [26] CAROLLO, C. A.; HELLMANN-CAROLLO, A. R.; DE SIQUEIRA, J. M.; ALBUQUERQUE, S. Alkaloids and a flavonoid from aerial parts (leaves and twigs) of *Duguetia furfuracea* – Annonaceae. **J Chil Chem Soc**, v. 51, n. 2, p. 837-841, 2006.

- [27] COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; DOS SANTOS, A. F. Método de avaliação da defesa antioxidante: Uma revisão da literatura. **Unopar Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-237, 2013.
- [28] SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- [29] GOULD, D. Effective strategies for prevention and control of Gram-negative infections. **Nurs Stand**, v. 23, n. 48, p. 42-46, 2009.