



Estudo químico e avaliação da atividade citotóxica do extrato etanólico das cascas do araticum (*Annona crassiflora*) frente às células de carcinoma colorretal (HCT116)

Nikolas M. V. Carmo^{1*} (G), Íngrede F. Silva¹ (PG), Marília F. Barbosa¹ (PG), Paula R. Teixeira (PQ)², Letícia V. C. Lotufo² (PQ), Amanda Danuello¹ (PQ), Marcos Pivatto¹ (PQ)

*nikolas.vulcao@ufu.br

¹Núcleo de Pesquisa em Compostos Bioativos (NPCBio), Instituto de Química, Bloco 1D, Universidade Federal de Uberlândia.

²Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

O araticum (*Annona crassiflora*) é uma espécie nativa do Cerrado, usada pela população na culinária e na medicina popular, no tratamento de infecções e diarreia. Espécies do gênero *Annona* apresentam atividades biológicas diversas, incluindo ação anticancerígena, atribuída principalmente aos alcaloides aporfínicos. Neste estudo, as cascas do fruto foram secas, trituradas e submetidas à extração com etanol por maceração. Em seguida, o extrato etanólico (EE) foi submetido a extração líquido-líquido com hexano (HEX), diclorometano (CH_2Cl_2) e acetato de etila (AcOEt) para obter as frações orgânicas. As frações foram submetidas a análise por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como revelador o reagente de Dragendorff, específico para alcaloides, sendo possível observar a presença dessa classe de compostos na fração CH_2Cl_2 . Para avaliar o potencial antitumoral, o extrato etanólico e as frações foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade utilizando linhagens celulares do carcinoma colorretal (HCT116). O EE e as frações (HEX, CH_2Cl_2 e AcOEt) foram avaliados na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inibiram o crescimento celular em 87,9, 96,5, 81,5 e 35,96 %, respectivamente. Foram consideradas ativas as amostras com percentagem de inibição acima de 75%, sendo que o controle positivo foi doxorrubicina com 100% de inibição nessa concentração. A fração em CH_2Cl_2 foi selecionada para estudo químico pelo potencial de inibição das células cancerígenas e por ser rica em alcaloides, sendo submetida a cromatografia em coluna (CC) utilizando um gradiente de solventes de polaridade crescente (hexano- CH_2Cl_2 -AcOEt-MeOH), de onde foram coletadas 54 subfrações que foram reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f . A subfração NVC01F₂₀₀₋₂₅₁ apresentou diferentes manchas alaranjadas na análise por CCD quando aspergida com o reagente de Dragendorff, indicando a presença dos alcaloides. Esta fração foi submetida à CC, resultando no isolamento de um alcaloide que tem R_f 0,62, mesmo valor do padrão de estefalagina (alcaloide aporfínico). Nas próximas etapas, este alcaloide será caracterizado por técnicas espectroscópicas (RMN e UV) e espectrométricas (espectrometria de massas) e também será submetido a um ensaio para avaliar o potencial citotóxico frente às células tumorais HCT116. Nesse contexto, nosso estudo busca ampliar o conhecimento químico e biológico sobre o araticum, promovendo sua valorização e incentivando a preservação e uso sustentável do Cerrado brasileiro.

Palavras-chave: *Annona crassiflora*, alcaloides, cromatografia, colorretal.

Introdução

O araticum (*Annona crassiflora*) é uma espécie frutífera nativa do Cerrado brasileiro, amplamente apreciada tanto na culinária, onde seus frutos são utilizados no preparo de doces e geleias ou consumidos *in natura*, quanto na medicina popular, sendo empregada no tratamento de infecções e diarreia. Além de seu valor gastronômico e medicinal, estudos farmacológicos indicam que o gênero *Annona* possui diversas atividades biológicas, incluindo a ação antioxidante e antimicrobiana [1,2]. Pesquisas recentes têm explorado outras propriedades do gênero, como sua ação anticancerígena, atribuída principalmente à presença de alcaloides aporfínicos, demonstrando seu potencial para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. Entretanto, ainda são escassos os estudos envolvendo o potencial citotóxico frente às células tumorais de *A. crassiflora* [3].

Experimental

Preparo do extrato etanólico e das frações:

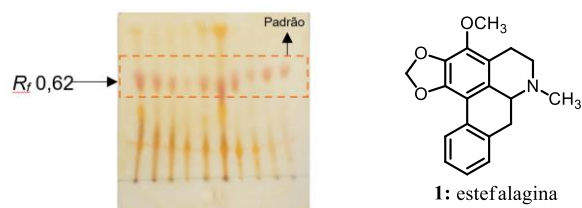
As cascas do fruto foram secas em estufa, trituradas e o material vegetal pulverizado foi submetido a extração com etanol por maceração. Após a destilação do solvente, o extrato etanólico (EE) (100,0 g) foi solubilizado em 500,0 mL de MeOH-H₂O (9:1) e submetido a extração líquido-líquido com HEX (5 × 200 mL, 4,7 g), CH_2Cl_2 (5 × 200 mL, 8,3 g) e AcOEt (5 × 200 mL, 4,7 g). As frações foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como revelador o reagente de Dragendorff, específico para alcaloides, sendo possível observar a presença dessa classe de compostos na fração CH_2Cl_2 , devido ao surgimento de manchas alaranjadas na cromatoplaça.

Purificação por cromatografia em coluna da fração CH_2Cl_2

A fração CH_2Cl_2 (1,69 g) foi submetida a cromatografia em coluna, (95,3 g, 27,5 × 3,0 cm d.i.) utilizando como fase estacionária (FE) sílica gel (63–200 μm) e como fase móvel (FM) um gradiente de solventes que iniciou com hexano- CH_2Cl_2 (10:0→0:10), passando por CH_2Cl_2 -AcOEt (10:0→0:10) e AcOEt-MeOH (10:0→0:10) e

finalizando com 100% de MeOH, de onde foram coletadas 258 frações, que foram reagrupadas em 54 subfrações de acordo com a similaridade dos valores de R_f observados nas análises de CCD. As subfrações NVC01F₂₀₀₋₂₅₁ (755,7 mg), apresentaram R_f 0,62, que é o mesmo valor do padrão (1), entretanto, continham impurezas sendo necessária uma nova etapa de purificação por cromatografia em coluna (Figura 1).

Figura 1. CCD das subfrações NVC01F₂₀₀₋₂₅₁ e do padrão de estefalagina (1)



FM: DCM-MeOH (9,5:0,5) e revelador Dragendorff.

A fração NVC01F₂₀₀₋₂₅₁ foi submetida a CC (NVC02) (27,7 g, 36 × 2,2 cm d.i.) utilizando como FE sílica para cromatografia *flash* (40–63 µm) e como FM um gradiente de solventes iniciou com CH₂Cl₂-AcOEt (10:0→0:10) e AcOEt-MeOH (10:0→0:10) e finalizando com 100% de MeOH, de onde foram coletadas 300 frações, que foram agrupadas em 17 subfrações de acordo com a similaridade dos valores de R_f observados nas análises de CCD. A subfração NVC02F₁₄₃₋₁₆₂ (11,3 mg) apresentou uma única mancha de coloração alaranjada (R_f 0,62) quando a cromatoplaça foi aspergida com o reagente de Dragendorff, indicando a presença do alcaloide estefalagina (1).

Ensaio citotóxico frente a linhagens celulares do carcinoma colorretal

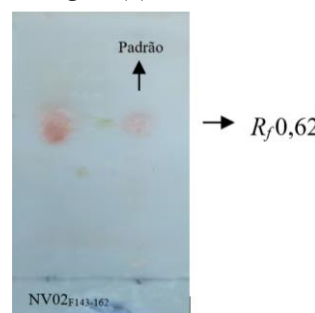
As células HCT-116 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma concentração de 1×10^4 células por poço em meio de crescimento. Após 24 h de incubação as células foram lavadas com uma solução de PBS e adicionado as amostras em várias concentrações (0,0032 a 50 µg mL⁻¹). Os respectivos controles foram incluídos em cada placa, compreendendo um branco (apenas meio), um controle de solvente (DMSO a 0,05%) e um controle positivo (doxorrubicina). Após 72 h de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 µg mL⁻¹). Após 3 h, o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm [4]. As amostras são consideradas ativas quando a porcentagem de inibição é superior a 75% (doxorrubicina inibiu HCT116 em 100%).

Resultados e Discussão

O EE obtido das cascas do araticum e as frações HEX, CH₂Cl₂ e AcOEt foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade frente às células do carcinoma colorretal, HCT116. O extrato inibiu o crescimento celular em 37, 8 e 87,9% nas concentrações de 5 e 50 µg mL⁻¹, respectivamente. As frações HEX e AcOEt não inibiram o crescimento celular em 5 µg mL⁻¹, mas apresentaram inibição de

96,5 e 35,9 em 50 µg mL⁻¹, respectivamente. A fração em CH₂Cl₂ inibiu o crescimento das células tumorais em 70,25% em 5 µg mL⁻¹ e 81,52% em 50 µg mL⁻¹. Na análise em CCD das frações, foi observado a presença de alcaloides na fração CH₂Cl₂, que podem ser responsáveis pela atividade citotóxica. Através da cromatografia em coluna da fração em CH₂Cl₂, foi possível isolar um alcaloide aporfínico (1) (11,3 mg) da subfração NVC02F₁₄₃₋₁₆₂, que apresentou uma única mancha alaranjada com R_f 0,62, o mesmo que padrão de estefalagina (Figura 2). O composto será caracterizado por RMN, UV e espectrometria de massas para confirmação de sua estrutura. Posteriormente, será submetido a ensaios frente a células tumorais do carcinoma colorretal para avaliar seu potencial citotóxico. Às amostras ativas será feita uma curva de diluição com as amostras (0,0032–50 µg mL⁻¹), para determinação do IC₅₀.

Figura 2. CCD do composto isolado de NVC02F₁₄₃₋₁₆₂ comparado com o padrão de estefalagina (1).



FM: DCM-MeOH (9,5:0,5) e revelador Dragendorff.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo demonstram o potencial citotóxico do EE e das frações obtidos das cascas de *A. crassiflora*, frente ao ensaio utilizando às células do carcinoma colorretal HCT116. A fração em CH₂Cl₂, apresentou inibição significativa do crescimento celular e revelou a presença de alcaloides, possivelmente responsáveis por essa atividade. A cromatografia permitiu o isolamento de um alcaloide aporfínico estefalagina (1). Os próximos passos incluem a caracterização detalhada do composto e a realização de novos ensaios para validar seu potencial farmacológico. Esses achados reforçam a importância da pesquisa sobre espécies nativas do Cerrado e abrem perspectivas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos a partir de metabólitos bioativos.

Agradecimentos

À FAPEMIG, CNPq, CAPES e INCT-BioNat pelo auxílio à pesquisa e bolsas concedidas.

Referências

- Barbosa *et al.*, *Bioorg. Chem.* **2022**, 120, 1-10.
- Arruda *et al.*, *Plants.* **2023**, 12, 1-39.
- A. Dev; S. Joseph, *J. of the Indian Chem. Soc.* **2021**, 98, 1-12.
- T. Mosmann, *J. Immunol. Methods.* **1983**, 65, 55-63.