

PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO FIXO DAS SEMENTES DE *Annona squamosa* L. (ANNONACEAE)

Ana Cecília Calixto Donelardy¹, Débora Odília Duarte Leite², Ana Maria Fernandes Duarte³, Geane Gabriele de Oliveira Souza⁴, Lariza Leisla Leandro Nascimento⁵, Natália Kelly Gomes de Carvalho⁶, Fázia Fernandes Galvão Rodrigues⁷, Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues⁸, José Galberto Martins da Costa⁹

Resumo:

O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos é uma prática milenar de senso comum utilizada mundialmente. A *Annona squamosa*, popularmente conhecida como “ata” ou “pinha” é uma planta medicinal utilizada no tratamento de diversas enfermidades. Esse trabalho teve como objetivo determinar a composição química e avaliar a atividade antibacteriana do óleo fixo das sementes de *A. squamosa* (OFSAs). O OFSAs foi obtido pelo sistema Soxhlet, destilado e tratado para análise de composição química por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). A atividade antibacteriana foi testada contra cepas padrão e cepas multirresistentes por meio do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM). O OFSAs ofereceu rendimento extrativo de 47,18 %. A análise por CG-EM identificou o ácido elaídico como composto majoritário, entre outros ácidos graxos. O ensaio antibacteriano demonstrou efeito inibitório, obtendo CIM variada entre 512 e ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$. O uso de OFSAs na terapia antibacteriana representa uma perspectiva futura para esse composto. No entanto, são necessários mais estudos sobre essa espécie e suas propriedades biológicas.

Palavras-chave: *Annona squamosa*, composição química e atividade antibacteriana.

1. Introdução

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema de saúde global em crescimento que ameaça a eficácia da medicina, uma vez que com a falta de antibióticos capazes de tratar patologias, o risco de doenças assim como o número de infectados aumentam cada vez mais (Neto *et al.*, 2023). Nesse contexto, o uso de plantas medicinais vem aprimorando técnicas terapêuticas devido à presença de metabólitos secundários, que conferem diferentes propriedades. Assim, a busca por plantas que possam ser utilizadas no combate a enfermidades correlacionadas a infecções bacterianas se torna relevante (Castro, 2022).

1 Universidade Regional do Cariri, Laboratório de Produtos Naturais - LPPN. email: cecilia.donelardy@urca.br

2 Universidade Regional do Cariri, Laboratório de Produtos Naturais - LPPN. email: debora.duarte@urca.br

3 Universidade Regional do Cariri, Laboratório de Produtos Naturais - LPPN. email: ana.fernandes@urca.br

4 Universidade Regional do Cariri, Laboratório de Produtos Naturais - LPPN. email: geane.souza@urca.br

5 Universidade Regional do Cariri, Laboratório de Produtos Naturais - LPPN. email: lariza.leandro@urca.br

6 Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Produtos Naturais - LPPN. email: natalia.kelly@aluno.uece.br

7 Universidade Regional do Cariri, Laboratório de Produtos Naturais - LPPN. email: galvaofazia@gmail.com

8 Universidade Regional do Cariri, Laboratório de Produtos Naturais - LPPN. email: fabiolafer@gmail.com

9 Universidade Regional do Cariri, Laboratório de Produtos Naturais - LPPN. email: galberto.martins@urca.br

A *Annona squamosa* (Annonaceae) é uma planta medicinal conhecida popularmente como “ata”, “pinha” ou “fruta do conde” encontrada principalmente em países tropicais, conhecida por seus frutos comestíveis e poder terapêutico (Awada *et al.*, 2023). A espécie *A.squamosa* possui atividades inseticida, antidiabética, antioxidante, antiepidêmica e antibacteriana relatadas em alguns estudos (Sawant *et al.*, 2023). Percebendo o vasto potencial terapêutico de *A. squamosa*, tornam-se necessários estudos sobre sua composição química e atividades biológicas dessa.

2. Objetivo Geral

Realizar o perfil químico e avaliar a ação antibacteriana do óleo fixo das sementes de *A. squamosa*.

2.1 Objetivos Específicos

- Coletar material vegetal para análise;
- Extrair óleo fixo das sementes de *A. squamosa* pelo sistema Soxhlet;
- Determinar a composição química do óleo fixo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM);
- Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo fixo contra cepas bacterianas Gram-negativas padrão e multirresistentes;

3. Metodologia

3.1 Coleta do material vegetal

Frutos de pinha foram obtidos comercialmente no mercado de Juazeiro do Norte, (Ceará, Brasil). As polpas foram manualmente separadas das sementes, que foram limpas com hipoclorito de sódio (5 %), lavadas com água destilada, secas em estufa à 60 °C e moídas para obter-se o pó.

3.2 Extração do óleo fixo

Com a utilização do aparelho de Soxhlet, 25 g do pó das sementes de *A. squamosa* foram pesadas e adicionadas ao sistema de extração juntamente a 350 mL de solvente orgânico hexano, o qual foi mantido sob refluxo por 4 h. após a extração, o óleo fixo foi destilado do solvente orgânico em um evaporador rotativo sob pressão reduzida e seu rendimento foi calculado seguindo a equação (1):

$$RE (\%, m/m) = \frac{(m_{\text{óleo seco}})g}{(m_{\text{pó das sementes}})g} \times 100 \quad (1)$$

3.3 Determinação da composição química do OFSAs

O óleo (1 g) foi tratado com transesterificação pela adição de 30 mL de metanol em meio alcalinizado com hidróxido de potássio (KOH). Posteriormente, a parte saponificada foi analisada em cromatografia em coluna com clorofórmio e hexano, as frações obtidas nessa etapa foram novamente avaliadas por cromatografia de camada delgada (CCD). A fração que apresentou menos interferentes foi escolhida para análise de composição química por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio de determinação de CIM foi realizado de acordo com o método de microdilução do CLSI (2015), no qual foram utilizadas cepas bacterianas Gram-negativas padrão: *Escherichia coli* ATCC 25226, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e multirresistentes: *Escherichia coli* 06, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase e *Pseudomonas aeruginosa* 027. Todas concedidas pelo Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN).

Para o ensaio, as cepas bacterianas foram ativadas em meio *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) à 3,8 % e mantidas na estufa por 24 h. Após o primeiro cultivo, o inóculo foi padronizado à 10 % adicionando-se 100 µL da suspensão de 3,8 %. Em seguida, foi preparada uma solução mãe de OFSAs com concentração de 1024 µL/mL, obtida pela diluição de 0,1 g do óleo com 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 9 mL de água destilada. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em uma placa de 96 poços por adição de 100 µL da solução mãe (1024 µL), atingindo concentrações de 512 a 8 µL/mL.

As placas foram incubadas em estufa em 35±2 °C por 24 h para posterior leitura, feita pela adição de 25 µL de solução de resazurina sódica (0,01 %) em cada poço da placa, onde a mudança de cor de azul para rosa indica o crescimento bacteriano. Todo o teste foi feito em triplicata onde a última fileira da placa de microdiluição obtinha apenas os inóculos bacterianos, sendo este o controle positivo. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento de microrganismos.

3.5 Análise estatística

Os dados das análises de CIM foram expressos como média (n=3) ± desvio padrão (DP) usando a Análise de Variância (ANOVA) sucedida pelo teste de Tukey de comparações múltiplas para dados com distribuição normal e desvios padrões significativamente semelhantes, utilizando o programa GraphPad Prism 6. Os valores estatísticos considerados serão aqueles com valores de *p* inferiores a 0,05 (*p*< 0.05)

4. Resultados

O OFSAs apresentou rendimento extrativo de 47,18 %. A análise do OFSAs por CG-EM detectou 21 ésteres metílicos, entre eles, sendo compostos majoritários o ácido elaídico (38,06 %), ácido araquídico (27,40 %) e ácido palmítico (7,86 %). O ácido elaídico, o composto presente em 38,06 % do OFSAs, foi identificado com propriedades terapêuticas, como ação antibiótica (Cabral *et al.*, 2013). Lai *et al.*, (2024) determinou que a suplementação de ácido elaídico pode suprimir o crescimento tumoral, tendo um efeito benéfico aos seres humanos. No entanto, esse ácido graxo pode ser associado a doenças coronárias e arteriosclerose, promovendo inflamação sistêmica (Debbabi *et al.*, 2017), sendo também associado a propriedade inflamatória (Xia *et al.*, 2020).

O ácido palmítico foi elucidado com atividades anticancerígena, antiinflamatória, analgésica e citotóxica (Padmini *et al.*, 2020). Esse ácido graxo

exibe ainda atividade antibacteriana contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *P. aeruginosa* e *S. aureus* analisadas por Ivanova *et al.*, (2017), assim como o ácido esteárico (Casillas-Vargas, 2021), outro composto identificado no óleo estudado, comumente utilizado na fabricação de detergentes, sabonetes e cosméticos (Pazinato, 2023).

Os resultados de CIM contra as cepas padrões Gram-negativas padrão e multirresistentes variaram entre concentrações de 512 e ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$, mostrando que o OFSAs tem efeito inibitório a depender da espécie bacteriana estudada. Estudos que relatam a correlação da presença de ácidos graxos com as propriedades biológicas, como os de Albuquerque *et al.*, (2024), analisam as atividades dos ácidos como linoleico, oleico e palmítico, dentre elas as atividades neuroprotetiva, nutricional e antibactericida.

O estudo de Pinto *et al.*, (2017) mostrou que o extrato metanólico das sementes de *A. squamosa* não obteve resultados significativos de CIM contra *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Já o óleo das sementes da mesma espécie estudado por Holanda (2023), que continha em sua composição química compostos como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e linoleico, demonstrou atividade contra *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* e *S. aureus*.

A diferença entre esses resultados pode ser relacionada ao tipo de extração e solventes utilizados em cada um, que contribui para diferentes composições químicas. No entanto, em altas dosagens, as sementes de *A. squamosa* podem apresentar citotoxicidade, segundo o trabalho de Tannura *et al.* (2022). Portanto, são necessários mais estudos voltados à avaliação de outras atividades biológicas, para melhor compreensão dessa espécie vegetal.

5. Conclusão

Os resultados desse estudo demonstram que óleo fixo das sementes de *A. squamosa* tem efeito inibitório contra algumas cepas Gram-negativas padrão e multirresistentes utilizadas nesse estudo. Esse efeito pode ser relacionado com a composição química do óleo, que contém ácidos graxos com atividades antibacterianas já relatadas. No entanto, os potenciais riscos associados às altas doses das sementes de *A. squamosa* observados por outros estudos destacam a necessidade de investigações adicionais para melhor compreensão do potencial terapêutico e eventuais limitações dessa espécie.

6. Referências

- ALBUQUERQUE, T. da N. et al. Composição química e atividade antibacteriana do óleo comercial das sementes de romã (*Punica granatum* L.) frente a bactérias de origem alimentar. *Caderno Pedagógico*, v. 21, n. 7, p. e5671, 2024. DOI: 10.54033/cadpedv21n7-121.
- AWADA, N. et al. Evaluation of the anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant properties of various extracts of *Annona squamosa* L. *Pharmaceutical Sciences*, v. 29, n. 3, p. 384-394, 2023. DOI: 10.34172/PS.2023.5.
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. Wayne, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- CABRAL, M. E. S. et al. Evaluations of the antimicrobial activities and chemical compositions of body fat from the amphibians *Leptodactylus macrosternum* Miranda-Ribeiro (1926) and *Leptodactylus vastus* Adolf Lutz (1930) in

Northeastern Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, p. 913671, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/913671>.

CASTRO, José Walber Gonçalves. Perfil químico e atividades biológicas das folhas de *Asparagus setaceus* (Kunth). 2022. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais) – Universidade Regional do Cariri, Crato, CE.

DEBBABI, M. et al. Comparação dos efeitos dos principais ácidos graxos presentes na dieta mediterrânea (ácido oleico, ácido docosahexaenóico) e em óleos hidrogenados (ácido eláidico) na oxiaoptofagia induzida por 7-cetocolesterol em células microgliciais BV-2. *Química e Física dos Lipídios*, v. 207, p. 151-170, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.002>.

IVANOVA, E. et al. Bactericidal activity of self-assembled palmitic and stearic fatty acid crystals on highly ordered pyrolytic graphite. *Acta Biomater.*, v. 59, p. 148–57, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.004>.

LAI, Y. et al. O ácido eláidico dietético aumenta a apresentação do antígeno tumoral e a imunidade ao câncer via ACSL5. *Cell Metabolism*, v. 36, n. 4, p. 822-838.e8, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.01.012>.

NETO, P. P. A. et al. Resistência bacteriana consecutiva do uso indiscriminado de antibióticos: revisão integrativa. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, Umuarama, v. 27, n. 5, p. 3320-3330, 2023. ISSN 1982-114X.

PADMINI, N. et al. Eficácia in vitro e in vivo de oleato de metila e ácido palmítico contra *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. *Patogênese Microbiana*, v. 148, p. 104446, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104446>.

PAZINATO, Julia Cristina Oliveira. Nanoestruturas de WO₃ obtidas a partir dos precursores ácido túngstico e ácido peroxotúngstico em presença dos agentes estruturantes ácido esteárico e tergitóis para aplicação em fotocatalise. 2023. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PINTO, N. C. C. et al. Cytotoxicity and bacterial membrane destabilization induced by *Annona squamosa* L. extracts. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 3, p. 2053-2073, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720150702>

TANNURA, L. T. T. et al. Estudo comparativo dos perfis fitoquímicos e citotóxicos do extrato alcóolico de folhas de graviola (*A. muricata*) e fruta do conde (*A. squamosa*). *Cuid Enferm.*, v. 16, n. 2, p. 169-175, 2022.

SAWANT, S. S. et al. Efeito in vitro em *Plasmodium falciparum* e efeito in vivo em *Plasmodium berghei* de *Annona squamosa*, uma fração oleosa obtida das sementes de *Annona squamosa*. *Molecules*, v. 28, p. 5472, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28145472>.

XIA, J. et al. Efeito protetor da se-metilselenocisteína na inflamação induzida pelo ácido eláidico em células endoteliais arteriais humanas. *Revista de Ciência Nutricional*, v. 66, n. 6, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3177/jnsv.66.577>