



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Extração, isolamento e identificação de alcaloide da casca do fruto de
Annona crassiflora Mart. e avaliação do seu potencial de inibição da lipase
pancreática.**

Aluno: Mariana Nunes Pereira

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Prof. Dr. Leonardo Gomes Peixoto

**UBERLÂNDIA - MG
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Extração, isolamento e identificação de alcaloide da casca do fruto de
Annona crassiflora Mart. e avaliação do seu potencial de inibição da
lipase pancreática.**

Aluno: Mariana Nunes Pereira

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Prof. Dr. Leonardo Gomes Peixoto

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- P436e
2016
- Pereira, Mariana Nunes, 1988
Extração, isolamento e identificação de alcaloide da casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart. e avaliação do seu potencial de inibição da lipase pancreática / Mariana Nunes Pereira. - 2016.
66 f. : il.
- Orientador: Foued Salmen Espindola.
Coorientador: Leonardo Gomes Peixoto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Bioquímica - Teses. 2. Alcalóides - Teses. 3. Lipase - Teses. 4. Análise cromatográfica - Teses. I. Espindola, Foued Salmen. II. Peixoto, Leonardo Gomes, 1981-. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Extração, isolamento e identificação de alcaloide da casca do fruto de
Annona crassiflora Mart. e avaliação do seu potencial de inibição da
lipase pancreática.**

ALUNO: Mariana Nunes Pereira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Foued Espindola Salmen

Examinadores:

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

(NOME DO ORIENTADOR)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais Manfredo José e Ilda Nunes que sempre estiveram ao meu lado comemorando cada conquista, me incentivando nas horas difíceis e principalmente me ensinando que o verdadeiro valor da vida é o conhecimento que adquirimos. E ao meu esposo Graciano Cícero pelo companheirismo, compreensão e amor incondicional durante toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela oportunidade a mim concedida e por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

Aos meus pais Manfredo e Ilda, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam a melhor de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser a melhor, mas a fazer o melhor de mim. A minha irmã Daniela Tatiana Nunes Pereira (in memoriam) você foi uma estrela cadente, com a passagem demasiadamente rápida pela Terra, porém brilhante, muitas saudades te amo. A minha família querida o meu muito obrigado pelo amor, apoio e confiança incondicional.

Ao meu esposo Graciano Cícero Ribeiro, por ter permanecido ao meu lado, me incentivando a percorrer este caminho, por compartilhar angústias e dúvidas estendendo sua mão amiga em momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela oportunidade oferecida, orientação deste trabalho de Dissertação, manifesto a minha gratidão pela sua simpatia desde o nosso primeiro encontro, pelas críticas e conselhos, mas, sobretudo pelo estímulo e ajuda na concretização deste projeto.

Ao meu co-orientador Dr. Leonardo Gomes Peixoto pelas contribuições, paciência, amizade e pela excelente orientação muito obrigada pela ajuda, ensinamentos e contribuições.

Agradeço de forma especial ao Allisson Benatti Justino, amigo fiel que sempre esteve ao meu lado em momentos cruciais da execução e elaboração da minha dissertação. Parabéns pelo potencial acredito em você e sei que podes ir ao cume mais alto, sempre.

A Dra. Renata Roland Teixeira, Ms. Danielle Diniz Vilela e a Adriele Vieira de Souza pela amizade adquirida, pelos conselhos e, sobretudo pelo apoio. Foi maravilhoso conviver com vocês, vivemos muitas alegrias.

Ao Douglas Caixeta, Larissa Caetano, Lara Naves Barbosa e Heitor Cappator, pelo carinho e apoio.

Ao Dr. Marcos Pivatto e Ms. Mário pela colaboração inestimável na construção deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFU, pela oportunidade de realização deste trabalho. A cooperação valiosa do ao Instituto de Genética e Bioquímica e Instituto de Química da UFU e órgãos de fomento, com o fornecimento de material para a realização deste trabalho e ao curso de pós-graduação em Genética e Bioquímica da UFU.

À todos vocês, o meu muito obrigado.

Sumário

Apresentação	ix
Capítulo 1- Referencial Teórico.....	1
1.1. Bioma do Cerrado	1
1.2. Família Annonaceae	3
1.3. Gênero Annona	4
1.4. Espécie <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	5
1.5. Alcaloides	8
1.6. Proposta biossintética para os alcaloides aporfínicos	10
1.7. Atividade inibitória da lipase pancreática	11
1.8. Referências.....	14
Capítulo 2	21
Resumo	23
Abstract	24
1.2 Introduction.....	25
2. Experimental.....	26
2.1. General experimental procedures.....	26
2.2. Plant material	27
2.3. Extraction and isolation	27
2.4. Cytotoxic activity (CC ₅₀)	28
2.5. Inhibition of lipase	29
3. Results and discussion	29
4. References	34
5. Supplementary material	40

Lista de Gravuras e Tabelas

Capítulo 1

Figura 1: Biomas do Brasil

Figura 2: Espécie *Annona crassiflora* Mart.

Figura 3: Exemplos de alguns compostos fenólicos

Figura 4: Mecanismos de síntese dos alcaloides: a) derivados de arginina, b) derivado de tirosina e c) derivado de triptofano.

Figura 5: Exemplos de alguns alcaloides.

Figura 6: Perfil estrutural característicos dos alcaloides aporfínicos.

Capítulo 2

Figura 1: Stephalagine alkaloids isolated from *A. crassiflora*

Figura 2: Key COSY (bold) and HMBC (arrow) correlations for stephalagine.

Figura 3: Fragmentation pathway proposed for stephalagine (m/z 310) based on the (+)-ESI-MS/MS spectrum (supplementary material).

Figura 4: Fragmentation pathway proposed for stephalagine (m/z 309) based on the EI-MS spectrum (supplementary material).

Tabela 1: NMR Spectroscopic data of stephalagine in $CDCl_3$ (δ in ppm)^a

Apresentação

Annona crassiflora Mart. é uma espécie pertencente à família Annonaceae nativa do cerrado e apresenta ampla distribuição nesse bioma, sendo encontrada na Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Tocantins (LORENZI, 1998). É conhecida popularmente como araticum, marolo, pinha-do-cerrado, cabeça de negro, entre outros. Os frutos dessa espécie são muito apreciados por populações locais, sendo encontrados em muitos pomares domésticos e consumidos in natura e/ou utilizados na fabricação de compotas, doces, geleias, sorvetes e licores, ressaltando assim, sua importância sócio-econômica (LORENZI, 1998; 2006).

Espécies da família Annonaceas têm sido intensivamente investigadas, resultando no isolamento de 849 alcaloides de 201 espécies em 59 gêneros. Devido a ampla diversidade estrutural desta classe de produtos naturais, estes apresentam diferentes atividades biológicas, tais como o efeito citotóxico, antitumoral, antiinflamatório e pesticida, o que tem estimulado estudos fitoquímicos de alguns gêneros desta família, especialmente no gênero *Annona* (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001).

O primeiro capítulo dessa dissertação é uma revisão sobre a espécie *A. crassiflora*. Na medicina tradicional foi relatado o uso desta planta no combate a parasitas, no tratamento de diarreia, reumatismo, feridas, doenças venéreas, picadas de serpente e piolhos. Já em pesquisas realizadas foram descritas atividades biológicas, tais como atividade moluscicida, antiparasitária, antibacteriana, antioxidante, inseticida e antimutagênica (LIAW et al., 2016).

O uso de cascas de diferentes frutos representa um campo científico que ainda carece de pesquisas, entretanto estudos têm revelado que as cascas são ricas em compostos bioativos, superando muitas vezes o teor dos frutos, e embora sejam considerados subprodutos, são fontes de propriedades promotoras da saúde e aplicações tecnológicas. Desse modo, este trabalho tem como objetivo estudar as cascas do fruto de *Annona crassiflora*, a fim de avaliar a aplicação biológica deste subproduto, como inibidor da lipase pancreática (SHUI; LEONG, 2006; JORGE; MALACRIDA, 2009).

O segundo capítulo é escrito em formato de artigo científico e tem por objetivo a extração, isolamento, identificação e avaliação do potencial de inibição da lipase pancreática do alcaloide estefalagina da casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart.. Neste artigo foi descrito o isolamento e caracterização do composto estefalagina, através de espectrometria de massas com ionização por electrospray ESI (Agilent QTOF modelo 6520), espectrometria de massas por impacto de elétrons CG-MS (Shimatsu CG modelo 2010 e MS modelo QP 2010), espectroscopia na região do Infravermelho (Shimatsu IR Prestige-21) e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono RMN (Bruker Avance III 600HD) sendo que as técnicas realizadas foram ^{13}C , ^1H , HSQC, COSY, HMBC e HMBC de N. Além disso, foi investigado o potencial de inibição da lipase pancreática do extrato etanólico, da fração diclorometano e do composto isolado da casca do fruto de *A. crassiflora*.

Os resultados apresentados neste estudo revelaram que o extrato etanólico da casca de araticum foi capaz de inibir a lipase pancreática (LP), no entanto, esta capacidade inibitória de LP não foi observada para a fração diclorometano. Além disso, o alcaloide estefalagina, isolado a partir da fração diclorometânica da casca do fruto de *A. crassiflora*, apresentou atividade inibidora contra o LP e o menor valor de IC_{50} , quando comparado ao extratos etanólico e fração diclorometano.

Capítulo 1- Referencial Teórico

1.1. Bioma do Cerrado

A área territorial brasileira é dividida em vários biomas como Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia e Caatinga, e cada um é classificado de acordo com sua diversidade de solo e clima, os quais contribuem com a riqueza e variedade da vegetação e com as espécies de fauna e flora distribuída nos diversos ecossistemas brasileiros (DIAS, 1992).

O Cerrado, que ocupa mais de 2,0 milhões de quilômetros quadrados, é o segundo maior bioma brasileiro (BRANNSTROM et al., 2008) e está incluído entre os 35 *hotspots* de maior biodiversidade do mundo, devido à sua riqueza biológica e ao grau de pressão antrópica na região (WANTZEN et al., 2012).

O número de plantas vasculares é superior àquele encontrado na maioria das regiões do mundo: plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós somam mais de 7.000 espécies (KLINK; MACHADO, 2005). Quarenta e quatro por cento da flora é endêmica e, nesse sentido, o Cerrado é a mais diversificada savana tropical do mundo. Existe uma grande diversidade de habitats e alternância de espécies. Por exemplo, um inventário florístico revelou que das 914 espécies de árvores e arbustos registradas em 315 localidades de Cerrado, somente 300 espécies ocorrem em mais do que oito localidades, e 614 espécies foram encontradas em apenas uma localidade (RATTER et al., 1996).

O Cerrado se destaca, quando comparado com outros biomas tais como a Floresta Amazônica, por apresentar uma diversidade de táxons (gênero, família e ordem), evidenciando assim a importância de pesquisas com espécies vegetais nativas, uma vez que, quanto maior a heterogeneidade taxonômica, maior é o distanciamento filogenético e a diversidade química entre as plantas. Desse modo, o cerrado apresenta um potencial para o descobrimento de novos recursos terapêuticos (GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

No Brasil, tem se tornado significativo a quantidade de pesquisadores que atuam em busca de novos recursos terapêuticos, e pode ser comprovado pela considerável quantidade de artigos publicados por autores brasileiros em

revistas nacionais e internacionais do ramo. Isso denota uma consciência sobre o potencial da biodiversidade brasileira, portanto um nicho para a busca de novas substâncias. Embora os pesquisadores tenham acesso à matéria-prima mais abundante e diversificada do planeta, devem-se priorizar os estudos nas áreas com elevada degradação ambiental, cujas espécies que apresentam maior risco de extinção concentram-se no Bioma do Cerrado e Mata Atlântica (Figura 1) (PINTO et al., 2002).

Figura1: Biomas do Brasil



Fonte: IBGE, 2004.

O cerrado é um bioma que apresenta inúmeras espécies medicinais, em decorrência de suas características morfológicas, com xilopódios e cascas que concentram reservas e, com frequência, possuem substâncias farmacologicamente ativas. A partir do conhecimento empírico tradicional sobre estes vegetais, diversas descobertas benéficas para a medicina foram realizada (DA SILVA; MIRANDA; DA CONCEIÇÃO, 2010).

Plantas endêmicas localizadas no Cerrado têm recebido cada vez mais atenção como uma fonte de compostos bioativos (BEUCHLE et al., 2015). Em destaque os frutos do cerrado, que além de serem fonte de compostos bioativos com alto valor nutricional e propriedades funcionais benéficas para a saúde, apresentam o potencial nutracêutico e farmacológico, que devem ser

investigados visando promover o desenvolvimento sustentável das regiões do Cerrado e contribuir para a conservação e valorização da biodiversidade deste bioma (DE ALMEIDA SIQUEIRA et al., 2013).

1.2. Família Annonaceae

A família Annonaceae é uma das maiores entre as Angiospermas basais, com cerca de 135 gêneros e 2.500 espécies (SMITH et al., 2004). No Brasil, é representada por 26 gêneros, sendo sete endêmicos, com cerca de 260 espécies (MAAS et al., 2001). As espécies desta família caracterizam-se por apresentarem folhas simples, dispostas alternadamente em um mesmo plano, ao longo dos ramos. No Cerrado, são encontrados 10 gêneros, nenhum dos quais endêmico deste domínio, e 47 espécies de Annonaceae (MAAS et al., 2013), algumas de ampla distribuição e bastante comuns, como *Annona crassiflora* Mart., *Duguetia furfuracea* (A.St.-Hil.) Saff. e *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.. Na figura 2 Espécie *Annona crassiflora* Mart. pertencente a família Annonaceae. Árvore com altura de cerca de 5 metros e ramos portando frutos.

Figura 2: Espécie *Annona crassiflora* Mart.



Fonte: Plantas do Cerrado por Fernando Tatagiha

Link: (<http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/araticum.html>)

Algumas características botânicas relevantes para a identificação de espécies de Annonaceae são o odor forte exalado do tronco ou ramos quando submetidos ao corte, presença de fibras longas e resistentes na casca do caule e aparência de marcas de chamas no corte transversal do tronco. As folhas são dísticas (exceto em *Tetrameranthus*, com folhas espiraladas) alternas, simples, sem estípulas e margem inteira. Flores isoladas ou reunidas em inflorescências, hemicíclicas, hermafroditas, diclamídeas, com periantodiferenciado no cálice e corola, em geral são trímeras e carnosas; estames numerosos, dispostos de forma espiralada; ovário súpero com numerosos carpelos apocárpicos com um a muitos óvulos (JOLY, 1966).

Espécies pertencentes à família Annonaceae têm sido intensivamente estudadas, pelo isolamento de 849 alcaloides de 201 espécies em 59 gêneros (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001), estruturalmente derivados da isoquinolina, seguindo a origem das isoquinolinas simples; bisbenzilisquinolinas; protoberberinas; aporfinas; oxoaporfinas (LEBOEUF et al., 1982) e, posteriormente detecção também das acetogeninas (BERMEJO et al., 2005).

A diversidade estrutural apresentada pelos produtos naturais desperta o interesse para a avaliação das atividades biológicas, principalmente para os alcaloides que frequentemente apresentam ação sobre o sistema nervoso central, assim como, o efeito citotóxico, antitumoral e pesticida (CAVE et al., 1997), que tem estimulado estudos fotoquímicos de alguns gêneros desta família, especialmente no gênero *Annona*.

1.3. Gênero *Annona*

Annona é um gênero que pertence à família Annonaceae e contempla cerca de 160 espécies de árvores e arbustos (CHATROU et al., 2012). No Brasil, existem cerca de 60 espécies, com maior prevalência em florestas e com poucos representantes em áreas abertas (COSTA et al., 2011).

Proveniente da palavra em Latim “colheita anual”, o gênero *Annona* é a fonte mais relevante de frutos comestíveis da família Annonaceae apresentando assim, grande destaque econômico (PINO, 2010). Este gênero possui constituintes químicos com considerável valor nutricional como

açúcares, proteínas, lipídeos, taninos, ácido ascórbico, pectinas, aminoácidos, polifenóis, e vitaminas do tipo beta caroteno e complexo B (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI; MATOS; FRANCISCO, 2002).

Economicamente, espécies do gênero *Annona* têm grande importância como fonte de frutos comestíveis, sendo amplamente cultivadas e comercializadas, inclusive no Brasil, como a *A. squamosa* (fruta-do-conde, pinha ou ata), *A. muricata* (graviola), *A. recutita* (condessa), *A. cherimolha* (cherimóia), todas não nativas. Essas espécies de interesse comercial são consideradas importantes, principalmente, devido às propriedades de seus frutos. Seus frutos são usados *in natura* na forma de sucos ou sorvetes (LORENZI; MATOS; FRANCISCO, 2002).

No gênero *Annona* foi descrita a presença de vários metabolitos secundários, tais como alcaloides (RINALDI, 2007), acetogeninas (YANG et al., 2009), flavonoides (DE PAULA MADEIRA et al., 2003), óleos essenciais, compostos aromáticos (FOURNIER; LEBOEUF; CAVÉ, 1999), e taninos (DE PAULA MADEIRA et al., 2003). Este trabalho teve como foco, o isolamento de alcaloides presentes na espécie de *A. crassiflora*.

1.4. Espécie *Annona crassiflora* Mart.

A *Annona crassiflora* Mart. é espécie que apresenta ampla distribuição no bioma do cerrado, sendo encontrada na Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Tocantins. A *A. crassiflora* é uma espécie arbórea de 4 a 8 m de altura e o diâmetro da copa chega a 4 m. O tronco é geralmente tortuoso, variando entre 20 a 30 cm de diâmetro e revestido por casca áspera e corticosa resistente a ação do fogo. As folhas são alternadas simples (LORENZI, 1998).

O seu fruto é conhecido popularmente como araticum, marolo, pinha-do-cerrado, cabeça de negro, entre outros. Este fruto se desenvolve naturalmente em solos ácidos, típicos do Cerrado, com pH em torno de 4,8, baixa concentração de fósforo, potássio, cálcio e magnésio e alta concentração de alumínio (NAVES et al., 2007). O fruto possui superfície tomentosa e tuberculada de cor verde no fruto em desenvolvimento, e marrom, quando

maduro. A polpa é amarela ou avermelhada, adocicada e tem cheiro agradável. As sementes são elípticas e achatadas, de cor marrom. Floresce durante os meses de outubro e novembro, sendo que a frutificação tem início em novembro e a maturação ocorre entre janeiro e abril (LORENZI, 1998; 2006)

Os frutos dessa espécie são muito apreciados por populações locais, sendo encontrados em muitos pomares domésticos e consumidos in natura e/ou utilizados na fabricação de compotas, doces, geleias, sorvetes e licores ressaltando assim, sua importância sócio-econômica. Além disso, um trabalho conduzido por Franco, et. al. descreveu que em 100 g da polpa do fruto encontra-se 453 µg de tiamina, 100 µg de riboflavina, 2,7 mg de niacina, 52 mg de cálcio, 24 mg de fósforo, 2,3 mg de ferro, 10,3 g de glicídios, 0,4 g de proteínas, 1,6 g de lipídeos, e 52 kcal (FRANCO, 2005) demonstrando que o fruto apresenta um apreciável valor nutricional. Assim como uma boa fonte de carotenoides, polifenóis, tocoferóis, flavonoides, vitaminas e minerais (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI; MATOS; FRANCISCO, 2002; ROESLER et al., 2007).

Na medicina tradicional brasileira foi relatado o uso da planta no combate a parasitas, tratamento de diarreia, reumatismo, tratamento de feridas, doenças venéreas, picadas de serpente e piolhos (VILAR et al., 2008). Já em pesquisas científicas foram comprovadas as seguintes atividades biológicas: atividades moluscicida, antiparasitária, antibacteriana, antioxidante, inseticida e antimutagênica (LIAW et al., 2016).

A atividade moluscicida, foi investigada a partir do extrato etanólico de diferentes órgãos de *A. crassiflora* e verificaram que aqueles de polpa do fruto, da semente, do lenho e da casca de raiz causaram a morte de 100% dos moluscos *Biomphalaria glabrata* (DOS SANTOS; SANT'ANA, 2001).

Já a atividade antiparasitária foi avaliada a partir do extrato etanólico de folhas da *A. crassiflora* que foi pouco ativo frente às promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* e às tripomastigotas *Trypanosoma cruzi* enquanto que os alcaloides totais foram ativos frente ao primeiro (CE₅₀ de 24,89 µg/ml) e causaram total inibição das formas de tripomastigotas, à concentração de 100 µg/ml (TEMPONE et al., 2005). Referente à atividade

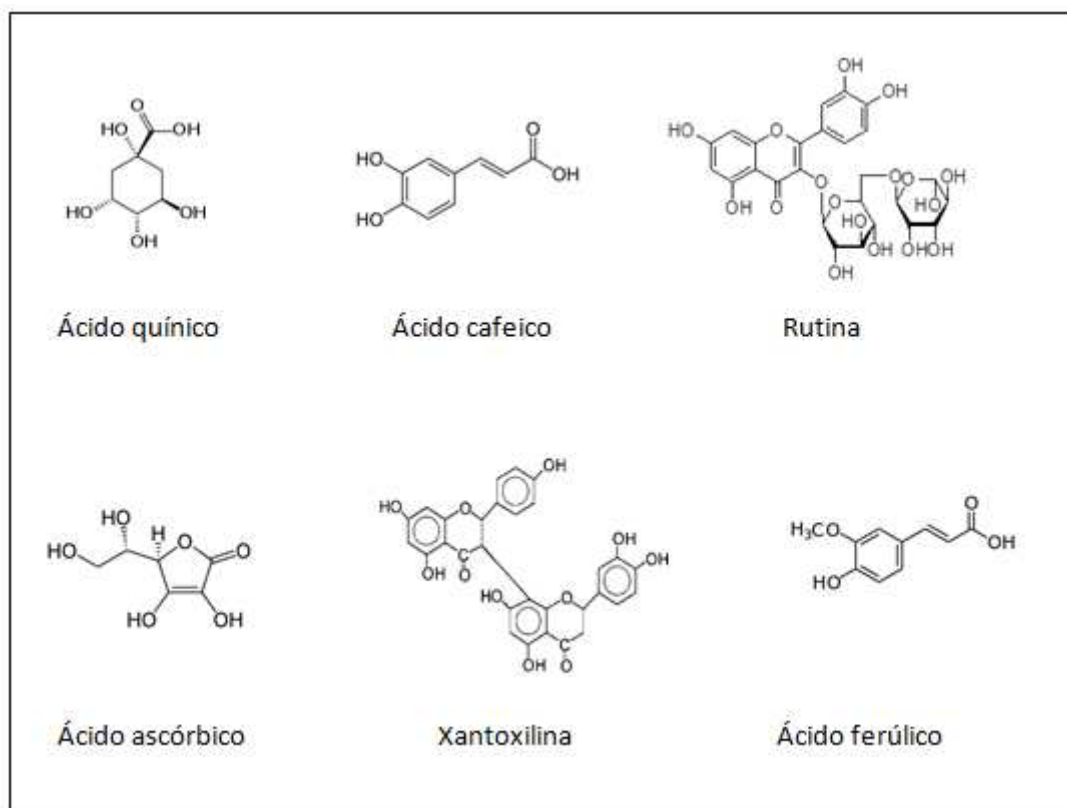
antibacteriana *in vitro* utilizando *Staphylococcus aureus* os extratos etanólicos de folha, fruto e sementes foram eficazes (DE LIMA et al., 2006).

A atividade inseticida foi avaliada frente às larvas de *Aedes aegypti*, através do extrato etanólico de várias partes de *A. crassiflora* que mostraram atividade, sendo que o extrato da casca da raiz apresentou maior atividade (CE_{50} : 0,71 $\mu\text{g/ml}$), seguido do lenho da raiz (CE_{50} : 8,94 $\mu\text{g/ml}$) e do caule (CE_{50} : 16,1 $\mu\text{g/ml}$) (DE OMENA et al., 2007).

A atividade antimutagênica foi avaliada em ratos Swiss Webster, utilizando o extrato etanólico das folhas de *A. crassiflora*, que demonstraram um potencial antimutagênico (VILAR et al., 2008).

Roesler et al (2007) constataram a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos da casca do araticum revelando a presença de alguns compostos com alta capacidade antioxidante, como rutina, xantoxilina, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido ascórbico e ácido quínico.

Figura 3: Exemplos de alguns compostos fenólicos.



Fonte: autora

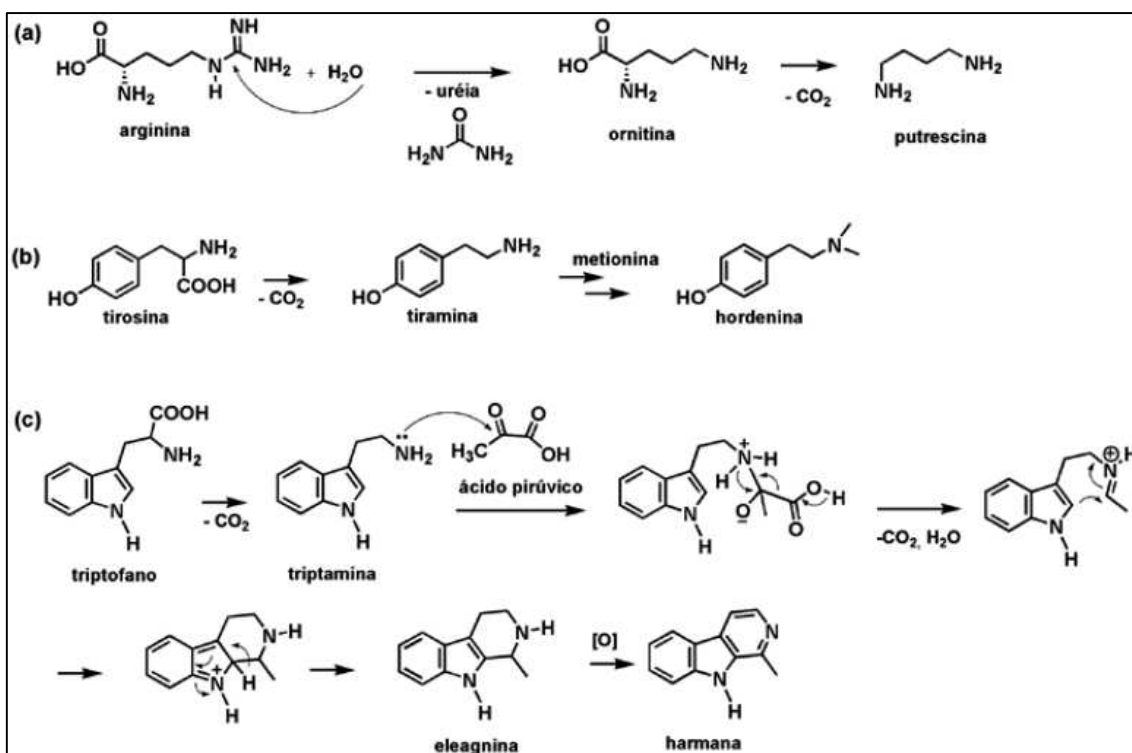
Embora o uso das cascas dos frutos ainda represente um campo científico que careça de pesquisas, Shui e Leong (2006) revelaram que as cascas são mais ricas em compostos bioativos superando muitas vezes o teor dos frutos, e embora sejam considerados subprodutos, são fontes de propriedades promotoras da saúde e aplicações tecnológicas, tais como antioxidantes e antimicrobianas representando, portanto, potenciais fontes naturais dessas substâncias (SHUI; LEONG, 2006; JORGE; MALACRIDA, 2009).

Muitas são as justificativas para o aumento de pesquisas com as cascas: podem ter diversos metabólitos secundários bioativos, aumentam o aproveitamento total do alimento, redução do impacto que esses subprodutos poderiam causar ao serem descartados e aumento das probabilidades de aplicações comerciais. Neste contexto, este trabalho investigou a presença de alcaloides nas cascas do fruto de *A. crassiflora*, uma vez que a classe destes compostos pode revelar novas atividades biológicas (BOUSTIE et al., 1998).

1.5. Alcaloides

Os alcaloides são compostos que apresentam baixo peso molecular normalmente, com anel heterocíclico e um ou mais átomos de nitrogênio conferindo-lhes, geralmente, caráter básico e sendo encontrados principalmente em vegetais. Sua classificação é de acordo com o aminoácido precursor, que podem ser a arginina, ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, ácido antranílico, triptofano, assim como reações de aminação. (DEWICK, 2002; LOBO; LOURENÇO, 2007). A figura 4 apresenta o mecanismo de síntese de alcaloides provenientes de três aminoácidos.

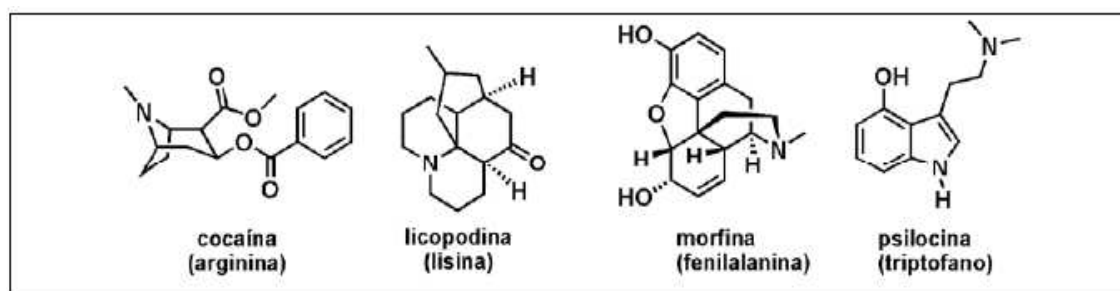
Figura 4: Mecanismos de síntese dos alcaloides: a) derivados de arginina, b) derivado de tirosina e c) derivado de triptofano.



Fonte: Lobo e Lourenço (2007).

Para que um composto seja reconhecido como alcaloide verdadeiro é necessário que este apresente um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico sendo então classificados de acordo com o sistema anelar presentes na molécula. Porém existem também os protoalcaloides que são compostos com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico e os pseudoalcaloides que são compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos (MENTZ; PETROVICK, 2003). A figura 5 apresenta exemplos de alguns alcaloides identificados pela presença do átomo de nitrogênio dentro de anel heterocíclico.

Figura 5: Exemplos de alguns Alcaloides



FONTE: Lobo e Lourenço 2007.

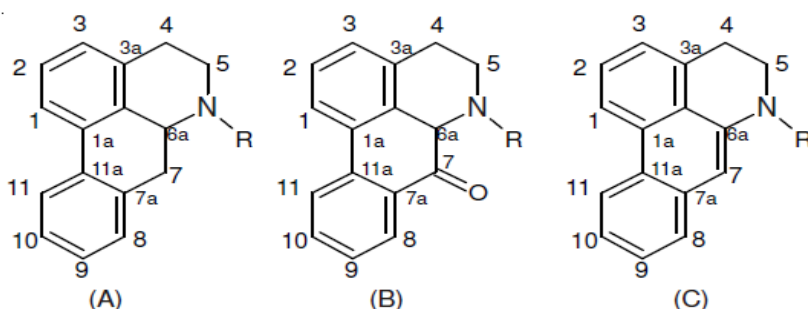
Desde a descoberta da morfina, mais de 12000 alcaloides já foram isolados. Este vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representa cerca de 20% das substâncias naturais descritas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Os alcaloides mais comumente encontrados na família Annonaceae são os dos tipos benziltetraidroisoquinolínico, benzildiidroisoquinolínico, aporfínico, pró-aporfínico, oxaporfínico, tetraidroisoquinolínico e protoberberínico. Sendo que o alcaloide isolado e identificado neste trabalho foi do tipo aporfínico. (NAZARO, 2013).

1.6. Proposta biossintética para os alcaloides aporfínicos

A classe dos alcaloides aporfínicos, ou aporfinóides, derivados do esqueleto isoquinolínico, é bastante destacada em diferentes espécies de Annonaceae, sendo também encontrada em outras famílias (SILVA et al., 2007). Esta classe está dividida em diferentes subclasses, cujos representantes apresentam perfil estrutural característico (Figura 6) e, sem dúvida, propriedades químicas e biológicas próprias dos subgrupos a que pertencem (BOUSTIE et al., 1998). Esses alcaloides caracterizam-se por apresentar esqueleto aporfínico (Figura 6), e um de seus subgrupos, o oxaporfínico (Figura 6B), possui esqueleto totalmente aromático e com presença de uma carbonila em C-7 (PELLETIER, 1999). Em função do padrão de substituição encontrado no anel, diferentes alcaloides oxaporfínicos já foram descritos (SILVA et al., 2007).

Figura 6: Três estruturas básicas de alcaloides aporfínico.



FONTE: Chen 2013.

A classe dos alcaloides aporfínicos tem uma ampla distribuição dentro do grupo dos alcaloides isoquinolínicos, provenientes somente de plantas das famílias Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae (ordem Ranales), Papaveraceae (ordem Rhodales) e Rhamnaceae (ordem Rhamnales) (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVE, 1975). As Annonaceae são uma família que apresentam os alcaloides aporfínicos principalmente em espécies do gênero *Annona* e muitas atividades farmacológicas são atribuídas a estes alcaloides (RINALDI, 2007). No presente estudo foi investigado se o alcaloide aporfínico isolado da casca da *A. crassiflora* apresentava ação sobre a inibição da lipase pancreática.

1.7. Atividade inibitória da lipase pancreática

Estima-se que atualmente há mais de dois bilhões de adultos acima do peso no mundo, e destes, mais de 700 milhões estejam clinicamente obesos (PÊGO-FERNANDES; BIBAS; DEBONI, 2011). O número crescente de obesos tem sido um grande problema de saúde pública, pois aumenta o risco de desenvolvimento de alterações lipídicas como dislipidemias, hipercolesterolemia, aterosclerose, e como consequência pode levar a doenças crônicas tais como hipertensão, diabetes tipo II e problemas cardiovasculares; além de câncer, acidente vascular encefálico (AVE) e problemas respiratórios (ALTERIO; FAVA; NAVARRO, 2007; GODOY-MATOS et al., 2009). Uma alternativa para prevenir ou tratar o excesso de peso e a obesidade, seria o controle do metabolismo lipídico através do uso de inibidores de lipase.

As lipases são enzimas que representam um grupo heterogêneo de proteínas que agem sobre as ligações de ésteres de triglicerídios, hidrolisando principalmente os de cadeia longa (cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono) e liberando ácidos graxos e glicerol (MESSIAS et al., 2011).

A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (BRADY et al., 1990), *Geotrichum candidum* (SCHRAG et al., 1991) e

da lipase pancreática humana propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial. O sítio ativo dessas enzimas é recoberto por uma “tampa” hidrofóbica, ou “lid”, que, ao interagir com a interface lipídeo/água, sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passam a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases (WINKLER; D'ARCY; HUNZIKER, 1990).

A lipase pancreática (LP) é a mais conhecida e considerada importante na absorção de lipídios no corpo humano, sendo a principal enzima lipolítica sintetizada e secretada pelo pâncreas devido a sua relevância na eficiência da digestão de triacilglicerol (BROD, 2010). Esta enzima consegue remover ácidos graxos de cadeia longa saturada e poli-insaturada como produto lipolítico, sendo capaz de hidrolisar de 50 a 70% da gordura total da dieta (RASERA, 2012). Portanto, a inibição da LP pode reduzir a absorção de lipídios gerando um impacto nutricional através da atenuação da sua atividade.

Existem alguns fármacos que são utilizados com o objetivo de inibir a atividade lipásica, como o Orlistat (tetrahidrolipostatina). Em relação ao mecanismo de ação deste fármaco, o mesmo age diretamente sobre as lipases digestivas na região do lúmen intestinal, sendo efetivo em 30% na hidrólise de triglicérides. Durante sua ação, esta droga liga-se de maneira irreversível no sítio ativo das lipases, que reage especificamente com a serina nucleofílica da tríade catalítica da lipase pancreática (MANCINI; HALPERN, 2002). Desse modo, pois este medicamento consegue limitar a absorção de gordura da dieta (SILVA; ZAFFARI, 2009).

Portanto, este fármaco pode trazer benefícios a saúde, como coadjuvante na prevenção e tratamento da obesidade, controle de dislipidemias através da redução das taxas de gordura no sangue, prevenção e tratamento de esteatose hepática através da redução de deposição de gordura no fígado, tanto pelo potencial de inibir a absorção de gordura no intestino ou o aumento da sua taxa metabólica e oxidação (COUTINHO, 2009).

Contudo, assim como a maioria dos fármacos, sintomas adversos provocados podem limitar o seu uso por alguns pacientes. Tais sintomas adversos incluem desde desconfortos e dores abdominais, esteatorreia (diarreia com gordura), incontinência fecal com manchas oleosas (15-30 % dos

casos), náuseas, vômitos e até interferência na absorção das vitaminas lipossolúveis, sendo primordial a realização de dosagem sanguínea para controle sérico e confirmação da necessidade de suplementação (MANCINI; HALPERN, 2002).

Assim, alternativas viáveis ao tratamento do excesso de peso e obesidade são necessárias. Os fitoterápicos representam uma alternativa e/ou um complemento as terapias farmacológicas, tentando assim reduzir os efeitos colaterais provocados por compostos sintéticos. Eles são apresentados na forma de extratos ou frações enriquecidas de plantas que auxiliam no tratamento da redução de peso corporal, mas sempre aliados a uma dieta de baixa caloria (PIZZIOLO et al., 2011).

Dentre os compostos bioativos presentes nas plantas, a classe dos alcaloides tem demonstrado ação sobre a inibição da lipase pancreática. A cafeína, teofilina e teobromina foram referidas como inibidoras da atividade da lipase pancreática humana de uma forma dependente da dose (WIKIERA; MIKA; ŻYŁA, 2012).

Portanto o presente estudo teve como objetivo isolar alcaloides da casca do fruto de *A. crassiflora* e investigar *in vitro* o seu potencial de inibição da lipase pancreática. Dessa forma, o estudo de alcaloides com potencial de inibição da lipase pode trazer benefícios e colaborar com o tratamento da obesidade.

1.8. Referências

ALMEIDA, S. D. et al. Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: Embrapa-CPAC**, v. 464, 1998.

ALTERIO, A. D. A.; FAVA, D. A.; NAVARRO, F. Interação da ingestão diária de chá verde (*Camellia sinensis*) no metabolismo celular e na célula adiposa promovendo emagrecimento. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 1, n. 3, p. 27-37, 2007.

BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural product reports**, v. 22, n. 2, p. 269-303, 2005.

BEUCHLE, R. et al. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. **Applied Geography**, v. 58, p. 116-127, 2015.

BOUSTIE, J. et al. Antipoliavirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. **Journal of natural products**, v. 61, n. 4, p. 480-484, 1998.

BRADY, L. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 767-770, 1990.

BRANNSTROM, C. et al. Land change in the Brazilian Savanna (Cerrado), 1986 e 2002: comparative analysis and implications for landuse policy. **Land Use Policy** v. 25, p. 579 e 595, 2008.

BROD, F. C. A. *Expressão, purificação e caracterização bioquímica de lipase recombinante de Staphylococcus xylosus e esterase recombinante de Lactobacillus plantarum*. 2010. 111 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CAVE, A. et al. Study of the structure-activity relationships of the acetogenin of annonaceae, muricatacin and analogues. **European journal of medicinal chemistry**, v. 32, n. 7, p. 617-623, 1997.

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, 2012.

CHEN J, GAO K, LIU T, ZHAO H, WANG J, WU H, LIU B, WANG W. Aporphine Alkaloids: A Kind of Alkaloids' Extract Source, Chemical Constitution and Pharmacological Actions in Different Botany: A Review. **Asian Journal of Chemistry** 25(18):10015, 2013.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 183-205, 2001.

COSTA, E. V. et al. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart.(Annonaceae). **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9714-9720, 2011.

COUTINHO, W. The first decade of sibutramine and orlistat: a reappraisal of their expanding roles in the treatment of obesity and associated conditions. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 2, p. 262-270, 2009.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.

DA SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; DA CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia plena**, v. 6, n. 2, 2010.

DE ALMEIDA SIQUEIRA, E. M. et al. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e72826, 2013.

- DE LIMA, M. R. F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 137-147, 2006
- DE OMENA, M. et al. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource technology**, v. 98, n. 13, p. 2549-2556, 2007.
- DE PAULA MADEIRA, M. F. et al. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia*: bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2002. 291p.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Unesp, 2002. 592p.
- DIAS, B. F. **Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis**. Brasília: FUNATURA Fundação Konrad Adenauer , 1992. p. 11-25.
- DOS SANTOS, A.; SANT'ANA, A. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 115-120, 2001.
- FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Annonaceae essential oils: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 2, p. 131-142, 1999.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 307p.
- GODOY-MATOS, A. et al. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010/ABESO. **São Paulo: AC Farmacêutica**, 2009.
- GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. D. Medicinal plants resources in the Cerrado of Mato Grosso State, Brazil: a review. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Aporphine alkaloids. **Lloydia**, v. 38, p. 275-338, 1979.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 2 ed. São Paulo: Nacional, 1966. 634 p.

JORGE, N.; MALACRIDA, C. R. Extratos de sementes de mamão (*Carica papaya* L.) como fonte de antioxidantes naturais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 3, p. 337-340, 2009.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

LEBOEUF, M. et al. Alkaloids of the Annonaceae. Part 33. Annomontine and methoxyannomontine, two new pyrimidine- β -carboline-type alkaloids from *Annona montana*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 1205-1208, 1982.

LIAW, C.-C. et al. Acetogenins from Annonaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v.101, p.113-230. 2016.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: IST Press., 2007, 272 p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. vol. 2, 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. 352p.

LORENZI H, MATOS FJ, FRANCISCO JM. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.; FRANCISCO, J. M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. vol. 1 Nova Odessa: Instituto Pantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.

MAAS, P. J. et al. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, p. 61-94, 2001.

MANCINI, M. C.; HALPERN, A. Tratamento farmacológico da obesidade. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 46, n. 5, p. 497-513, 2002.

MENTZ, L.; PETROVICK, P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. 1102p.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

NAVES, R. V. et al. Determinação de características físicas em frutos e teor de nutrientes, em folhas e no solo, de três espécies frutíferas de ocorrência natural nos cerrados de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 25, n. 2, p. 107-114, 2007.

NAZARO, J. M. *Identificação de metabólitos de Annona dioica com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

PÊGO-FERNANDES, P. M.; BIBAS, B. J.; DEBONI, M. Obesity: the greatest epidemic of the 21st century? **Sao Paulo Medical Journal**, v. 129, n. 5, p. 283-284, 2011.

PELLETIER, S. W. **Alkaloids: chemical and biological perspectives**. Springer, 1999.

PINO, J. Annona fruits (chapter 14). **Handbook of Fruit and Vegetable Flavors**, p. 231-247, 2010.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, p. 45-61, 2002.

PIZZIOLO, V. et al. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. **Rev Bras Plantas Med**, v. 13, n. 1, p. 98-109, 2011.

RASERA, K. **Utilização de sólido fermentado obtido a partir de fungos do gênero *Rhizopus* como catalisador para a modificação de óleos e gorduras** 2012. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/ Paraná.

RATTER, J. et al. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation II: comparison of the woody vegetation of 98 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 53, n. 02, p. 153-180, 1996.

RINALDI, M. V. N. *Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.* 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmaceuticos) – Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos da Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo 2007.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007.

SCHRAG, J. D. et al. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Nature**, v. 351, p. 761-764, 1991.

SHUI, G.; LEONG, L. P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 277-284, 2006.

SILVA, D. B. D. et al. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v.30, n.8, p. 1809-1812, 2007.

SILVA, P. C.; ZAFFARI, D. Prevalência de excesso de peso e associação com outras variáveis em indivíduos adultos atendidos em unidade básica de saúde. **Scientia Médica**, v. 19, n. 1, p. 17-26, 2009.

SMITH, N. et al. **Flowering plants of the neotropics**. New York: Princeton University Press, 2004. 600p.

TEMPONE, A. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005.

VILAR, J. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141-147, 2008.

WANTZEN, K. M. et al. Soil carbon stocks in streamvalley-ecosystems in the Brazilian Cerrado agroscape. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 151, p. 70-79, 2012.

WIKIERA, A.; MIKA, M.; ŻYŁA, K. Methylxanthine drugs are human pancreatic lipase inhibitors. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 62, n. 2, p. 109-113, 2012.

WINKLER, F.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p.771-774, 1990.

YANG, H. et al. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC–DAD method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 49, n. 1, p. 140-144, 2009.

Capítulo 2

Pancreatic lipase inhibitory activity of stephalagine alkaloid from the fruit bark of *Annona crassiflora* (Annonaceae)

Artigo científico que será submetido à
revista Industrial Crops and Products
(Fator de impacto: 3,449)

Pancreatic lipase inhibitory activity of stephalagine alkaloid from the fruit bark of *Annona crassiflora* (Annonaceae)

Mariana Nunes Pereira¹, Allisson Benatti Justino¹, Leonardo Gomes Peixoto¹, Danielle Diniz Vilela¹, Mário Machado Martins², Marcos Pivatto², Thaise Lara Teixeira³, Cláudio Vieira da Silva³, Foued Salmen Espindola^{1*}

¹*Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia-MG, Brazil.*

²*Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN), Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia-MG, Brazil.*

³*Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia-MG, Brazil.*

Corresponding Author

Foued Salmen Espindola

E-mail: foued@ufu.br

Phone: 55 (34) 3225-8439

Address: Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Av. Pará, 18 1720, CEP 38400-902, Uberlândia-MG, Brasil.

Resumo

Annonaceae é uma importante família fonte de alcaloides bioativos. Como parte de nossa investigação em curso à procura de novos compostos bioativos, o extrato etanólico das cascas do fruto de *Annona crassiflora* foi investigado. Este extrato foi submetido a extração líquido-líquido, obtendo-se uma fração alcaloidal bioativa. Esta fração foi cromatografada utilizando cromatografia em coluna seguida por separações em HPLC. O alcaloide purificado foi submetido à espectrometria de massa de alta resolução com ionização em electrospray e impacto de elétrons, e por espectroscopia de RMN utilizando as técnicas de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC e análise HMBC-N, para se obter a molécula isolada denominada de estefalagina, que pertence à classe dos alcaloides aporfinicos. A estefalagina foi avaliada como potente inibidora da lipase pancreática (LP), através de um ensaio in vitro utilizando ensaio cinético de p-nitrofenil palmitato como substrato. A estefalagina apresentou atividade inibidora contra LP (CC50 8,35 µg.mL⁻¹) e baixa citotoxicidade, sugerindo assim a este composto um potencial agente anti-obesidade. Este estudo foi o primeiro a relatar o isolamento do alcaloide estefalagina a partir da casca da fruta *A. crassiflora*.

Palavras chave: *Annona crassiflora*; estefalagina; lipase pancreática; araticum; alcaloide.

Abstract

Annonaceae family is an important source of bioactive alkaloids. As part of our ongoing research looking for new bioactive compounds, the ethanol extract from barks of *Annona crassiflora* fruit was investigated. This extract was subjected to liquid–liquid extraction, yielding a bioactive alkaloidal fraction. This fraction was chromatographed using column chromatography followed by HPLC separations. The purified alkaloid was subjected to high-resolution mass spectrometry with electrospray ionization and electron impact, and NMR spectroscopy using ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC and HMBC-N analysis, to afford the stephalagine which belong to aporphine class of alkaloids. The stephalagine was evaluated as pancreatic lipase (PL) inhibitor that was performed by an *in vitro* kinetic assay using *p*-nitrophenyl palmitate as substrate. The stephalagine showed inhibitory activity against PL (CC_{50} 8.35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and low cytotoxicity, thereby suggesting this compound as a potential anti-obesity agent. This study was the first to report the isolation of stephalagine alkaloid from the bark of *A. crassiflora* fruit.

Keywords: *Annona crassiflora*; stephalagine; pancreatic lipase; araticum; alkaloid

1. Introduction

The Annonaceae is a large family of plants found in the Brazilian Cerrado, which has several species commonly employed in traditional medicine due to their pharmacological properties (DRAGANO et al., 2010; FORMAGIO et al., 2015). Several species of *Annona* genus from Annonaceae contain bioactive compounds with cytotoxic, antitumor, pesticide, antimicrobial and antiparasitic activities (LIAW et al., 2016). Among them *Annona crassiflora* Mart. is known to possess bactericidal, antifungal, antimalarial, nematicide, anti-inflammatory and chemopreventive activities (PEREIRA et al., 2008; PIMENTA et al., 2014; MACHADO et al., 2015). Some studies have been made to correlate biological and pharmacological activities with natural products, including flavonoids and alkaloids (LEBOEUF et al., 1982; ROESLER et al., 2007; DRAGANO et al., 2010; MACHADO et al., 2015). The anonaine, annoretine, romucosine and xylopine alkaloids were identified in foliar samples of *A. crassiflora* (EGYDIO; VALVASSOURA; SANTOS, 2013), indicating the presence of isoquinoline alkaloids in this specie that have a common biosynthetic pathway with stephalagine. Interestingly, the isoquinoline skeleton-derivative alkaloids have been reported as pancreatic lipase (PL) inhibitor (VUDDANDA; CHAKRABORTY; SINGH, 2010). However, alkaloids with properties of PL inhibition have not yet been identified in *A. crassiflora*.

PL is the most important lipolytic enzyme involved in the digestion of triglycerides. The PL inhibition has anti-obesity effect because it decreases fat absorption and regulates the appetite (LUNAGARIYA et al., 2014). Caffeine, theophylline and theobromine alkaloids were reported as human PL inhibitor agents (WIKIERA; MIKA; ŻYŁA, February 2012). Others natural molecules such as protamine (TSUJITA; MATSUURA; OKUDA, 1996), ϵ -polylysine (TSUJITA et al., 2006), polysaccharides like chitosan (SUMIYOSHI; KIMURA, 2006), dietary fibers from wheat bran and cholestyramine (LAIRON et al., 1985), and soya proteins (ROY; SCHNEEMAN, 1981) have also PL inhibitory properties. Thus, our main goal was to find compounds with PL inhibitory activity in the barks of *A. crassiflora* fruits.

Therefore, investigation of the barks of *A. crassiflora* fruits was carried out with the aim to find new bioactive alkaloids in EtOH extract to evaluate their action as PL

inhibitors. To this end, this extract was subjected to liquid–liquid extraction, which yielded an alkaloidal fraction. This fraction was chromatographed using column chromatography followed by HPLC separations and afforded the aporphine alkaloid stephalagine (Figure 1). This compound was then assessed for its lipase inhibitory activity by means of microplate kinetic assays.

>FIGURE 1 – HEREABOUTS<

2. Experimental

2.1. General experimental procedures

Infrared (IR) spectra were recorded on a Shimadzu (Prestige-21) spectrometer with KBr pellets. The 1D (^1H , ^{13}C , and DEPT) and 2D (^1H – ^1H COSY, HSQC and HMBC) NMR experiments were accomplished on a Bruker Ascend™ 600 Avance III HD spectrometer (14.1 T) at 600 MHz (^1H) and 150 MHz (^{13}C), at 30 °C, using TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00$) as internal standard or residual solvent resonances of chloroform at δ 7.26 and 77.0 as references for ^1H and ^{13}C , respectively. High-resolution mass spectra with electrospray ionization were measured on an Agilent Q-TOF (model 6520) apparatus, operating in the positive mode. MeOH–H₂O (4:1) was used as solvent system and the samples were infused into the ESI source at a flow rate of 200 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. N₂ was used as drying gas at a flow rate of 8 L.min⁻¹ and as nebulizer gas at 58 psi. The temperature of nebulizer was set at 200 °C and a potential of 4.5 kV was applied in the capillary. The collision energy was automatically adjusted according to the m/z precursor and energy state. The EIMS were determined on a gas chromatography Shimadzu QP2010 mass spectrometer at an ionizing potential of 70 eV. The following conditions were employed: carrier gas was He at a constant flow of 1.0 mL.min⁻¹; column was SPB-5 (30 m \times 0.25 mm i.d.) fused-silica capillary with polydimethylsiloxane (0.25 μm film thickness) as the stationary phase; injector temperature was set at 220 °C, with a split ratio of 1:20; oven temperature initially held at 60 °C and then increased at a rate of 6 °C.min⁻¹ to 280 °C, which was maintained for 24 min; time run 60 min. The scanned mass range was 40–650 amu.

Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (40–63 mesh, Sigma). Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 with fluorescent indicator UV₂₅₄ (Macherey-Nagel), and spots were visualized under UV light (254 and 366 nm) and spraying with iodochloroplatinate reagent (Sigma). Analytical and preparative HPLC separations were accomplished on a Shimadzu LC instrument equipped with a binary pump model LC-6AD, an oven model CTO-20A, a UV-Vis detector model SPD-M20D, an evaporative light scattering detector model ELSD-LT II, a fraction collector model FRC-10A, and an automatic sample injector model SIL-10AF and controlled with the aid of an LC workstation LC Solution software. The columns used were a Phenomenex Luna RP-C18 (250 × 4.60 mm, 5 µm) and a preparative Shimadzu RP-C18 (250 × 30 mm, 5 µm) protected with the corresponding guard columns. All solvents utilized in the experimental procedures were HPLC-grade or had been previously distilled. Water was purified immediately prior to use with a reverse osmosis system with deionizer Quimis.

2.2. Plant material

Fruits of *A. crassiflora* were collected in natural resources of the Cerrado Biome in the north region of Minas Gerais, Brazil, in March 2015, by a Cerrado native fruits merchant. The plant was identified by André Vito Scatigna from Biology Institute of the Federal University of Uberlandia, Uberlândia–MG, Brazil. A voucher specimen (HUFU68467) has been deposited in the herbarium of this institute (Herbarium Uberlandense). The araticum barks were transported to our laboratory in the Federal University of Uberlandia and stored at –20 °C until analysis. The National Counsel of Technology and Scientific Development (CNPq), under Resolution 246/2009, the Board of the Genetic Heritage Management, authorized the access and genetic heritage components shipment, nº. 010743/2015-4.

2.3. Extraction and isolation

The dried and powdered bark (1.0 Kg) were extracted with aqueous 98% EtOH (5 L × 3) for six days at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure in a rotary evaporator, which furnished a thick syrup (49.8 g) that was

lyophilized and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The crude EtOH extract (49.8 g) was reconstituted in MeOH–H₂O (9:1), filtered, and submitted to liquid-liquid extraction with *n*-hexane ($4 \times 200\text{ mL}$, 416.0 mg), CH₂Cl₂ ($4 \times 200\text{ mL}$, 669.0 mg), EtOAc ($4 \times 200\text{ mL}$, 2.1 g) and *n*-BuOH ($4 \times 200\text{ mL}$, 12.0 g). The CH₂Cl₂ fraction (194.9 mg) was submitted to CC over silica gel (30.7 g, $\varnothing = 2.0\text{ cm}$, $h = 20.0\text{ cm}$), eluting with CHCl₃-MeOH-NH₄OH (9:1:0.25 (168 mL); 8:2:0.25 (224 mL) and 7:3:0.25 (168 mL)) and MeOH (100 mL), to produce 107 fractions (F₁–F₁₀₇) that were grouped on the basis of TLC analysis. Part of alkaloidal fraction F₄₁–F₅₃ (60.0 mg) was further purified by semipreparative HPLC on RP-C₁₈ and eluted with a gradient of increasing MeOH–H₂O: 60–89% (0–85 min); 89–100% (85–100 min); 100% (100–105 min) (flow rate of $10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, UV 254 nm), which furnished the pure alkaloid stephalagine (t_R 80.0 min, 30.0 mg).

Stephalagine: white solid (30.0 mg); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 203 (4.04), 242 (3.80), 277 (3.81); IR (KBr) ν_{max} 2928, 2841, 1626, 1458, 1421, 1394, 1342, 1207, 1090, 1068, 1049, 974, 933, 773, 741 cm^{-1} ; ¹H (600 MHz) and ¹³C (150 MHz) NMR data (CDCl₃), see Table 1; (+)-HRESIMS m/z 310.1439 [M + H]⁺ (calcd for C₁₉H₂₀NO₃, 310.1438 (Δ 0.3 ppm)); ESIMS/MS m/z 310 [M + H]⁺ (24), 280 (29), 279 (100), 264 (8), 263 (7), 249 (12), 235 (6), 234 (7), 233 (16), 221 (5), 219 (7), 207 (5), 206 (13), 205 (10), 202 (7), 191 (15), 190 (11), 189 (15), 179 (7), 178 (25), 165 (8); EIMS m/z 309 [M]⁺⁺ (55), 308 (100), 307 (41), 293 (15), 292 (20), 278 (13), 275 (10), 267 (10), 266 (55), 265 (9), 260 (7), 236 (7), 235 (6), 208 (6), 165 (9); TLC R_f 0.78 (9:1:0.25 CHCl₃-MeOH-NH₄OH).

2.4. Cytotoxic activity (CC₅₀)

Samples were dissolved in MeOH and diluted in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) culture medium supplemented to form a stock solution of $640\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. The cell viability test was performed with Vero cells (ATCC CCL 81) (kidney fibroblasts, African green monkey). The cells were adhered in each well of microplate in the concentration of 1×10^4 cells, supplemented with DMEM. Once attached, the culture medium was removed and sample solutions were added at concentrations of 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 and $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The controls of cell growth, solvent (MeOH), samples and negative control (100% lysed cells), were also prepared. The

plates were incubated for 48 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Next, 10 µL of developing solution (3 mM resazurin in PBS) was added to each well and the plate was incubated for 24 h under the same conditions. The absorbance values were measured at 594 nm in a microplate spectrophotometer (VersaMax – Molecular Devices). The assays were performed in triplicate and the absorbance values for each concentration were used to calculate cell viability according to the growth control, the CC₅₀ values were determined by graph of dose response with non-linear regression (PILLAY et al., 2007).

2.5. Inhibition of lipase

The EtOH extract of araticum bark, CH₂Cl₂ fraction and the isolated alkaloid were analyzed for their ability to inhibit lipase activity. This was done using a method (GUPTA; RATHI; GUPTA, 2002) with *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) as substrate and porcine pancreatic lipase (PL) (type II, Sigma). The extract/fraction/alkaloid previously diluted in DMSO was incubated with 10 g.L⁻¹ PL (diluted in 0.05 mol.L⁻¹ Tris-HCl buffer pH 8.0, containing 0.010 mol.L⁻¹ CaCl₂ and 0.025 mol.L⁻¹ NaCl) for 20 minutes at 37 °C. The reaction was started by adding 0.008 mol.L⁻¹ *p*-NPP (diluted in 0.5 % Triton-X 100 (m.v⁻¹)) and absorbance values were measured at 410 nm during 30 minutes at 37 °C. This assay was also carried out with orlistat (purity > 95%) as a positive control and DMSO as a negative control. All assays were performed in triplicate and the results were presented as a percentage of lipase inhibition (LI), calculated according to the following equation: $LI (\%) = [(A \text{ control} - A \text{ sample}) / (A \text{ control})] \times 100$, where *A sample* is the area under the curve calculated using the absorbance values obtained in the presence of the extract/fraction/alkaloid, and *A control* is the area under the curve calculated using the absorbance values obtained in the absence of extract/fraction/alkaloid (GUPTA; RATHI; GUPTA, 2002).

3. Results and discussion

Stephalagine was isolated as a white solid. Its molecular weight was measured by HRESIMS, and the molecular formula was established as C₁₉H₁₉NO₃, which implied eleven degrees of unsaturation. The observed protonated molecular ion at *m/z* 310.1439

$[M + H]^+$ was close to the value calculated for $C_{19}H_{20}NO_3$, 310.1438 (Δ 0.3 ppm). The IR spectrum displayed absorption bands that were assigned to the methylenes of rings B (heterocyclic) and C (2841 cm^{-1}), conjugated aromatic rings A and D (1626 cm^{-1}), aromatic rings A and D (1421 cm^{-1}), tertiary amine of heterocyclic ring B (1207 cm^{-1}), methylenedioxy ring (1049 cm^{-1}) and disubstituted aromatic ring D (773 cm^{-1}) functionalities. The 1D and 2D NMR data were related to those of aporphine alkaloids (BLANCHFIELD et al., 2003) and the numbering of the skeleton is according to the accepted ruling (GUINAUDEAU et al., 1979). Examination of the ^1H and ^{13}C NMR spectra recorded in CDCl_3 (Table 1) confirm the presence of two aromatic rings (A and D). In addition, the ^1H NMR spectrum showed the presence of a methylenedioxy moiety at δ 5.83 (d, H-12, δ_{C} 100.7) and 5.98 (d, H-12', δ_{C} 100.7) linked at C-1 and C-2 and a methoxy group at δ 3.93 (s, H-13, δ_{C} 59.4) linked at C-3 of the A ring. The considerable deshielding displayed in the ^{13}C signals at δ_{C} 144.3 (C-1), 135.0 (C-2), 139.9 (C-3), were in agreement with the 1,2,3-trisubstituted A ring of an aporphine alkaloid. Furthermore, the ^1H NMR spectrum also showed the presence of an *N*-methyl group at δ 2.47 (s, H-14, δ_{C} 43.7), three duplicated signals for *geminal* methylenes at δ 2.68 and 2.76 (m, H-4 and H-4', δ_{C} 23.5), 2.37 and 3.02 (ddd, H-5 and H-5', δ_{C} 53.2) and 3.07 and 2.58 (dd, H-7 and H-7', δ_{C} 34.4) and a methine at 3.07 (dd, H-6a, δ_{C} 62.0). The remaining signals observed at δ 7.15 (dd, 1H, δ_{C} 128.1), 7.10 (ddd, 1H, δ_{C} 126.8), 7.20 (ddd, 1H, 127.0), and 7.91 (dd, 1H, 126.2) were correlated to H-8, H-9, H-10 and H-11, respectively and confirm the substitution pattern of the aromatic D ring. Three-bond correlations were observed from H-12 to C-1 and C-2, H-13 to C-3, and H-14 to C-5 and C-6a (Figure 2). Additionally, the HMBC (^1H - ^{15}N) spectrum showed a correlation between the nitrogen signal at δ 43.4 and signals at δ 2.68 and 2.76 (H-4) and 2.58 and 3.07 (H-7). These data, supported by the ^{13}C NMR, COSY, HSQC, and HMBC spectra, agreed with the assumption made on the substitution pattern in aporphine alkaloid bearing a methylenedioxy moiety and a methoxy group linked to the A ring as well as a methyl group linked to the nitrogen. According to these data, the structure was determined as 1,2-methylenedioxy-3-methoxyaporphine (stephalagine).

Table 1. NMR Spectroscopic data of stephalagine in CDCl_3 (δ in ppm)^a

Position	δ_{C} , mult.	δ_{H}^b (<i>J</i> in Hz)	HMBC	COSY
1	144.3, C		H-12; H-12'	
2	135.0, C		H-12; H-12'	

3	139.9, C		H-13	
3a	128.0, C		H-6 ^a	
4		2.68 m		
4'	23.5, CH ₂	2.76 m		H-5
5		2.37 ddd (11.8; 11.8; 4.1)	H-14	H-5'; H-4'
5'	53.2, CH ₂	3.02 ddd (11.8; 5.9; 1.3)	H-14	H-5
6a	62.0, CH	3.07 ^c dd (14.7; 4.0)	H-14; H-7'; H-5'	H-7'
7		2.58 dd (14.7; 14.7)		H-6a
7'	34.4, CH ₂	3.07 ^c dd (14.7; 4.0)	H-8	
7a	134.6, C		H-7'; H-6a; H-9; H-11	
8	128.1, CH	7.15 dd (7.4; 1.0)	H-7'; H-10	H-9
9	126.8, CH	7.10 ddd (7.4; 7.4; 1.0)	H-11	H-8; H-10
10	127.0, CH	7.20 ddd (7.4; 7.4; 1.0)	H-8	H-11
11	126.2, CH	7.91 dd (7.4; 1.0)	H-9	H-10
11a	131.1, C		H-8	
12		5.83 d (1.5)		H-12'
12'	100.7, CH ₂	5.98 d (1.5)		H-12
13	59.4, CH ₃	3.93 s		
14	43.7, CH ₃	2.47 s		

^a Recorded at 600 and 150 MHz for ¹H and ¹³C NMR, respectively; ^b multiplicity of signals is given as follows: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; ddd, doublet of doublet of doublets; m, multiplet; ^c overlapped.

>FIGURE 2 – HEREABOUTS<

The positive ESI mass spectra of stephalagine showed a signal at m/z 310.1439, corresponding to the protonated molecular ion $[M + H]^+$. In order to obtain structural information, collisionally activated dissociation (CAD) MS experiments were performed on protonated molecular ions of stephalagine. ESI-MS/MS spectrum showed a fragment with m/z 279 deriving from the loss of 31 u , which corresponds to the heterolytic cleavage of B ring (Figure 3) (DEMARQUE et al., 2016).

>FIGURE 3 – HEREABOUTS<

The EI mass spectra of stephalagine showed signals at m/z 309, 308, 293, 292, 278 and 266. The fragment with m/z 308 can be explained by the loss of 1 u , which corresponds to the homolytic cleavage of a H-linkage to carbon of a methoxy group in

the A ring or a hydrogen from the methylene at C-5 of B ring. Homolytic cleavage of CH₃-linkage to oxygen can lead to m/z 293 and similar fragmentation pathway can lead to m/z 292. Loss of methoxy group can lead to m/z 278 and a retro-Diels–Alder (RDA) cleavage of ring B explains the signal at m/z 266 (Figure 4) (DEMARQUE et al., 2016). On the basis of previously published data (TACKIE A. N., 1974) this evidence is in agreement with the alkaloid stephalagine.

>FIGURE 4 – HEREABOUTS<

The stephalagine was first isolated from *Stephania dinklagei* from Menispermaceae family, by Paris and Le Men in 1955 (Oliver-Bever, 1986). There are no reports of this compound in species of Annonaceae family. A study conducted by Goren, Zhou and Kingston (2003) using yeast strains showed that stephalagine was not cytotoxic and did not cause DNA damage. However, no other biological activity was verified for this alkaloid. As part of an ongoing research project looking for new compounds as PL inhibitors, the stephalagine was evaluated. Both EtOH extract of barks from *A. crassiflora* fruit and CH₂Cl₂ fraction inhibited the PL, showing CC₅₀ values of 104.5 and 108.10 µg.mL⁻¹, respectively. However, the stephalagine showed higher PL inhibitory activity and the lowest CC₅₀ value (8.35 µg.mL⁻¹); orlistat (CC₅₀ 0.20 µg.mL⁻¹) was used as a positive control (Figure 5). This result indicated a PL inhibitory activity for stephalagine. The isoquinoline skeleton derivative alkaloids are known for their lipase inhibitory capacity (VUDDANDA; CHAKRABORTY; SINGH, 2010). A study conducted by Mohammad et al. (2013) showed that berberine, an isoquinoline alkaloid derivative found in *Hydrastis canadensis*, *Berberis* spp and *Cortex phellodendri*, also have PL inhibitory activity, with IC₅₀ of 106 µg.mL⁻¹ (MOHAMMAD et al., 2013). Other alkaloids were described as potential PL inhibitors, such as caffeine, theophylline and theobromine, usually found in various beverages and foods, which were capable to inhibit the hydrolysis of tributyrin and tripalmitate catalyzed by human pancreatic lipase (WIKIERA; MIKA; ŻYŁA, 2012). Furthermore, the pyrrole alkaloids isolated from the fruits of *Morus alba*, methyl 2-[2-formyl-5-(methoxymethyl)-1H-pyrrol-1-yl]-3-(4-hydroxyphenyl) propanoate and 2-(5-hydroxymethyl-2',5'-dioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-1,3'-bipyrrole) carbaldehyde, inhibited PL by 40% and 70%, respectively (KIM et al., 2014). In addition, stephalagine showed low cytotoxicity when compared to CH₂Cl₂ fraction (Table 2) and, since the PL

inhibitory activity exercised by this alkaloid was observed in concentrations below the cytotoxicity level, the use of this molecule in further *in vivo* assays is feasible. Therefore it may be considered a promising scaffold for further studies in developing PL inhibitors.

Table 2: Cell viability of Vero cells treated with ethanol extract (EtOH), dichloromethane (CH₂Cl₂) fraction and stephalagine alkaloid from the barks of *A. crassiflora* fruit.

Sample	Vero cells – CC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
EtOH extract	331 ± 12
CH ₂ Cl ₂ fraction	68 ± 20
Stephalagine	353 ± 11

>FIGURE 5 – HEREABOUTS<

In this study, we report for the first time the isolation of the stephalagine alkaloid in the barks of *Annona crassiflora* fruit. Furthermore, our results indicate a PL inhibitory capacity by stephalagine, suggesting this compound as a possible anti-obesity agent. The work with bark of fruits can contribute economically and socially through the recovery of agro-industrial residues.

Acknowledgments

This research was supported by grants from FAPEMIG, grants number APQ-02481-14 awarded to M. P. and APQ-01856-14 awarded to F. S. E. and CNPq, grant number 449846/2014-8 awarded to M. P. The researchers would like to thank the Institute of Genetics and Biochemistry and Institute of Chemistry of the Federal University of Uberlândia for infrastructural support. The researchers also acknowledge CAPES and CNPq for fellowships. This work is part of a research project collaboration of members of the Rede Mineira de Química (RQ-MG) supported by FAPEMIG (project: REDE-113/10 and CEX-RED-00010-14). The authors thank PhD C. V. Silva by helpful in the cytotoxicity cell assay.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the on line version, at.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

4. References

BLANCHFIELD, J. T. et al. Characterisation of alkaloids from some Australian *Stephania* (Menispermaceae) species. **Phytochemistry**, v. 63, n. 6, p. 711-720, 2003.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 183-205, 2001.

DEMARQUE, D. P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural product reports**, v. 33, n. 3, p. 432-455, 2016.

DRAGANO, N. R. V. et al. Influence of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress *in vivo*. **Plant foods for human nutrition**, v. 65, n. 4, p. 319-325, 2010.

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, 2013.

FORMAGIO, A. S. et al. *In vitro* biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 4, p. 308-315, 2015.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Aporphine alkaloids. **Lloydia**, v. 38, p. 275-338, 1979.

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical biochemistry**, v. 311, n. 1, p. 98-99, 2002.

KIM, S. B. et al. Pyrrole alkaloids from the fruits of *Morus alba*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 24, p. 5656-5659, 2014.

LEBOEUF, M. et al. Alkaloids of the Annonaceae. Part 33. Annomontine and methoxyannomontine, two new pyrimidine- β -carboline-type alkaloids from *Annona montana*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 1205-1208, 1982.

LIAW, C.-C. et al. Acetogenins from Annonaceae. In: (Ed.). **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 101**: Springer, 2016. p.113-230. ISBN 3319226916.

LUNAGARIYA, N. A. et al. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. **Excli j**, v. 13, p. 897-921, 2014.

MOHAMMAD, M. et al. Inhibition of pancreatic lipase by berberine and dihydroberberine: an investigation by docking simulation and experimental validation. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 5, p. 2273-2278, 2013.

PEREIRA, M. et al. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species. **Molecular ecology resources**, v. 8, n. 6, p. 1329-1331, 2008.

PILLAY, P. et al. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1200-1205, 2007.

PIMENTA, L. P. S. et al. In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Natural product research**, v. 28, n. 16, p. 1254-1259, 2014.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007.

ROY, D. M.; SCHNEEMAN, B. O. Effect of soy protein, casein and trypsin inhibitor on cholesterol, bile acids and pancreatic enzymes in mice. **J Nutr**, v. 111, n. 5, p. 878-885, 1981.

SUMIYOSHI, M.; KIMURA, Y. Low molecular weight chitosan inhibits obesity induced by feeding a high-fat diet long-term in mice. **J Pharm Pharmacol**, v. 58, n. 2, p. 201-207, 2006.

TACKIE A. N., D.-B. D., LARTEY P. A., SCHIFF, JR. P. L., KNAPP AND D. J. SLATKIN J. E. . Alkaloids of *Stephania dinklagei*. **Constituents of West African Medicinal Plants**, v. III, 1974.

TEMPONE, A. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005.

TSUJITA, T.; MATSUURA, Y.; OKUDA, H. Studies on the inhibition of pancreatic and carboxylester lipases by protamine. **J Lipid Res**, v. 37, n. 7, p. 1481-1487, 1996.

TSUJITA, T. et al. Antiobesity action of epsilon-polylysine, a potent inhibitor of pancreatic lipase. **J Lipid Res**, v. 47, n. 8, p. 1852-1858, 2006.

VUDDANDA, P. R.; CHAKRABORTY, S.; SINGH, S. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 19, n. 10, p. 1297-1307, 2010.

WIKIERA, A.; MIKA, M.; ŻYŁA, K. Methylxanthine drugs are human pancreatic lipase inhibitors. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 62, n. 2, p. 109-113, 2012.

Legends to the Figures

Figure 1. Stephalagine alkaloids isolated from *A. crassiflora* Mart.

Figure 2. Key COSY (bold) and HMBC (arrow) correlations for stephalagine

Figure 3. Fragmentation pathway proposed for stephalagine (m/z 310) based on the (+)-ESI-MS/MS spectrum (Figure S6, Supplementary Material).

Figure 4. Fragmentation pathway proposed for stephalagine (m/z 309) based on the EI-MS spectrum (Figure S4, Supplementary Material).

Figure 5. Pancreatic lipase inhibitory activity analysis of the ethanol extract, dichloromethane fraction and stephalagine alkaloid from bark of *A. crassiflora*. Results expressed as a percentage of enzymatic inhibition and IC_{50} values. Values expressed as mean \pm standard error. Note: Eth.: ethanol extract, Dic.: dichloromethane fraction, Alk.: stephalagine alkaloid and Cont.: positive control (Orlistat). *n.d.: not detected in the concentrations tested.

Figure 1.

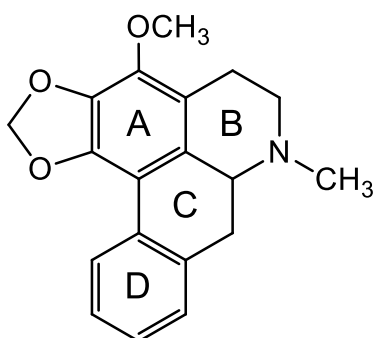


Figure 2.

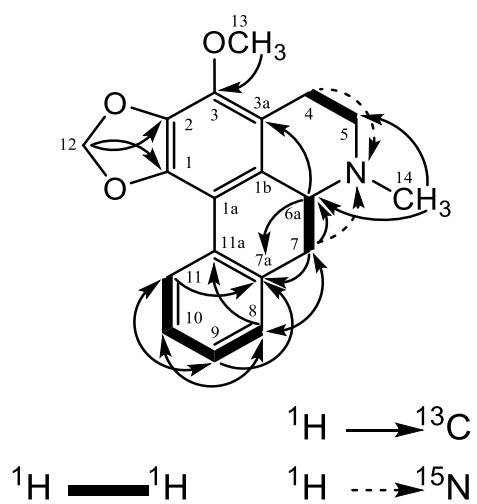


Figure 3.

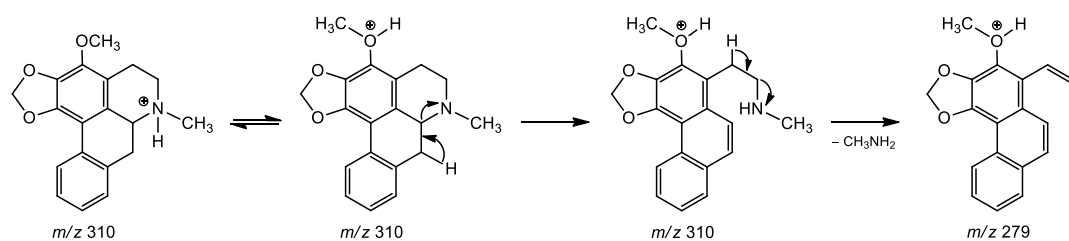


Figure 4.

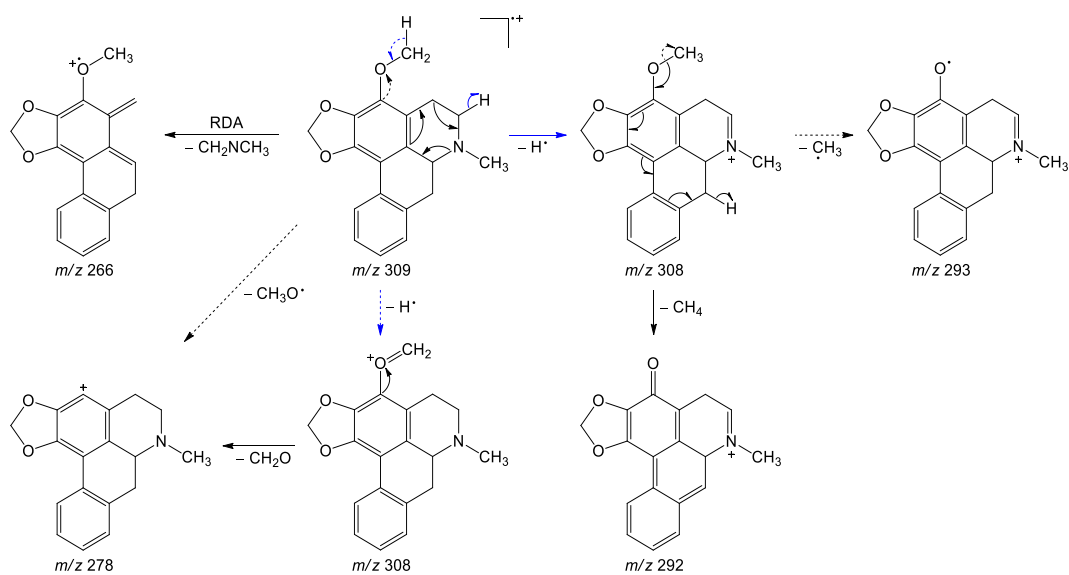
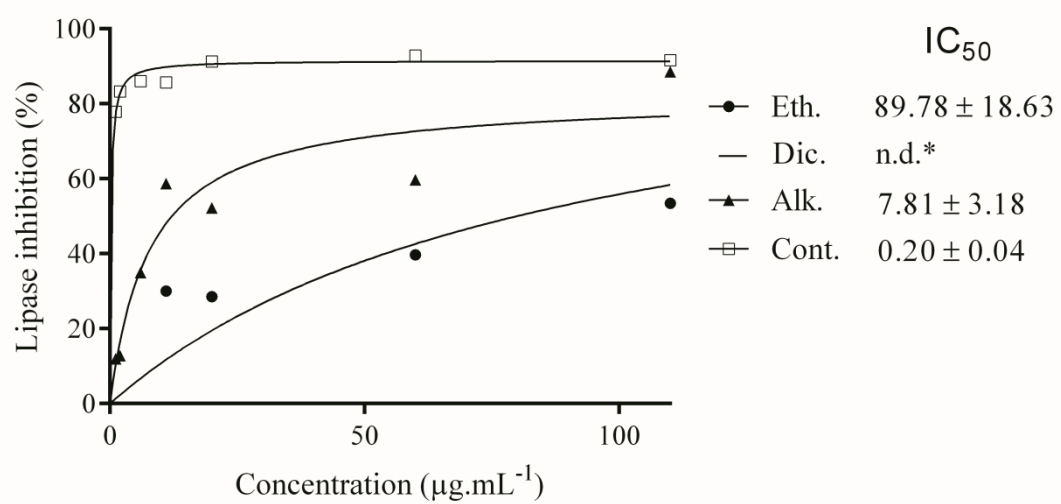


Figure 5.



5. Supplementary material

Pancreatic lipase inhibitory activity of stephalagine alkaloid from the fruit bark of *Annona crassiflora* (Annonaceae)

Mariana Nunes Pereira¹, Allisson Benatti Justino¹, Leonardo Gomes Peixoto¹, Danielle Diniz Vilela¹, Mário Machado Martins², Marcos Pivatto², Thaise Lara Teixeira³, Cláudio Vieira da Silva³, Foued Salmen Espindola^{1*}

¹*Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia-MG, Brazil.*

²*Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN), Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia-MG, Brazil.*

³*Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia-MG, Brazil.*

Corresponding Author

Foued Salmen Espindola

E-mail: foued@ufu.br

Phone: 55 (34) 3225-8439

Address: Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Av. Pará, 18 1720, CEP 38400-902, Uberlândia-MG, Brasil.

Table of Contents

Figure S1.	Analytical TLC (SiO ₂) of the stephalagine developed with CHCl ₃ -MeOH-NH ₄ OH (9:1:0.25) and reveled with iodochloroplatinate reagent.
Figure S2.	UV (MeOH) spectrum of stephalagine.
Figure S3.	IR (KBr) spectrum of stephalagine.
Figure S4.	GC-EIMS of stephalagine (m/z 309 [M] ⁺⁺).
Figure S5.	(+)-HRESIMS of stephalagine (m/z 310.1439 [M + H] ⁺ , calcd for C ₁₉ H ₂₀ NO ₃ , 310.1438 (Δ 0.3 ppm)).
Figure S6.	ESIMS/MS of stephalagine (m/z 310 [M + H] ⁺).
Figure S7.	600 MHz ¹ H NMR spectrum of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S8.	600 MHz ¹ H NMR spectrum (expansion δ 2.3–3.2) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S9.	600 MHz ¹ H NMR spectrum (expansion δ 3.5–4.2) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S10.	600 MHz ¹ H NMR spectrum (expansion δ 5.8–6.1) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S11.	600 MHz ¹ H NMR spectrum (expansion δ 7.0–8.0) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S12.	150 MHz ¹³ C NMR spectrum of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S13.	150 MHz ¹³ C NMR spectrum (expansion δ 126.0–136.0) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S14.	COSY spectrum of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S15.	150 MHz ¹³ C NMR spectrum (expansion δ 126.0–136.0) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S16.	COSY spectrum (expansion δ 5.6–6.3) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S17.	COSY spectrum (expansion δ 7.0–8.0) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S18.	HSQC spectrum of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S19.	HSQC spectrum (expansion δ 2.0–4.5) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S20.	HSQC spectrum (expansion δ 4.5–8.2) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S21.	HMBC spectrum of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .
Figure S22.	HMBC spectrum (expansion δ 2.3–4.0) of stephalagine in chloroform- <i>d</i> .

- Figure S23.** HMBC spectrum (expansion δ 3.9–4.0) of stephalagine in chloroform-*d*.
- Figure S24.** HMBC spectrum (expansion δ 5.8–6.0) of stephalagine in chloroform-*d*.
- Figure S25.** HMBC spectrum (expansion δ 6.8–8.2) of stephalagine in chloroform-*d*.
- Figure S26.** HMBC spectrum (expansion δ 7.0–8.1) of stephalagine in chloroform-*d*.
- Figure S27.** HMBC- ^{15}N spectrum of stephalagine in chloroform-*d*.

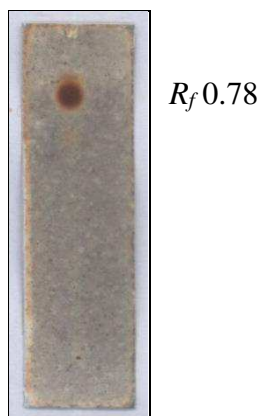


Figure S1. Analytical TLC (SiO₂) of the stephalagine developed with CHCl₃-MeOH-NH₄OH (9:1:0.25) and revealed with iodochloroplatinate reagent.

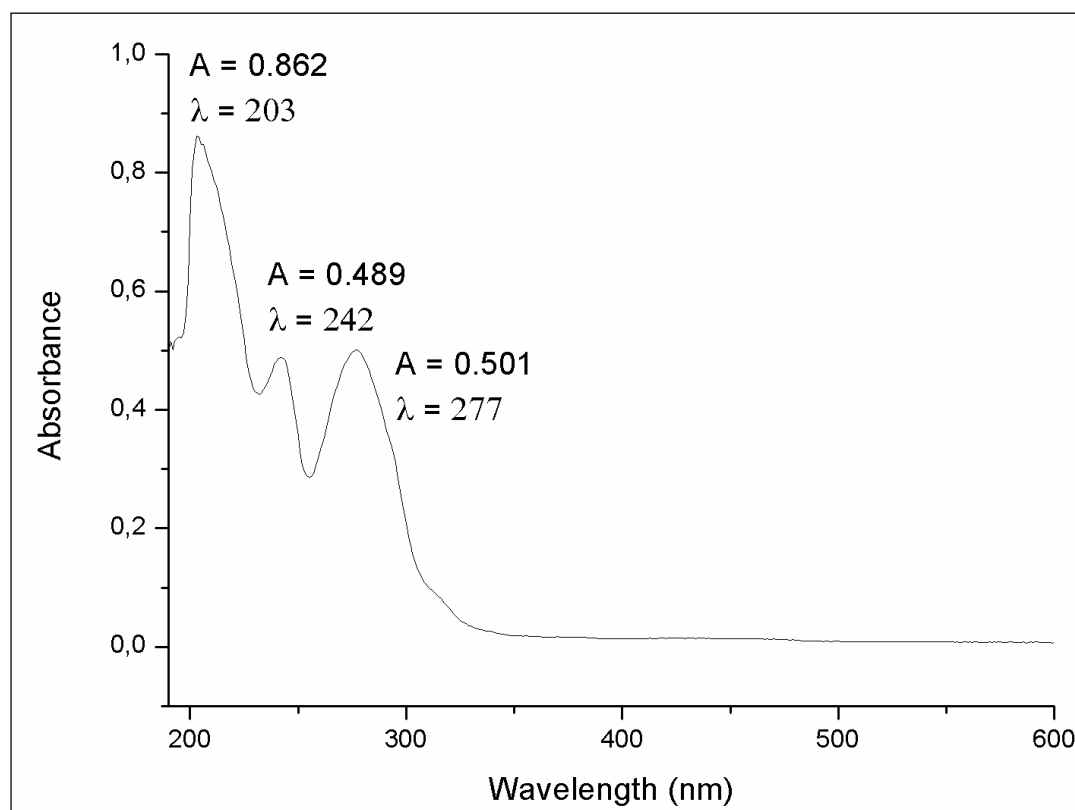


Figure S2. UV (MeOH) spectrum of stephalagine.

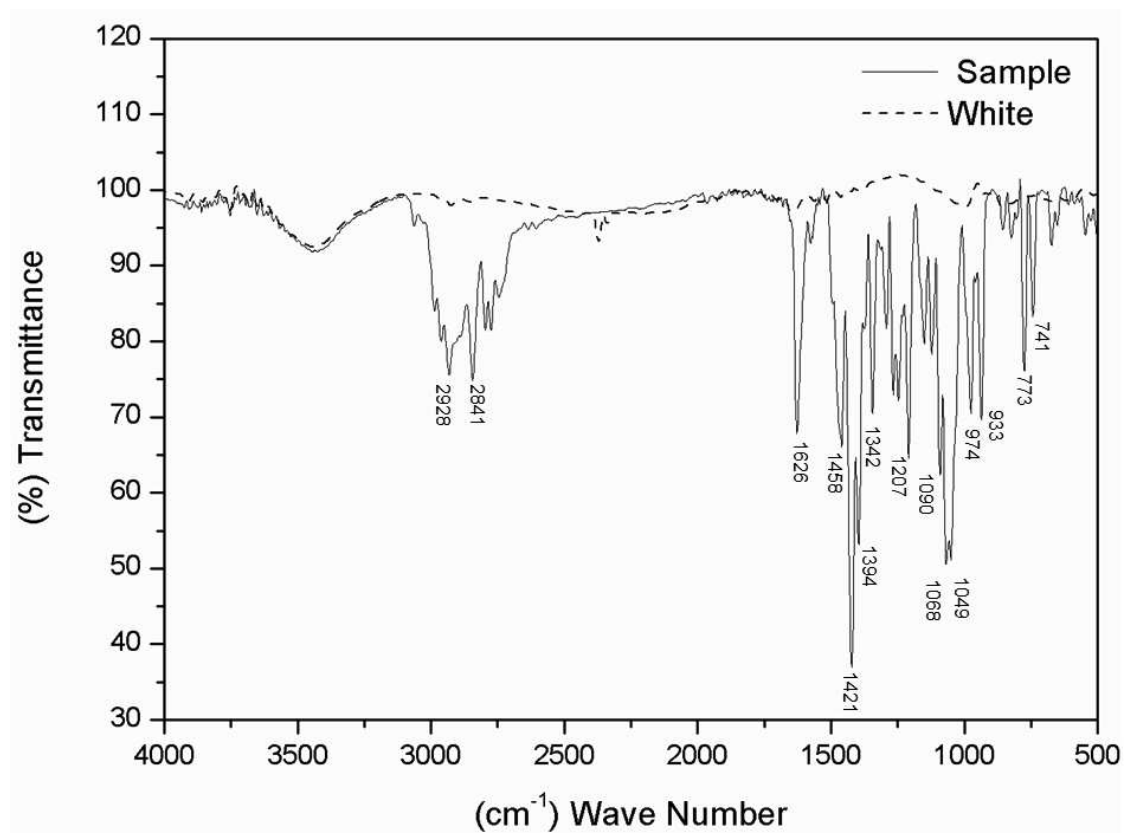


Figure S3. IR (KBr) spectrum of stephalagine.

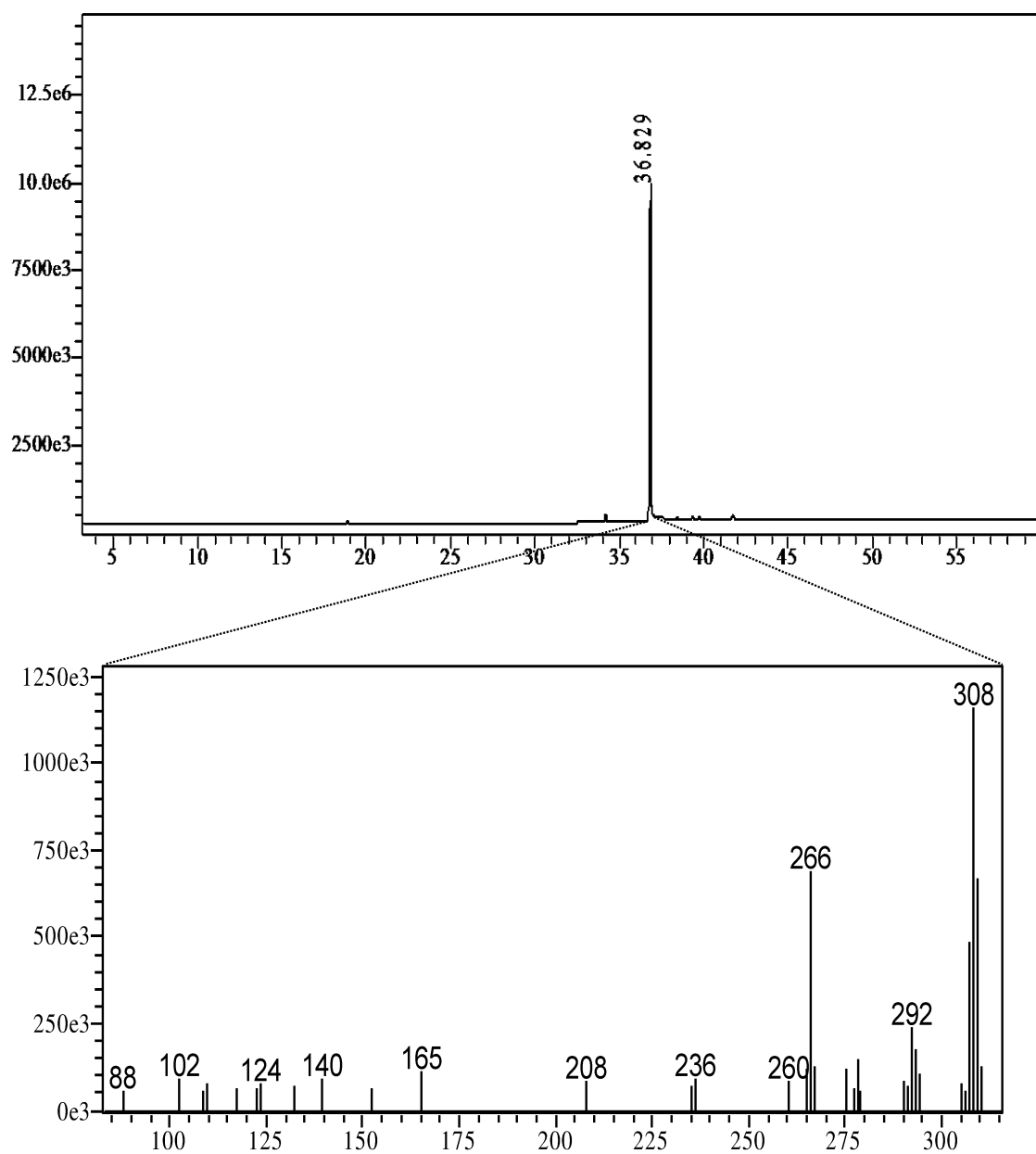


Figure S4. GC-EIMS of stephalagine (m/z 309 $[M]^{+}$).

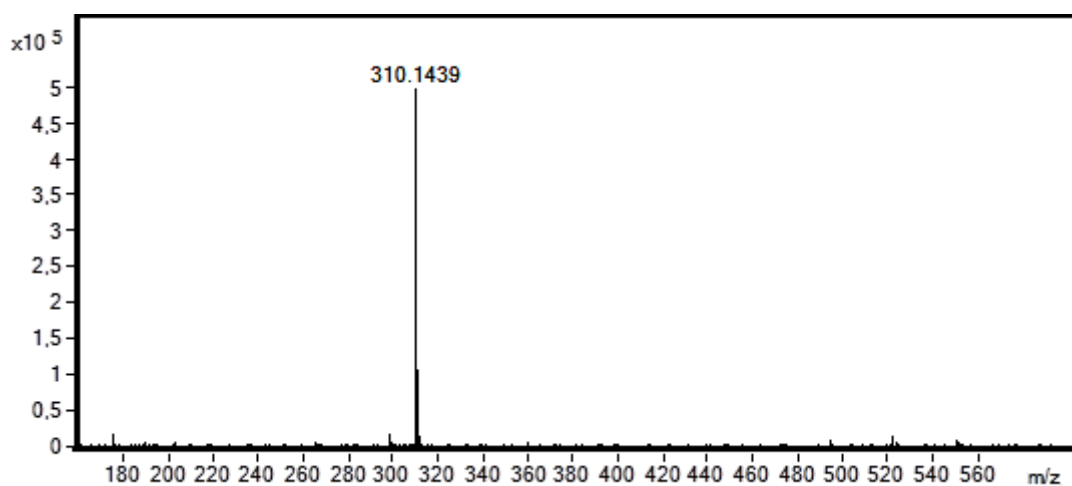


Figure S5. (+)-HRESIMS of stephalagine (m/z 310.1439 $[M + H]^+$, calcd for $C_{19}H_{20}NO_3$, 310.1438 (Δ 0.3 ppm)).

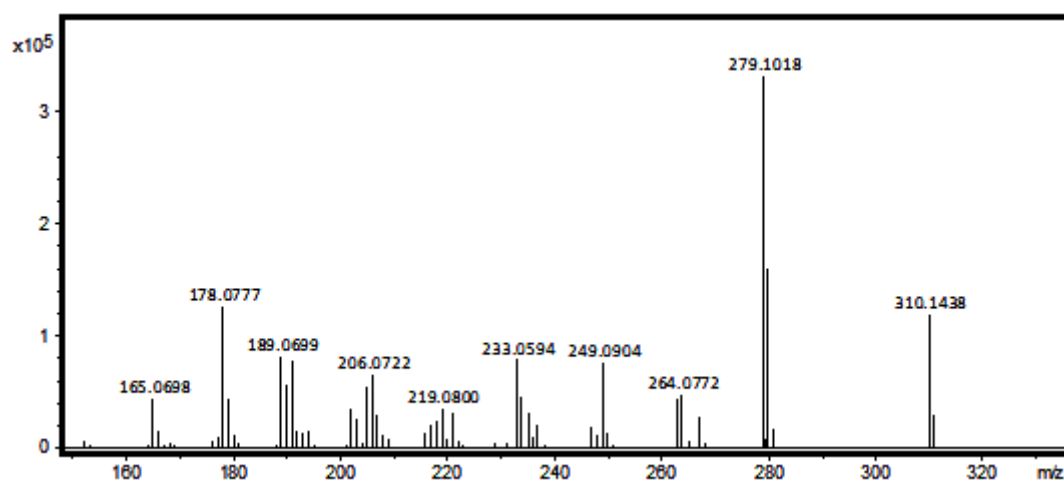


Figure S6. ESIMS/MS of stephalagine (m/z 310 $[M + H]^+$).

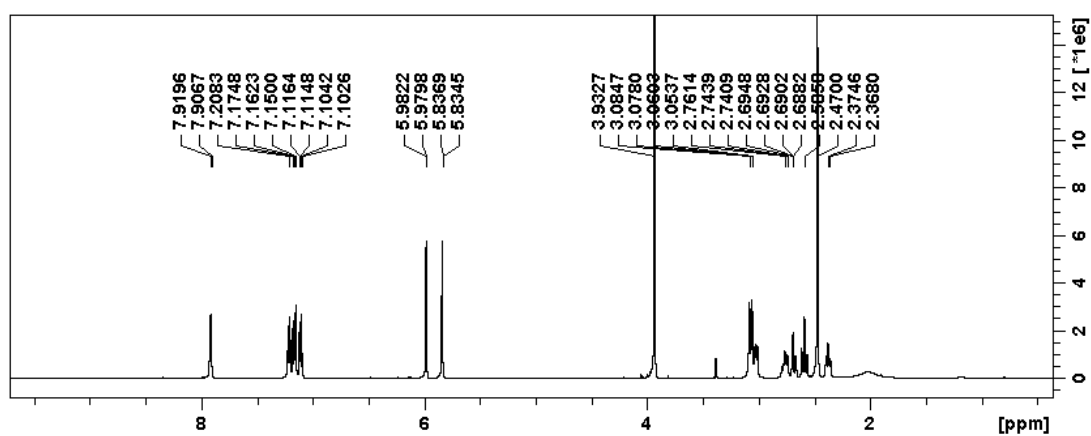


Figure S7. 600 MHz 1H NMR spectrum of stephalagine in chloroform- d .

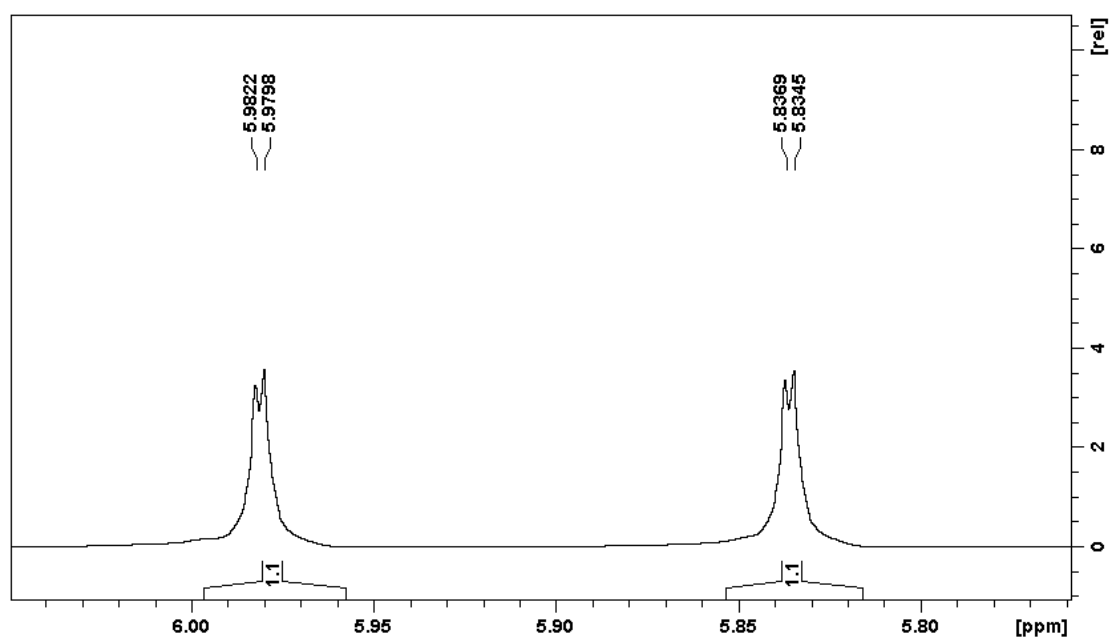


Figure S10. 600 MHz ^1H NMR spectrum (expansion δ 5.8–6.1) of stephalagine in chloroform-*d*.

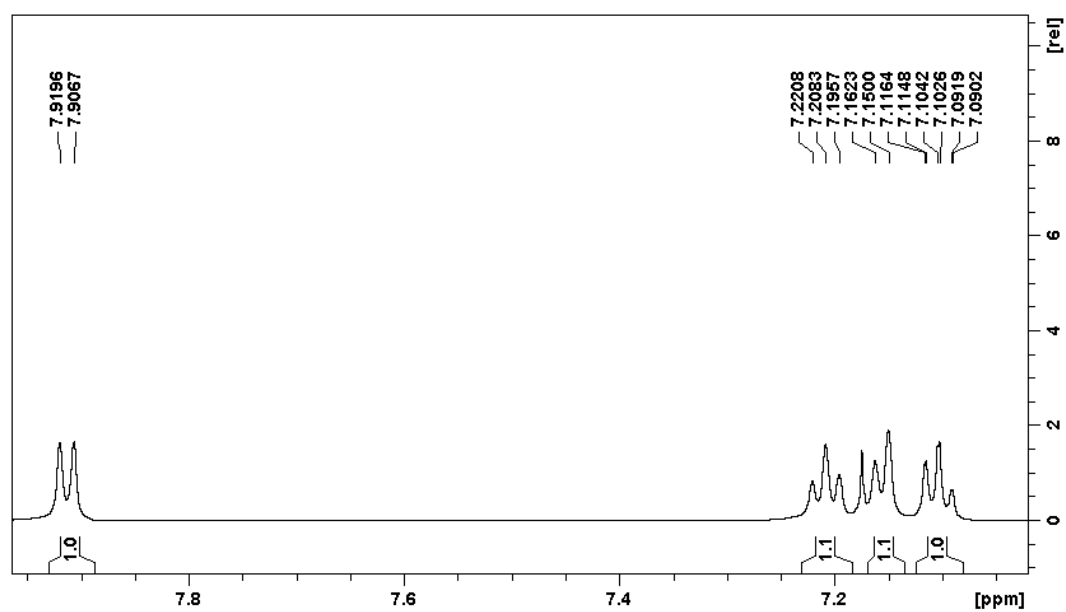


Figure S11. 600 MHz ^1H NMR spectrum (expansion δ 7.0–8.0) of stephalagine in chloroform-*d*.

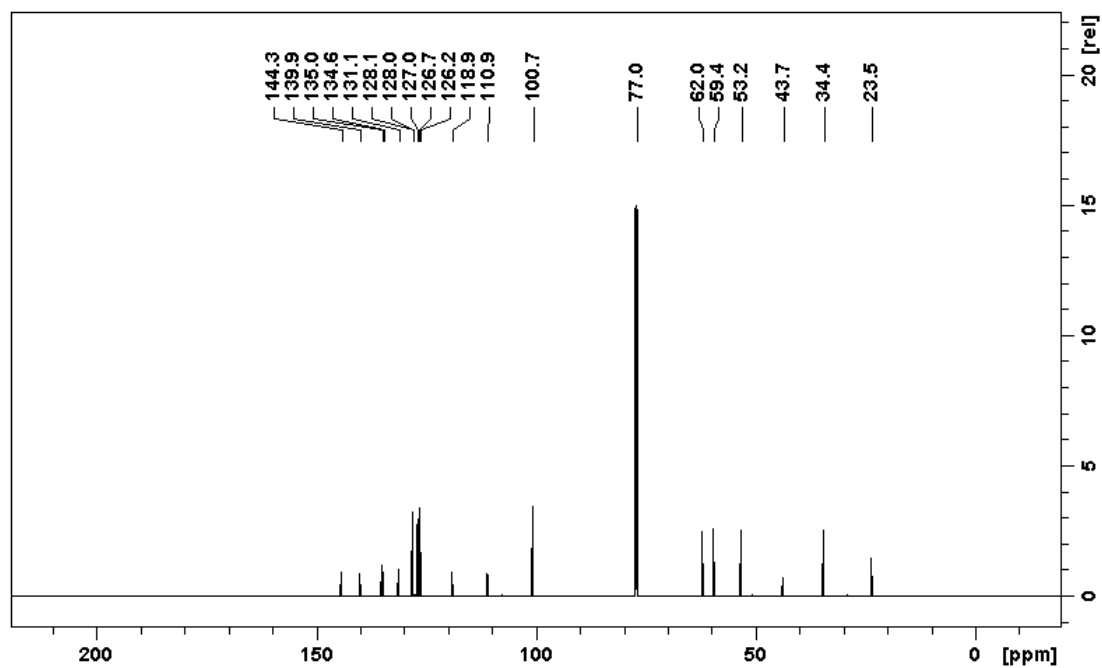


Figure S12. 150 MHz ^{13}C NMR spectrum of stephalagine in chloroform-*d*.

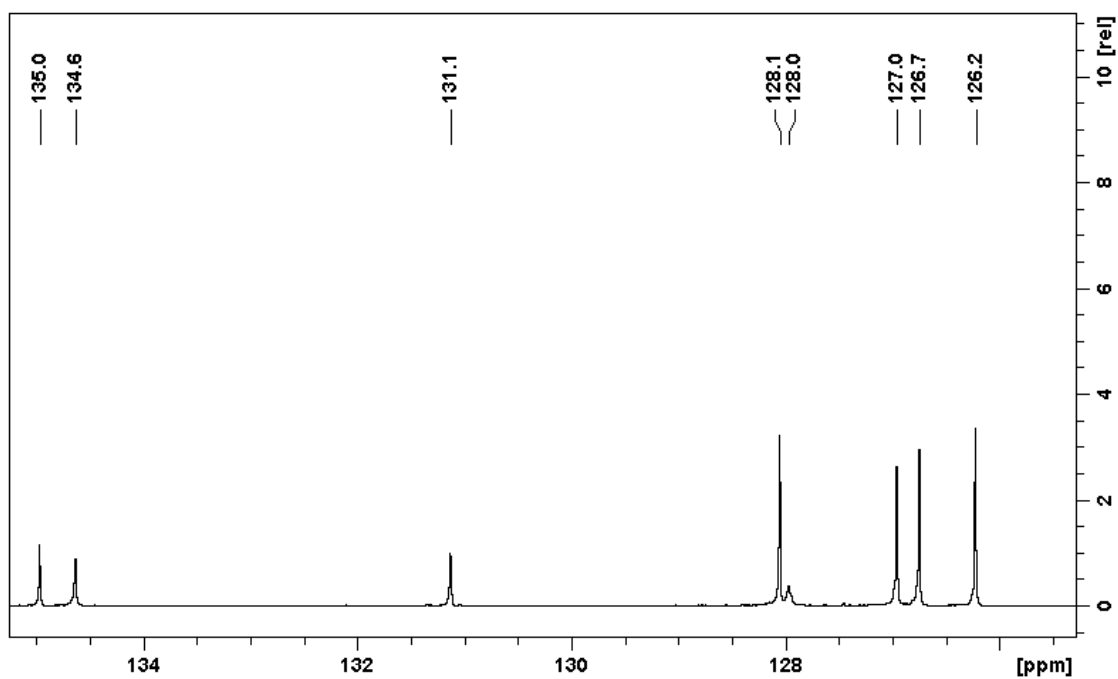


Figure S13. 150 MHz ^{13}C NMR spectrum (expansion δ 126.0–136.0) of stephalagine in chloroform-*d*.

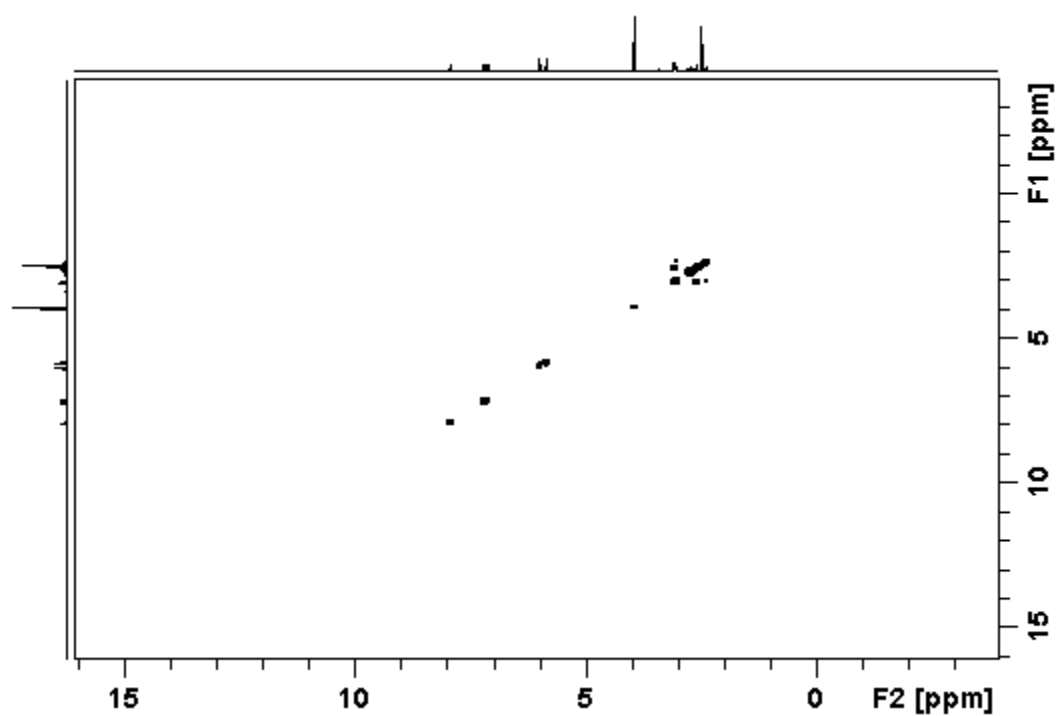


Figure S14. COSY spectrum of stephalagine in chloroform-*d*.

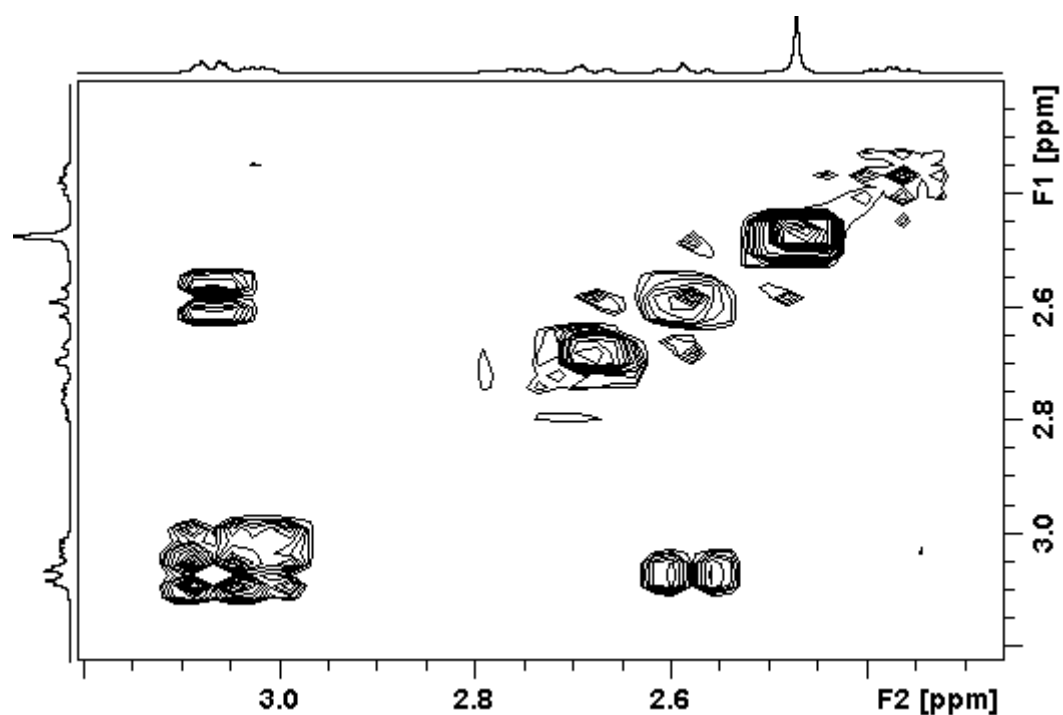


Figure S15. COSY spectrum (expansion δ 2.4–3.1) of stephalagine in chloroform-*d*.

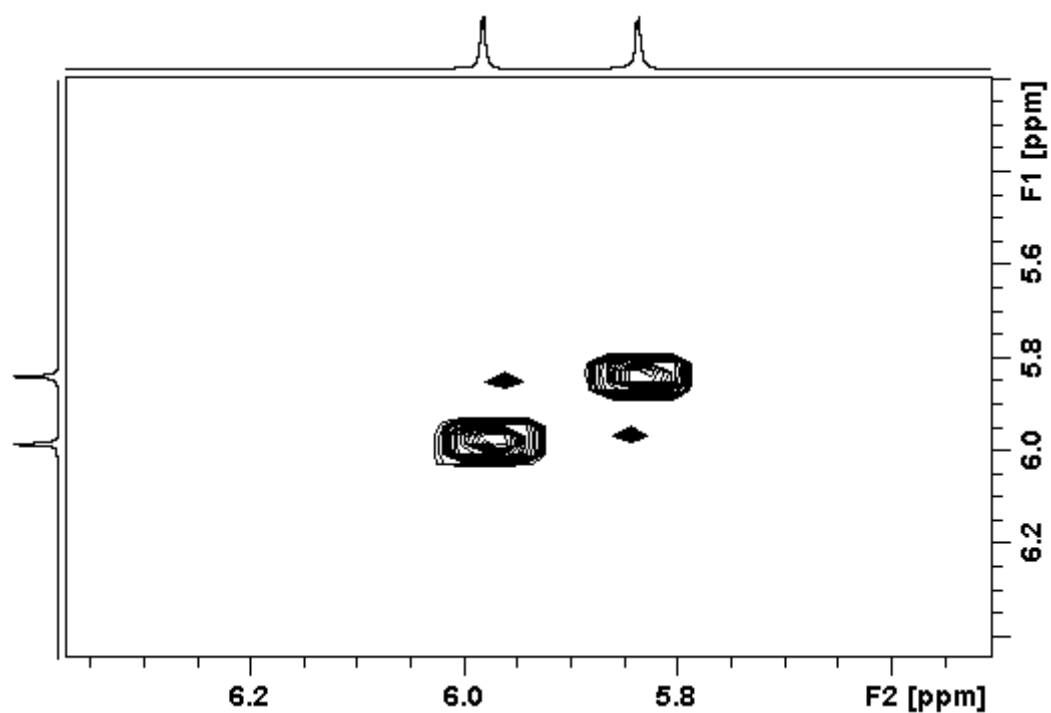


Figure S16. COSY spectrum (expansion δ 5.6–6.3) of stephalagine in chloroform-*d*.

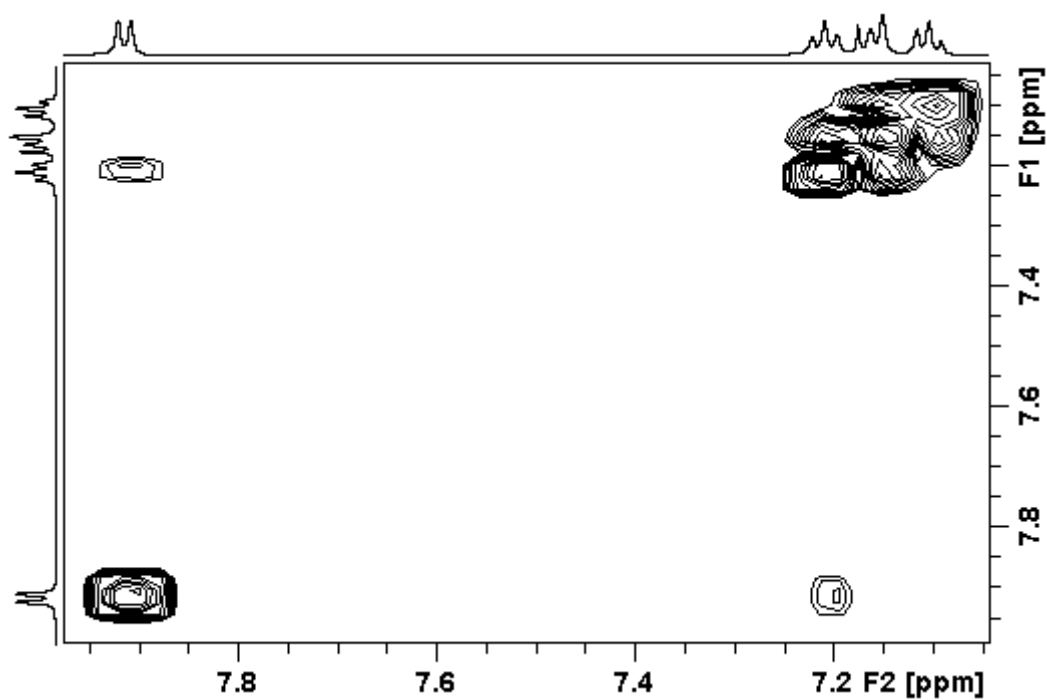


Figure S17. COSY spectrum (expansion δ 7.0–8.0) of stephalagine in chloroform-*d*.

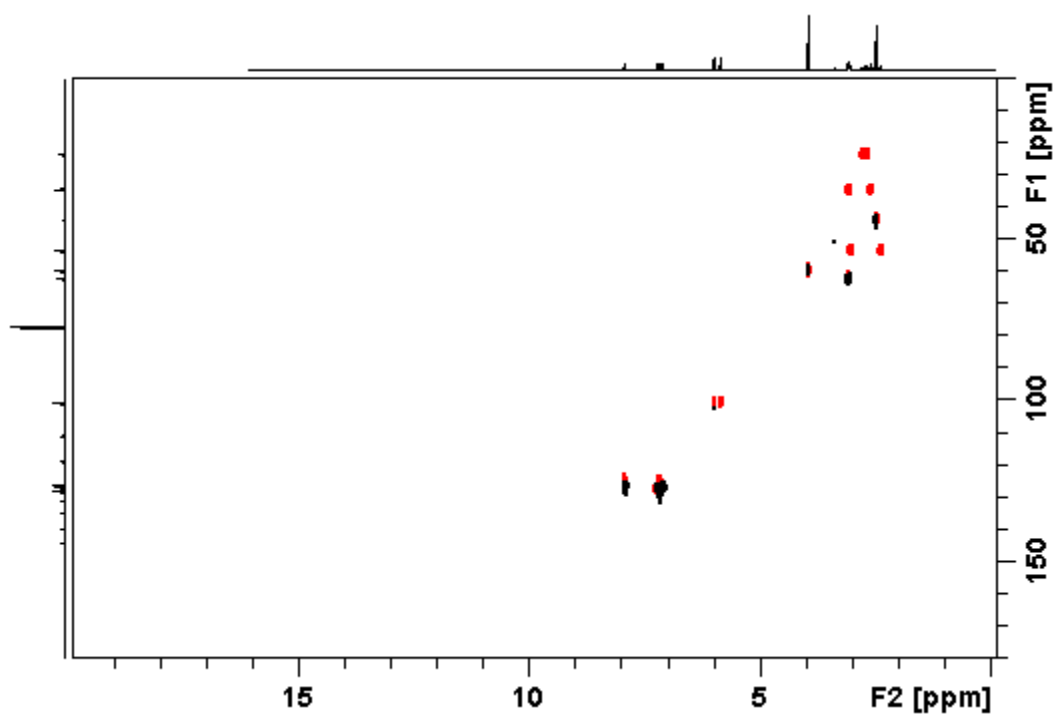


Figure S18. HSQC spectrum of stephalagine in chloroform-*d*.

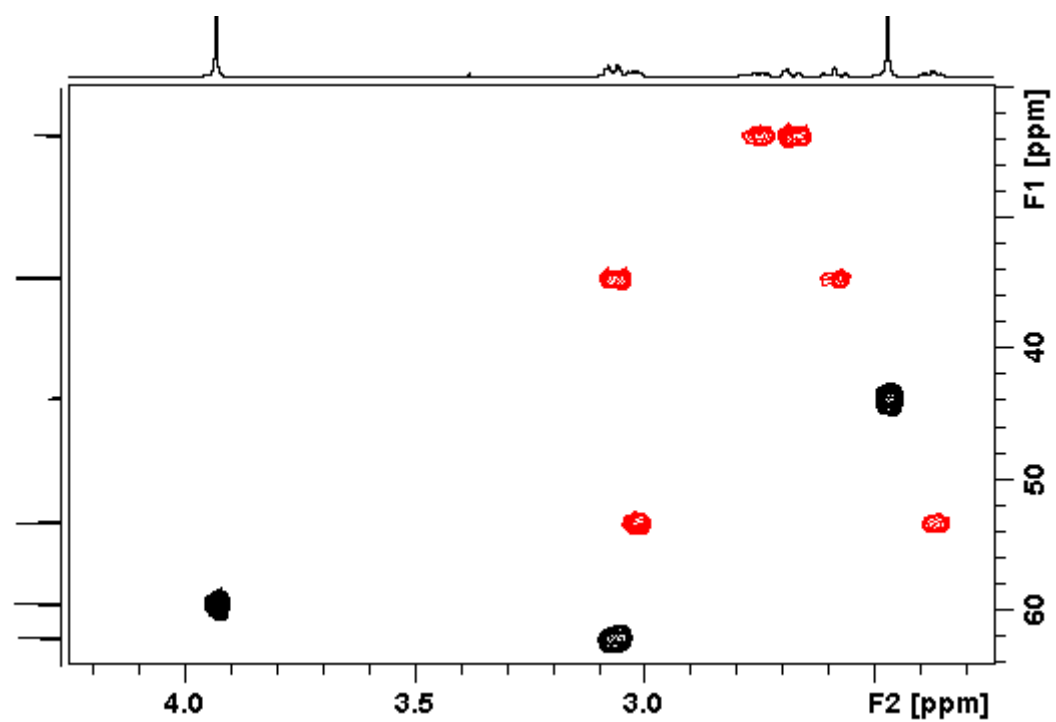


Figure S19. HSQC spectrum (expansion δ 2.0–4.5) of stephalagine in chloroform-*d*.

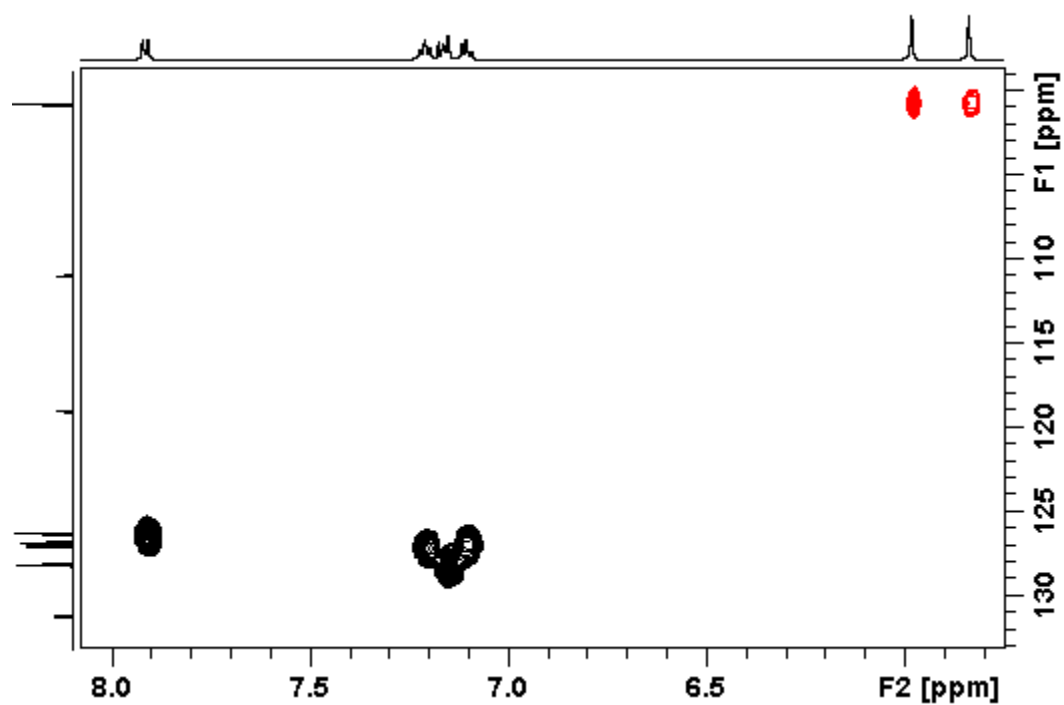


Figure S20. HSQC spectrum (expansion δ 4.5–8.2) of stephalagine in chloroform-*d*.

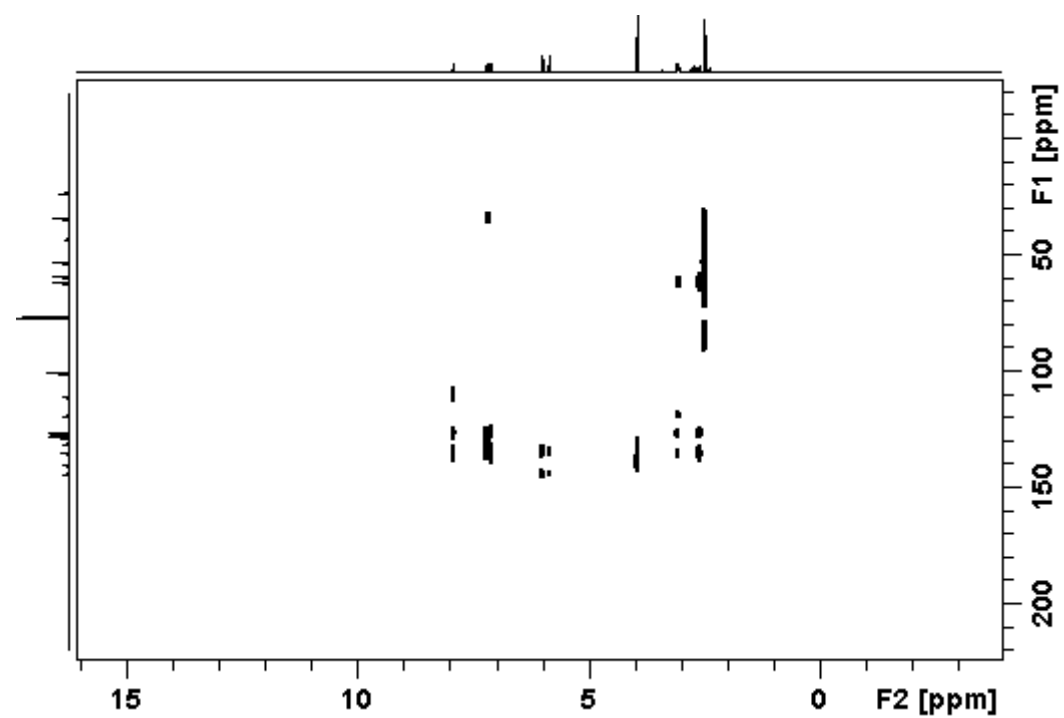


Figure S21. HMBC spectrum of stephalagine in chloroform-*d*.

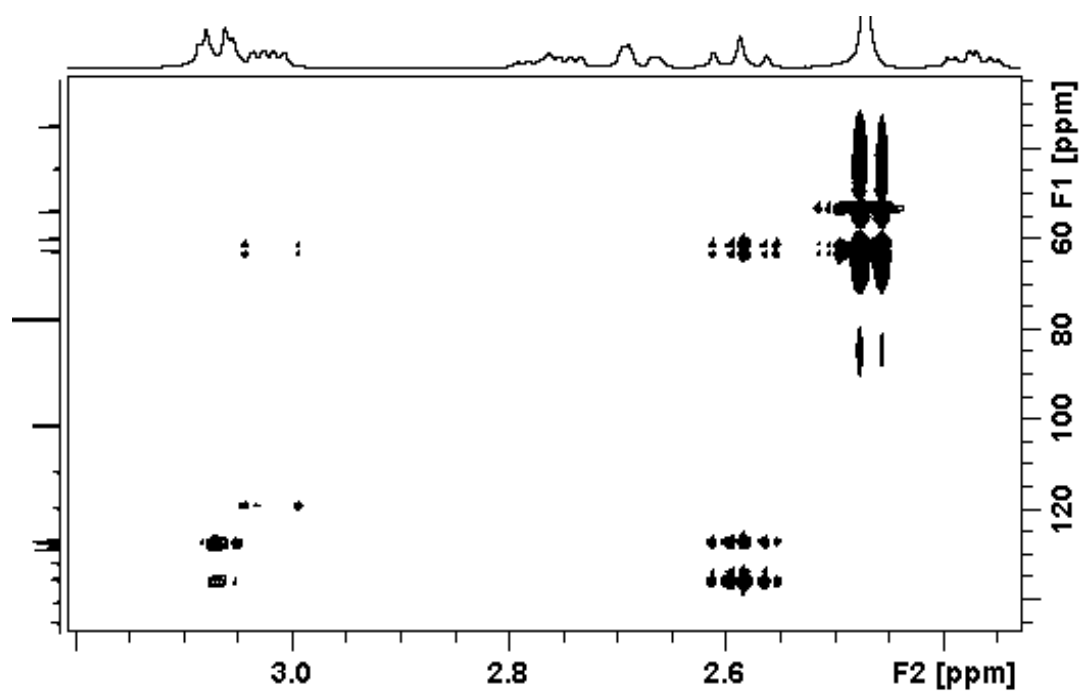


Figure S22. HMBC spectrum (expansion δ 2.3–4.0) of stephalagine in chloroform-*d*.

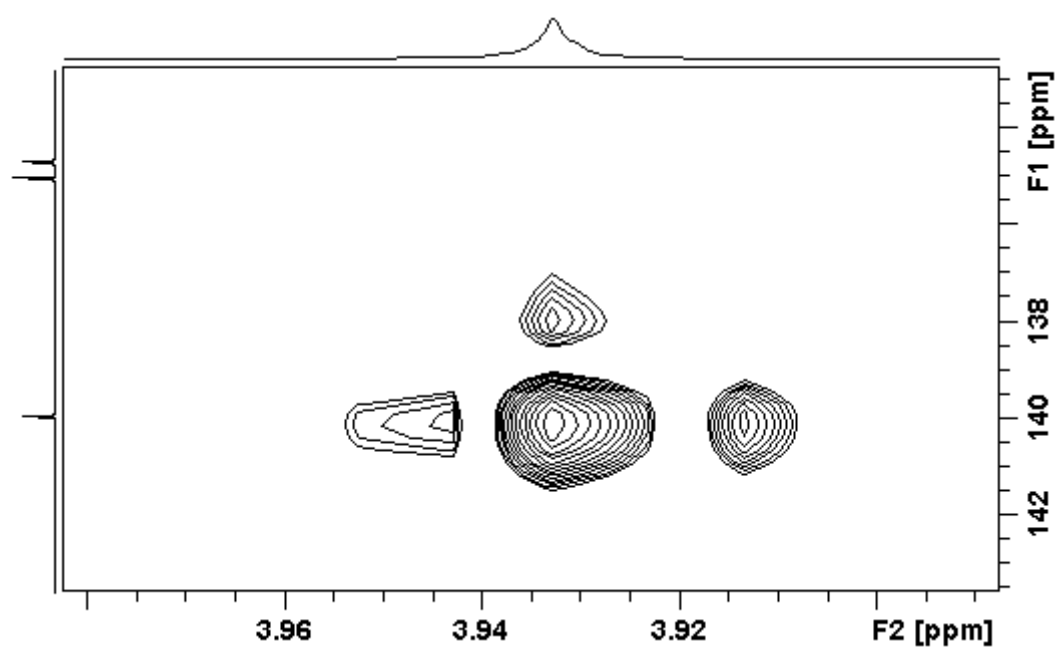


Figure S23. HMBC spectrum (expansion δ 3.9–4.0) of stephalagine in chloroform-*d*.

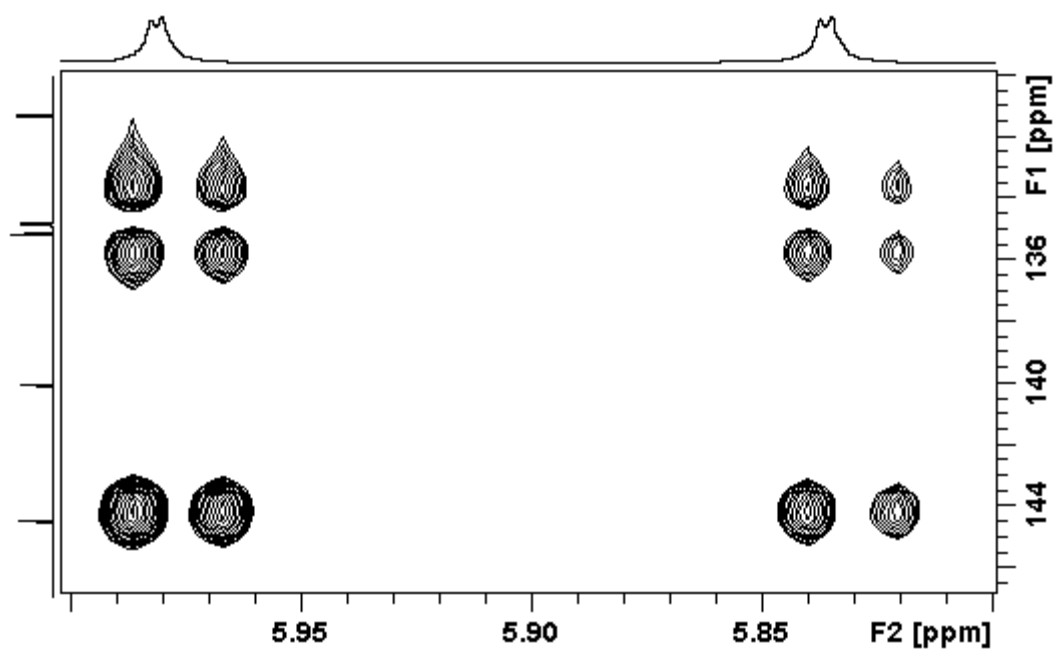


Figure S24. HMBC spectrum (expansion δ 5.8–6.0) of stephalagine in chloroform-*d*.

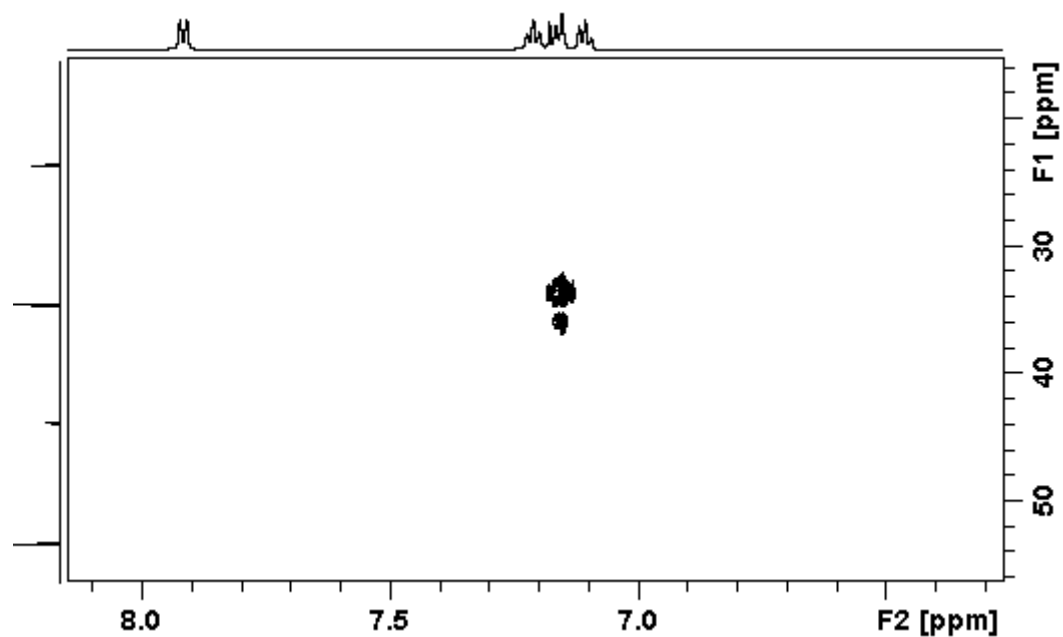


Figure S25. HMBC spectrum (expansion δ 6.8–8.2) of stephalagine in chloroform-*d*.

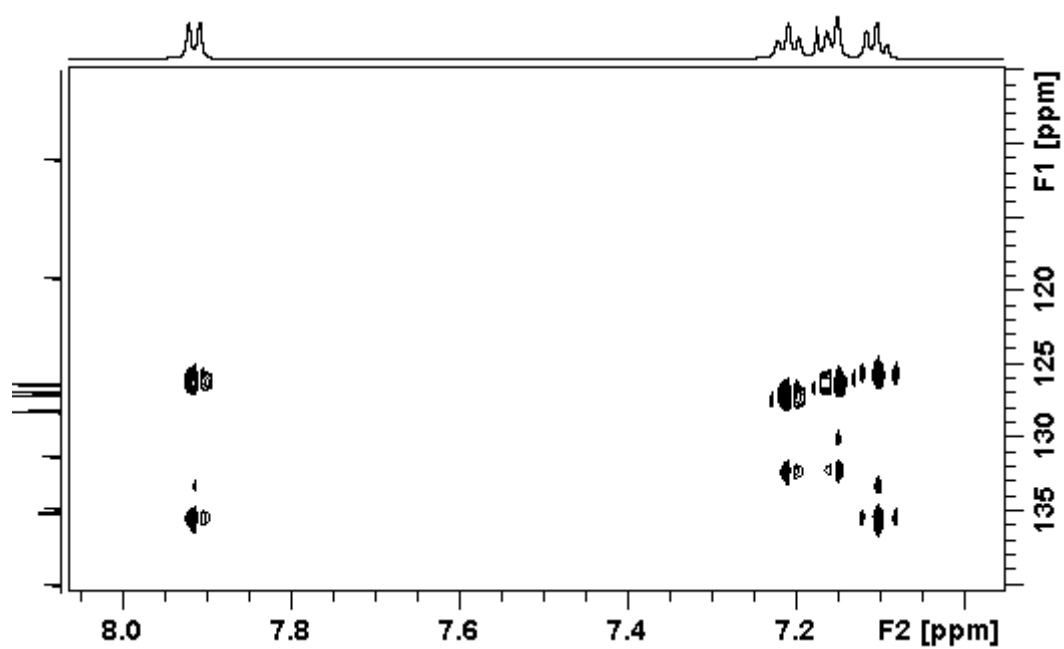


Figure S26. HMBC spectrum (expansion δ 7.0–8.1) of stephalagine in chloroform-*d*.

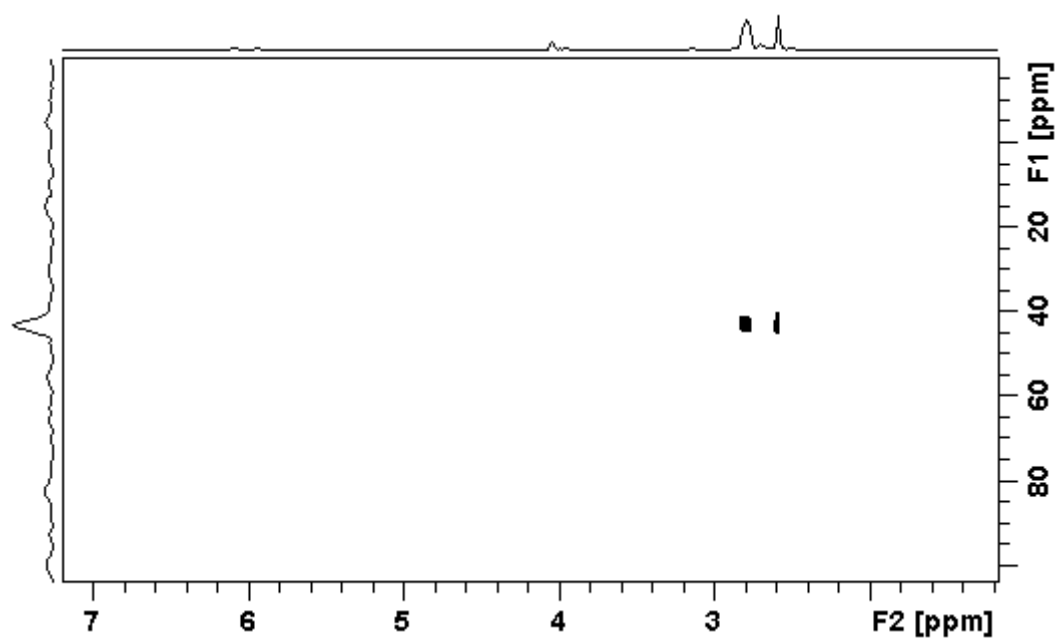


Figure S27. HMBC-¹⁵N spectrum of stephalagine in chloroform-*d*.