



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CHARLES FERNANDES DOS SANTOS SIMÕES

***Perfil Fitoquímico e Estudo das Atividades Antimicrobiana, Citotóxica e Anti-
Inflamatória de Annona muricata L.***

RECIFE, 2015

CHARLES FERNANDES DOS SANTOS SIMÕES

***Perfil Fitoquímico e Estudo das Atividades Antimicrobiana, Citotóxica e
Anti- Inflamatória de Annona muricata L.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Bioativos.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Nelly Caetano Pisciotano

Co-orientador: Prof. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

RECIFE, 2015

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S593p

Simões, Charles Fernandes dos Santos.

Perfil fitoquímico e estudo das atividades antimicrobiana, citotóxica e anti- inflamatória de annona muricata L. / Charles Fernandes dos Santos Simões. – 2015.

97 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria Nelly Caetano Pisciotano.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2015.

Inclui referências.

1. Annona. 2. Citotoxicidade. 3. Antimicrobiana. 4. Inflamação. I. Pisciotano, Maria Nelly Caetano (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-266)

CHARLES FERNANDES DOS SANTOS SIMÕES

Perfil Fitoquímico e Estudo das Atividades Antimicrobiana, Citotóxica e Anti-inflamatória de *Annona muricata* L.

Dissertação apresentada ao Programa de pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 11/09/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Nelly Caetano (Presidente e Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Karina Perrelli Randau (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Jaciana dos Santos Aguiar (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

SUB-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

***COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS***

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

***VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS***

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

*Dedico este trabalho a minha avó materna Maria
José Costa dos Santos (Dedé) que nos deixou
recentemente. Que ela possa contribuir mais
significativamente onde ela está hoje que já o fez
comigo aqui. Que ela continue rogando a Deus
por mim como ela já o fizera em vida.*

AGRADECIMENTOS

A princípio agradeço ao Deus Todo-Poderoso manifestado na Santíssima Trindade que me concedeu a graça de realizar este trabalho. Me foi um preciosíssimo refúgio nos momentos de angústia e profunda tristeza, demonstrando Seu grandioso Amor.

A minha família, sobretudo a meus pais, Fernando Simões e Roselma Lúcia, meus irmãos Shirley Simões e Douglas Simões e meus avós Vanildo dos Santos e Maria José (*in memoriam*) pelo companheirismo e união, me fazendo compreender mais profundamente o significado de uma família.

A minha namorada, Iara Vilela de Almeida, por compartilhar todos os momentos, desde a seleção do mestrado, até nos momentos mais difíceis e sombrios, demonstrando um companheirismo sem igual e uma presença indispensável em todos os momentos.

A minha orientadora, Nelly Caetano, pela disponibilidade em orientar, pelas conversas, pelas ligeiras discussões e ensinamentos.

Aos meus colegas de laboratório, Danilo Araújo, Felipe Coutinho, Marcos Saraiva, que contruíram grandiosamente pelo desenvolvimento do projeto, sem eles este novato aqui não teria para onde ir.

A equipe do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental liderada pela Professora Teresinha Gonçalves da Silva a qual se disponibilizou para co-orientar este projeto disponibilizando sua equipe e instalações para o desenvolvimento de parte dele, especialmente a Professora Gardênia Militão e os alunos Larissa, Jaciana e Carlson Junior..

A equipe do Laboratório de Farmacognosia, sobretudo a Professora Karina Randau, e sua equipe, Rafaela Sá, Rafaela Ferreira, Alex Vasconcelos e Andréia Vidal pela essencial colaboração com a parte fitoquímica do projeto.

Ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos liderado pelo Professor Pedro Rolim que disponibilizou tempo e equipamentos para o desenvolvimento de parte do trabalho, especialmente a Lourenço que se disponibilizou para ajudar neste queisto.

A equipe do Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada à Fármacos (LaSOF), especialmente o Professor Rodolfo de Faria e sua equipe, Charles Mendes, Ronmilson Marques, Natanael Bezerra, Lucas Silva, Adriano Vieira, Marlene Saraiva e tantos outros que ajudaram em diversos momentos do projeto e contruíram uma grande amizade com memoráveis momentos de conversas e cafés.

A meus amigos que fizeram parte deste projeto, desde os colegas de mestrado até aqueles que se fizeram mais presentes nesta caminhada tais como Daniel Castelo Branco,

Ellison Neves, Gevanio Filho, João Pontes, César Amorim e Allan Chernichiarro.

A equipe do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, sobretudo a Nerilin Trajano, que ajudou de maneira consistente em todas as necessidades envolvendo o curso.

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação por ter concedido uma bolsa de mestrado, valorizando o andamento do projeto.

“O amor não é um sentimento, é um modo de ser. É um juramento interior de defender o ser amado até à morte, mesmo quando ele peca gravemente contra você. O amor é mesmo, como dizia Jesus, morrer pelo ser amado. Quando a gente espera que o amor torne a nossa vida mais agradável, em vez de sacrificar a vida por ele, a gente fica sem o amor e sem a vida. O amor é o mais temível dos desafios, porém, quando você o conhece, não quer outra coisa nunca mais”.

Olavo de Carvalho

RESUMO

Nos últimos anos, novos desafios têm surgido para os pesquisadores no âmbito das ciências médicas; sobretudo, destacam-se: a procura por novas terapias contra câncer, a busca por novos agentes anti-inflamatórios que não apresentem as reações adversas típicas e o combate à multirresistência microbiana. *Annona muricata* L. (Annonaceae), conhecida vulgarmente como gravioleira e na medicina popular, tem sido empregado no tratamento de inflamações, febres, infecções e diabetes. Além disso, tem demonstrado ser potencialmente eficaz na terapia contra o câncer. Com base nisso, objetivou-se, nesse trabalho, analisar o perfil fitoquímico de extratos obtidos das folhas de *A. muricata* L. e executar uma triagem farmacológica visando a avaliação do seu potencial antimicrobiano, citotóxico e anti-inflamatório. Primeiramente, foi realizada a extração das folhas de *A. muricata* L., utilizando os solventes hexano, acetato de etila, etanol e água, através da técnica de Soxhlet e obteve-se como respostas os respectivos rendimentos (3,37%, 3,20%, 6,22% e 9,09%). Em seguida, através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), foram identificados os grupos de metabólitos secundários. Posteriormente, avaliou-se a atividade antimicrobiana dos quatro diferentes extratos em questão frente a cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e de fungos leveduriformes, assim como as atividades citotóxicas frente à três diferentes linhagens de células tumorais e as atividades anti-inflamatórias através da avaliação da produção de óxido nítrico (NO). A triagem fitoquímica revelou a presença de mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides, flavanoides, taninos, cumarinas e alcaloides. Os extratos hexânico e acetato de etila não apresentaram atividade frente às cepas testadas, já os extratos etanólico e aquoso exibiram atividade frente a cepas Gram-positivas, com halos de 19 mm frente a *Micrococcus luteus*, para o extrato etanólico, e 18 mm frente a *Staphylococcus coagulase-negativa* para o extrato aquoso, e em algumas Gram-negativas, 11 mm frente a *Proteus mirabilis* para o extrato etanólico, porém sem atividade frente aos fungos. A respeito da atividade citotóxica, todos os extratos apresentaram atividades inibitórias frente às linhagens testadas, sobretudo a linhagem HEp-2 onde todos apresentaram inibição de 100% na concentração avaliada. A ação anti-inflamatória dos extratos também foi efetiva, todos os extratos analisados reduziram a produção de NO induzida a níveis basais em todas as concentrações estudadas, especialmente os extratos etanólico e aquoso. Pode-se considerar que *A. muricata* trata-se de uma opção para a busca de novos agentes terapêuticos e como fonte de moléculas de grande interesse científico. Os resultados corroboraram com o seu uso tradicional, reforçando mais ainda sua comprovação científica a respeito de suas propriedades, possibilitando assim maiores estudos para a sua viabilidade terapêutica.

Palavras-chave: *Annona*. Citotoxicidade. Antimicrobiana. Inflamação.

ABSTRACT

In the recent years, new challenges have arisen for researchers in the field of medical science such as the quest for new therapies against cancer, the search for new anti-inflammatory agents that do not represent the typical adverse reactions and also the struggle against microbial multidrug resistance. *Annona muricata* L. (Annonaceae), commonly known as soursop and famous for its therapeutic properties in folk medicine, has been employed in the treatment of inflammations, fevers, infections and diabetes. Moreover, it has shown to be potentially effective in cancer therapy. On this basis, the goal of this work was to analyze the phytochemical profile of extracts obtained from the leaves of *A. muricata* L. and run a pharmacological screening aimed at assessing its antimicrobial, cytotoxic and anti-inflammatory potential. Firstly, the extraction process was employed in the leaves of *A. muricata* L., using several solvents such as hexane, ethyl acetate, ethanol and water by Soxhlet extractor and were obtained their respective yields as responses (3.37%, 3.20%, 6.22% and 9.09%). Then, through Thin Layer Chromatography (TLC), the groups of secondary metabolites were identified. Subsequently, the four different extracts were evaluated concerning the antimicrobial activity against strains of Gram-positive bacteria, Gram-negative, and yeast fungi, as well as the cytotoxic activity against three different tumor cell lines and also the anti-inflammatory activities by assessing the production of nitric oxide (NO). The phytochemical screening revealed the presence of mono and sesquiterpenes, triterpenes and steroids, flavonoids, tannins, alkaloids and coumarins. The hexane extracts and ethyl acetate showed no activity against the strains tested, since the ethanol and aqueous extracts showed activity against Gram-positive strains, with halos of 19 mm against *Micrococcus luteus* for ethanolic extract, and 18 mm against *Staphylococcus coagulase-negative* for the aqueous extract, and in some Gram-negative strains, 11 mm against *Proteus mirabilis* for the ethanolic extract, but without activity against the yeasts. Regarding the cytotoxic activity, all extracts showed inhibitory activities across the tested strains, especially Hep-2 line where all showed inhibition of 100% in the assessed concentration. The anti-inflammatory action of the extracts was also effective, since all analyzed extracts reduced NO production induced levels at all the concentrations studied, especially ethanol and aqueous extracts. It can be considered that *A. muricata* is an alternative to the search for new therapeutic and as a source of great scientific interest molecules agents. The results corroborate with its traditional use, further strengthening its scientific evidence regarding their properties, thus enabling further study for its therapeutic viability.

Key-words: *Annona*. Citotoxicity. Antimicrobial. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ESTADO DA ARTE

Figura 1 - Distribuição da família <i>Annonaceae</i> no mundo.....	19
Figura 2 - <i>Annona muricata</i> L. (graviroleira) em seu habitat natural.....	27
Figura 3 - Alcaloide Reticulina	32
Figura 4 - Acetogeninas anonáceas.	33

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 5 - Efeito do extrato Ext-Hex- <i>Am</i> sobre os níveis de óxido nítrico no exsudato inflamatório.	76
Figura 6 - Efeito do extrato Ext-AcOEt- <i>Am</i> sobre os níveis de óxido nítrico no exsudato inflamatório.	76
Figura 7 - Efeito do extrato Ext-EtOH- <i>Am</i> sobre os níveis de óxido nítrico no exsudato inflamatório.	77
Figura 8 - Efeito do extrato Ext-H ₂ O- <i>Am</i> sobre os níveis de óxido nítrico no exsudato inflamatório.	77

LISTA DE TABELAS

ESTADO DA ARTE

Tabela 1 - Distribuição geográfica, nome popular e etnofarmacologia de <i>Annona muricata</i> L.	25
--	----

METODOLOGIA

Tabela 2 - Sistemas cromatográficos, padrões e reveladores empregados na prospecção fitoquímica de <i>Annona muricata</i> L.	54
Tabela 3 - Cepas de bactérias Gram-positivas utilizadas nos ensaios e suas respectivas origens.	55
Tabela 4 – Cepas de bactérias Gram-negativas utilizadas nos ensaios e suas respectivas origens.	55
Tabela 5 - Fungos leveduriformes utilizados nos ensaios e suas respectivas origens.	56
Tabela 6 - Origem das linhagens celulares utilizadas no ensaio de atividade citotóxica	58

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 7 - Prospecção fitoquímica dos extratos de <i>Annona muricata</i> L.	61
Tabela 8 - Atividade antimicrobiana do Extrato Etanólico de <i>Annona muricata</i> L. frente cepas padrão e de interesse clínico.	68
Tabela 9 - Atividade antimicrobiana do Extrato Aquoso de <i>Annona muricata</i> L. frente cepas padrão e de interesse clínico.	71
Tabela 10 - Resultados da Atividade Citotóxica dos Extratos das Folhas de <i>Annona muricata</i> L. expressos em porcentagem de inibição da viabilidade celular.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
AINES	Anti-inflamatórios não-esteróides
AM	Coleção do laboratório de análises microbiológicas
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American type culture collection
CCD	Cromatografia em camada delgada
CMI	Concentração mínima inibitória
COX	Ciclo-oxigenase
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
EtOH	Etanol
Ext-Hex-Am	Extrato hexânico de <i>Annona muricata</i> L.
Ext-AcOEt-Am	Extrato acetato de etila de <i>Annona muricata</i> L.
Ext-EtOH-Am	Extrato etanólico de <i>Annona muricata</i> L.
Ext-H ₂ O-Am	Extrato aquoso de <i>Annona muricata</i> L.
H ₂ O	Água
HEp-2	Linhagem de carcinoma epidermóide de laringe humana
HL-60	Linhagem celular de leucemia pró-mielocítica
HOOH	Ácido fórmico
KOH	Hidróxido de potássio
NCI H292	Linhagem de carcinoma de pulmão
NEU	Difenilboriloxietilamina
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% das células
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IPA	Instituto agrônômico de Pernambuco

HDL	Lipoproteína de alto peso molecular
ITU	Infecção do trato urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LDL	Lipoproteína de baixo peso molecular
LD ₅₀	Dosagem letal para 50% da população estudada
LPS	Lipopolissacarídeo
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
MTH	Monotetrahidrofurano
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SCT	Síndrome do choque tóxico
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozocina
THF-bis	bis-tetra-hidrofurano
TGO	Transaminase oxaloacética
TGP	Transaminase pirúvica
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidade de terapia intensiva
UV	Ultravioleta
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária a vancomicina
VLDL	Lipoproteína de baixíssimo peso molecular
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	OBJETIVOS.....	18
2.1.	Objetivo geral	18
2.2.	Objetivos específicos	18
3.	ESTADO DA ARTE	19
3.1.	Família <i>Annonaceae</i>	19
3.2.	Botânica	27
3.3.	Fitoquímica.....	30
3.4.	Atividades Farmacológicas.....	35
3.4.1.	<i>Atividade Antiproliferativa e Citotóxica</i>	35
3.4.2.	<i>Atividade Antibacteriana</i>	37
3.4.3.	<i>Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória</i>	38
3.4.4.	<i>Atividade Antioxidante</i>	39
3.4.5.	<i>Atividade Antiparasitária</i>	40
3.4.6.	<i>Atividade Hipoglicemiante</i>	42
3.4.7.	<i>Atividade Inseticida</i>	42
3.4.8.	<i>Outras Atividades</i>	43
3.5.	Estudos de Toxicidade	45
3.6.	Microorganismos de Interesse Clínico	47
3.6.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	48
3.6.2.	<i>Staphylococcus coagulase negativo (SCN)</i>	49
3.6.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
3.6.4.	Família <i>Enterobacteriaceae</i>	51
3.6.5.	<i>Candida sp.</i>	52
4.	METODOLOGIA	54
4.1.	Material vegetal.....	54
4.1.1.	<i>Procedimentos extrativos</i>	54
4.1.2.	<i>Análise Fitoquímica</i>	54
4.2.	Atividade antimicrobiana.....	55
4.2.1.	<i>Linhagens microbianas</i>	55
4.2.2.	<i>Preparação dos inóculos</i>	57

4.2.3.	<i>Preparação dos padrões antimicrobianos e dos extratos</i>	57
4.2.4.	<i>Técnica de poços / Difusão em Ágar</i>	57
4.2.5.	<i>Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) por Microdiluição em caldo</i> .	58
4.3.	Atividade Citotóxica	59
4.4.	Atividade Anti-Inflamatória	60
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1.	Prospecção Fitoquímica.....	61
5.2.	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Annona muricata</i> L.	63
5.3.	Estudos de Atividade Citotóxica dos extratos de <i>Annona muricata</i> L.	72
5.4.	Resultados da Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória dos extratos de <i>Annona muricata</i> L.	75
6.	CONCLUSÃO	80
6.1.	Perspectivas	81
	REFERÊNCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, a utilização de novas formas de tratamento de enfermidades, sobretudo de doenças sobre as quais a terapêutica convencional tem encontrado diversas dificuldades, tem sido buscada. Essa necessidade de encontrar novos meios para a obtenção de novos produtos terapêuticos tem levado muitas pessoas, desde pesquisadores a população em geral, a optar pelas plantas medicinais. Isto, principalmente, devido a grande biodiversidade e a facilidade de acesso bem como de seu baixo custo (GILANI; ATTA-UR-RAHMAN, 2005; HEINRICH; GIBBONS, 2001).

O Brasil trata-se de um país possuidor de um gigantesco ecossistema, possuindo uma grande biodiversidade em todo seu território espalhada em diversos biomas. Entretanto, mesmo com uma enorme variedade de espécies nativas, muitas destas ainda não foram submetidas a pesquisas e ensaios mais detalhados. Em muitos casos, o uso de tais produtos é feito por métodos tradicionais, através do conhecimento popular adquirido de uma mescla das tradições indígenas nativas e as trazidas pelos colonos europeus. Muitos dos estudos tendo como modelos plantas medicinais tomaram partida através desse conhecimento, sendo este o campo de estudo da etnofarmacologia. Porém, a falta de padronização e de acompanhamento técnico-científico põe em risco as pessoas que costumam adquirir e utilizá-los, pois apesar de serem substâncias encontradas na natureza, não estão isentas de risco à saúde (BRANDÃO et al., 2008; VALLI et al., 2013).

Diversas plantas possuem propriedades terapêuticas que acabam criando uma identidade terapêutica para si, dentre elas, *Annona muricata* L. (*Annonaceae*), conhecida popularmente como graviola, esta é reconhecida por suas propriedades terapêuticas, há relatos de seu uso para o tratamento da inflamação, de febre, infecções, diabetes, porém destaca-se a sua ação na terapia contra o câncer (BADRIE; SCHAUSS, 2010; LUZIA; JORGE, 2012; TAKAHASHI et al., 2006).

Nos últimos anos novos desafios surgiram para as áreas das ciências médicas, especialmente tratando-se da terapia do câncer. Porém alguns estudos, especialmente na área da biologia molecular têm buscado elucidar todo o mecanismo por trás da ação das células neoplásicas, sobretudo entender os mecanismos de indução de sua apoptose. Assim criando novos alvos para o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos (PAPAC, 2001; ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

Além deste, outro problema que vem há anos desafiando os pesquisadores é a multirresistência microbiana. Pois o uso exacerbado de antibióticos pela população, geralmente de modo indiscriminado, proporciona aos microorganismos a gerarem mecanismos que garantem sua sobrevivência no ambiente biológico onde se encontram. Ocasionalmente assim maiores problemas, principalmente na saúde pública onde ocorrem maiores gastos com internação de pacientes que contraíram tais infecções, bem como de gastos com antibióticos de última geração correndo o risco de desenvolver resistência a esses medicamentos (BANDOW et al., 2003; WESTH; ZINN; ROSDAHL, 2004).

A terapia anti-inflamatória está centrada no controle dos sinais cardinais da inflamação (SERHAN et al., 2007). Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), utilizados atualmente, agem tipicamente no alívio da inflamação e da dor. Contudo, muitos dos agentes anti-inflamatórios utilizados são cada vez menos aceitáveis devido às reações adversas graves, tais como a intolerância gástrica, depressão da medula óssea e de retenção de água e sal, resultante de uma utilização prolongada (LIMA et al., 2011).

A partir de tais pressupostos, há a necessidade de estudos que visem identificar e caracterizar as ações farmacológicas de novos produtos, em especial os de origem natural obtidos de plantas, sendo norteados pelo conhecimento tradicional. Assim, este trabalho buscou realizar um estudo do perfil fitoquímico e farmacológico dos extratos das folhas de *A. muricata* L.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Efetuar uma triagem farmacológica para avaliar o potencial antimicrobiano, citotóxico e anti-inflamatório de extratos obtidos das folhas de *Annona muricata* L.

2.2. Objetivos específicos

- Obter os extratos das folhas de *Annona muricata* L.: hexano, acetato de etila, etanol e água;
- Descrever o perfil fitoquímico para a caracterização de seus metabólitos secundários;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos aquoso, etanólico, acetato de etila e hexânico das folhas de *Annona muricata* L. frente a microorganismos ATCC e isolados clínicos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes;
- Verificar possíveis atividades citotóxicas *in vitro* dos extratos aquoso, etanólico, acetato de etila e hexânico das folhas de *Annona muricata* L. frente a diferentes linhagens celulares;
- Estudar a ação anti-inflamatória dos extratos aquoso, etanólico, acetato de etila e hexânico das folhas de *Annona muricata* L. avaliando seus efeitos na liberação de óxido nítrico (NO).

3. ESTADO DA ARTE

3.1. Família *Annonaceae*

A família *Annonaceae* trata-se de uma grande família de dicotiledôneas constituída por árvores frutíferas de médio porte encontradas em regiões tropicais e subtropicais (LEBOEUF et al., 1980; PINTO et al., 2005). O número de gêneros e espécies da família *Annonaceae* ainda é debatido. Bailey (1949) descreveu que esta família possui em torno de 46 gêneros e entre 500 e 600 espécies, enquanto Geurts (1981), descreveu que ele contém 119 gêneros e mais de 2000 espécies, a maioria dos quais são arbustos e árvores pequenas. Já Alali et al. (1999) descreveram que a família *Annonaceae* possui cerca de 130 gêneros e 2300 espécies distribuídas amplamente em diversas regiões tropicais e subtropicais do planeta, as quais incluem a África, Austrália, Ásia e grande parte do continente americano (FIGURA 1). Um número limitado de espécies produzem frutos comestíveis, incluindo muitos que se reuniram no meio natural, e alguns que foram domesticadas (PINTO et al., 2005).

Figura 1- Distribuição da família *Annonaceae* no mundo.



Fonte: <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/maps/annonaceae.gif>>.
Acessado em 07 mai 2015.

Dentre os gêneros abrangidos por esta família, destacam-se *Annona*, *Rollinia* e *Duguetia*, os quais possuem uma grande importância econômica devido a produção de frutos comestíveis. O gênero *Annona* possui um especial destaque, pois além de possuir

mais de 50 espécies, também é caracterizada por seu grande valor comercial (SACRAMENTO et al., 2003), a palavra “*annona*” deriva do latim que significa “colheita anual” (LIZANA; REGINATO, 1990). O gênero apresenta inúmeras características unificadoras, especialmente em relação à altura da planta, sistema de raiz, casca, caule, biologia floral, polinização, frutificação e tipo de fruto (GEURTS, 1981). Existem variações importantes entre mudas de *annonas* nas mesmas espécies, que afetam não só a folhagem madura e produtividade das plantas, mas também o tamanho dos frutos, sua forma, cor, qualidade e número de sementes no fruto. Estas variações são muitas vezes pronunciadas o suficiente para ter resultado em vários nomes botânicos para a mesma espécie.

Em geral, as anonas são arbustos ou árvores pequenas, cuja altura varia de 5 a 11 m, dependendo de vários fatores, como espécie, clima, solo e manejo da cultura. Elas são um pouco eretas ou espalhando-se em hábito, com casca marrom-acizentada, muitas vezes áspera e ondulada (PINTO et al., 2005). Geralmente suas hastes são ferruginosas a acinzentadas, tornando-se glabra quando em estado de amadurecimento. Com poucas exceções, anonas são caducifólias, até mesmo espécies tropicais, especialmente quando cultivadas em áreas com estações secas ou frescas e sem irrigação.

O sistema radicular tem raízes laterais finas e abundantes uma raiz principal que não é tão forte como em outras fruteiras tropicais, como manga (*Mangifera indica* L.). A raiz principal de uma árvore adulta de graviola pode atingir de 1,5 a 1,8 m de profundidade em latos solos do ecossistema Cerrado (savana brasileira) no Brasil Central (PINTO; SILVA, 1994).

O número de nomes comuns é grande para algumas das espécies, e precisam ser utilizados com precaução, pois alguns nomes podem ser aplicados a duas ou mais espécies em diferentes países, ou mesmo em diferentes regiões do mesmo país. Claramente, portanto, as descrições botânicas são essenciais para pesquisadores, estudantes e produtores para distinguir uma espécie de outra. A confusão de identidades entre anonas botanicamente semelhante é relativamente frequente. Por exemplo, atemóia (um híbrido entre cherimóia e pinha) foi erroneamente chamada pinha por muitos anos (MORTON, 1987), quando este nome refere-se mais adequadamente para *A. reticulata*. A cherimóia às vezes é confundida com *A. glabra* e *A. montana* tem sido confundido por alguns produtores brasileiros com *A. muricata*. De acordo com Geurts (1981), das 119 espécies descritas do gênero *Annona*, 109 são nativas da América tropical e 10 para a África tropical. Todas as espécies domesticadas são americanas, ao passo que uma espécie africana (*A. senegalensis*) é

provavelmente originada por processo de domesticação.

A gravioleira provavelmente se originou na América Central, Antilhas ou do Norte da América do Sul, e é encontrada nos vales andinos do Peru, presumivelmente como uma introdução antiga. Os colonizadores espanhóis distribuíram para outras regiões tropicais do mundo (POPENOE, 1974). A distribuição atual dessas cinco espécies abrange quase todos os continentes, com graviola e maçã açúcar mostrando a mais ampla distribuição, principalmente em regiões tropicais. Embora haja controvérsia sobre a origem da graviola, alguns autores (FOUQUÉ 1972; POPENOE, 1974) a atribuem sua origem dos Vales andinos do Equador, Peru e Chile, em altitudes de 1600 a 2000 m. Hermoso et al. (1999) sugeriram um centro secundário da diversidade na América Central, utilizando marcadores moleculares. A cultura da graviola é uma antiga prática caseira: algumas sementes foram identificadas em sítios arqueológicos no Peru e seus frutos são retratados em cerâmicas da Era pré-Inca (POPENOE, 1989). As populações selvagens podem ser encontradas no Equador, Peru e Bolívia, ao passo de que na área de Loja, sudoeste do Equador, aparenta ser um centro de diversidade da espécie selvagem (PINTO et al., 2005).

A existência de vários tipos selvagens de gravioleira na região amazônica sugere que este pode ser um centro de diversidade, mas os tipos poderiam ser originados de restos de cultivo. Populações selvagens de gravioleira são bem conhecidas nas Índias Ocidentais e no Panamá (MANICA, 1997; PINTO; SILVA, 1994).

No sudeste do Brasil, o cultivo da graviola fora introduzido durante o século XVI. Atualmente é encontrada em quase todos os estados brasileiros, exceto nos estados mais meridionais, onde temperaturas baixas e queda de neve ocasional não permitem que a árvore para crescer e produzir (PINTO; SILVA, 1994). A graviola é agora uma fruta popular em Cuba, México, América Central e na América do Sul. Ela também é encontrada em Sri Lanka até altitudes de 460 m, na China e em muitas partes da Polinésia. Nos Estados Unidos é cultivada no sul da Flórida (PINTO et al., 2005).

No Brasil, apenas as espécies do gênero *Annona* são cultivadas comercialmente, sendo *Annona muricata* L. a de maior importância, conhecida popularmente como gravioleira e seu fruto conhecido por graviola, araticum de comer, araticum grande, araticum manso, areticum, jaca, jaca de pobre, coração de rainha, jaca do Pará, jaqueira mole, condessa. A maioria das espécies é encontrada nos trópicos, com apenas alguns gêneros presente na zona temperada (MORS et al., 2000). A Tabela 1 exibe sua

distribuição geográfica com seus nomes populares e aspectos etnofarmacológicos.

Tabela 1 - Distribuição geográfica, nome popular e etnofarmacologia de *Annona muricata* L.

Local	Nome Popular	Uso Popular	Referências
ÁFRICA			
Gana	Soursop, Apre	Antiparasitário; antifebril; anti-inflamatório.	(DAYEEF; KARYONO; SUJUTI, 2013)
Nigéria	Soursop	Antitumoral; colagogo; adstringente; hipoglicemiante; hipotensivo.	(ADEWOLE; CAXTON-MARTINS, 2006; EKALUO et al., 2014; ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2015)
Senegal	Ndélesor	Antisséptico; antifúngico em dermatoses; antimalárico.	(WÉLÉ et al., 2004)
AMÉRICA			
Brasil	Araticum; coração-da-rainha; condessa; graviola; jaca-do-pará; jaca-de-pobre; fruta-do-conde.	Analgésico; anti-helmíntico; antiespasmódico; adstringente; antitussígeno; hipoglicemiante; anti-inflamatório; antitérmico; antiespasmódico; hepatoprotetor; antinevrálgico; antirreumático.	(TAYLOR et al., 2005)(FERREIRA et al., 2013; TAKAHASHI et al., 2006)
Jamaica	Jamaica soursop	Antiespasmódico; estimulante; broncodilatador; diurético; antitérmico; cardiotônico; anti-hipertensivo; galactagogo, parasiticida; sedativo e vermífugo.	(TAYLOR et al. 2005) (BADRIE; SCHAUSS, 2010)
Peru	Guanábano; guanábana	Parasiticida; antiespasmódico; anti-inflamatório; hipoglicemiante; antidiarreico;	(BADRIE; SCHAUSS, 2010)

Continua

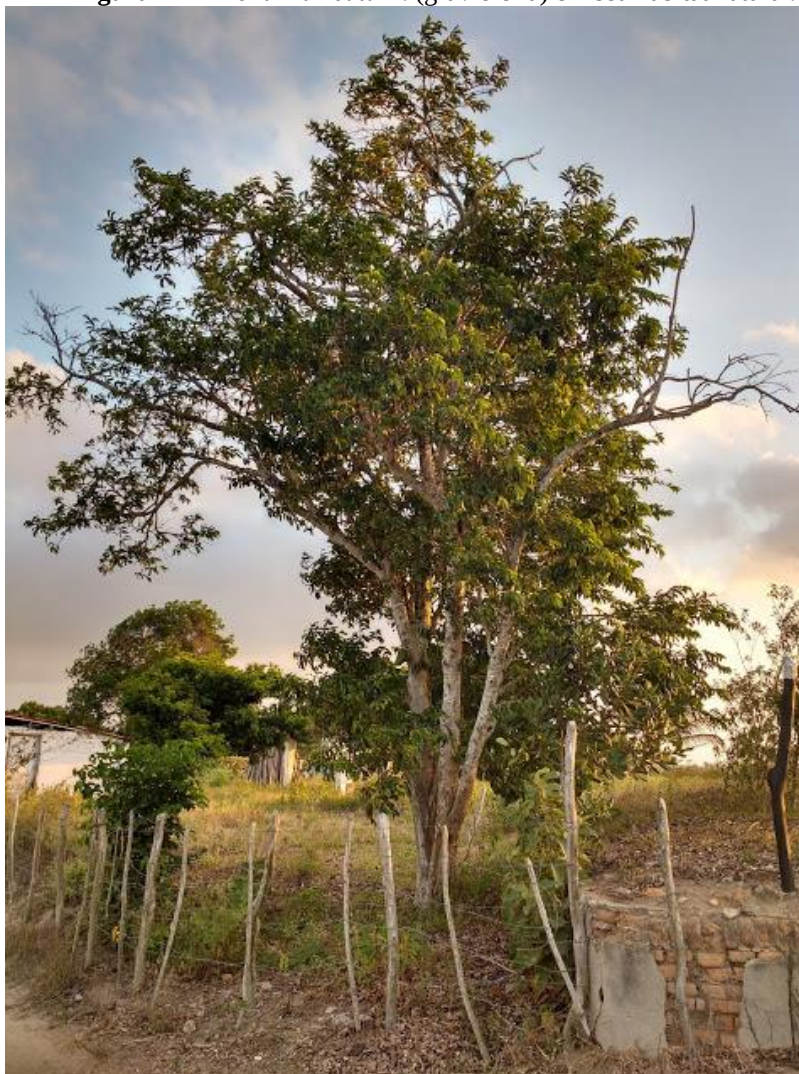
Tabela 1. Distribuição geográfica, nome popular e etnofarmacologia de *Annona muricata* L.

Local	Nome Popular	Uso Popular	Referências
		antitérmico; hipotensivo; sedativo.	
México	Catuche; catucho; guanábana; guanábano; tak-ob; llama-de-tehuantepec.	Antidiarreico; antitérmico; expectorante; antifúngico em dermatomicoses e antiescorbútico.	(TAYLOR et al., 2005)(BADRIE; SCHAUSS, 2010)
Venezuela	Catoche; guanábana; sirsak.	Antiespasmódico; antitérmico; antidiarreico; anti-hipertensivo.	(RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2015a)
ÁSIA			
Malásia	Durian belanda; durian blanda; durian maki; durian belanda; nangka.	Adstringente; antitussígeno; antidiarreico; tratamento de dermatoses; anti-hipertensivo; antirreumático.	(FOONG; HAMID, 2012; MOGHADAMTOUSI et al., 2014)
Índia	Mamphal	Antitumoral; anti-térmico; cicatrizante; antiparsitário; antiespasmódico; anti-hipertensivo.	(BASKAR; RAJESWARI; KUMAR, 2007; PAARAKH; CHANSOURIA; KHOSA, 2009)

3.2. Botânica

A gravioleira trata-se de uma pequena árvore que pode medir entre 5-8 metros de ramificação assimétrica (FIGURA 2). Suas folhas são grandes, verde-escuras e brilhantes na parte superior e verde-amarelada na parte inferior, podendo medir até de 15 cm de comprimento por 7 cm de largura. As flores possuem um formato piramidal, grandes, diclamídeas, de cor verde-escura quando em crescimento até verde-claras quando próximas à antese, hermafroditas e com cheiro característico (FIGURA 3). Após abertas, apresentam uma coloração amarelada com seis pétalas grossas e côncavas podendo estar solitárias ou agrupadas em até quatro flores, originadas de raminhos curtos de plantas velhas que após a fecundação formam cachos de frutos conhecidos como graviola (MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006; OWOLABI et al., 2013; VIJAYAMEENA et al., 2013).

Figura 2 - *Annona muricata* L. (gravioleira) em seu habitat natural.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Suas flores são hermafroditas, geralmente um pouco perfumadas, solitárias ou em fascículos com 2-4 flores, com três sépalas verdes e seis pétalas arranjadas em dois verticilos. O verticilo externo possui três pétalas amarelo-esverdeadas e o interno tem três pétalas amareladas. As flores possuem vários conglomerados e estames arranjados de forma espiralada abaixo e ao redor de uma globosa superior em forma de cúpula de inúmeros carpelos unidos, que cada um apresenta óvulo. Após a fecundação, os carpelos unidos formarão um sincarpo ou fruto composto. A floração começa quando a planta possui de três a quatro anos de idade, embora possa, ocasionalmente, ocorrer mais cedo, dependendo das condições ambientais. A antese (abertura flor) começa lentamente, com a separação do ápice das pétalas externas e leva de 6 a 8 horas para se completar. As flores começam a abrir no início da manhã e antese completa demora cerca de 6 horas, dependendo do clima. A floração é mais ou menos contínua. Esta espécie também experimenta polinização natural ineficiente (normalmente feita por besouros) e frequentemente frutificação pobre; portanto, a polinização manual é uma importante prática de gestão pomar (MANICA et al., 1997; MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006; PINTO et al., 2005).

A polinização é realizada, principalmente, por insetos ou às vezes pelo vento. O fato de que as flores são protoginasas (os pistilos estão maduros antes de o pólen ser liberado das anteras) sugere que a auto-polinização não é a regra para anonas. Devido às flores protoginasas, sua frutificação pode ser pobre quando as populações de insetos polinizadores são pequenas, bem como que frutos assimétricos podem ser produzidos, uma vez que o tamanho dos frutos e forma depende do número e posição dos óvulos fecundados. Como resultado, o número de frutos por planta e tamanho dos frutos e forma são altamente dependentes de polinização por insetos abundantes e passíveis de controle por meio de polinização manual onde os insetos polinizadores são raros (MANICA et al., 1997; PINTO et al., 2005).

A gravioleira tem um hábito de crescimento ereto com uma grande diâmetro e altura do dossel, embora ele tenda a possuir baixa ramificação e espessa, com membros erguidos. É uma árvore pequena, estreita, e perene, com 4-8 m de altura quando totalmente madura. Ela foi domesticada nas planícies e vales da América do Sul como uma planta de jardim. Suas hastes são arredondadas, ásperas e não púberes, com uma cor marrom-escura. As folhas têm pecíolos curtos, e são oblongos a cilíndricos, com 14 a 16 cm de comprimento e 5-7 cm de largura. Devido a semelhanças do dossel da planta e a morfologia

da folha, a gravioleira e a guanabana (*A. montana* Macf.) são frequentemente confundidas. As flores de anona são muito maiores do que aqueles das outras quatro espécies de anonáceas populares, sendo 3,2-3,8 cm de comprimento (NAS, 1975; PINTO; SILVA, 1994).

A graviola, seu fruto, é comestível e mostra-se como um sincarpo grande, carnoso e ovalado ou oblongo, assemelhando-se a forma de um grande coração, medindo de 5 a 20 cm de diâmetro, chegando a pesar de 0,9 até 10 kg, sendo este o maior do gênero *Annona*. Sua casca possui coloração esverdeada e aspecto delgado, possuindo espículas carnosas, moles e curvadas, cada uma correspondendo a um carpelo. Em seu interior, a polpa apresenta-se com vários gomos esbranquiçados, de consistência macia, perfumada, muito succulenta e de sabor ligeiramente ácido e agradável, com sementes escuras e brilhantes. O fruto possui 127-170 sementes, espalhados por toda a polpa. O tamanho da semente varia de 1 a 2 cm de comprimento e 0,33-0,59 g de peso, com uma cor negra logo após a colheita, mas tornando-se castanho escuro mais tarde (MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006; PINTO; SILVA, 1994).

Esta possui grande valor comercial no Brasil, especialmente nos Estados da Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco, devido ao grande consumo dos seus frutos, seja *in natura*, ou processados na forma de sucos, sorvetes, compotas, geleias, doces, iogurtes e cremes. Sendo a graviola um fruto rico em carboidratos, com baixo teor de gorduras e não é considerado de grande valor protéico (SACRAMENTO et al., 2003).

Suas polpas possuem uma grande utilidade alimentícia, pois contêm proteínas, ácidos graxos, carboidratos, fibras, minerais e vitaminas. No entanto, seus frutos não contribuem com muitas calorias para a dieta (PINTO et al., 2005). A polpa da graviola é considerada aromática e exótica, e é consumida principalmente após transformação em bebidas frias ou por vezes frescas. A parte comestível constitui 67,5% do peso total do fruto. O sabor característico da fruta é produzido pela amilo e ácidos geranílico e capróico (PINTO; SILVA, 1994). A polpa processada é usada para preparar sucos e sorvetes. Em Cuba, a polpa é processado para preparar uma bebida alcoólica chamado champola. Os açúcares mais importantes são frutose (1,8%), glicose (2,3%) e sacarose (6,6%). O ácido mais comum em sua polpa é o cítrico, há também a presença do ácido málico e, menos comumente, isocítrico. Contém também vitaminas A e B5, além disso, é a única espécie com taninos em sua polpa. Sugeriu-se que a pectina nos frutos poderia tornar-se um importante sub-produto, porém este não fora desenvolvido (CASTRO et al., 1984; NAS,

1975; PINTO; SILVA, 1994).

Os frutos de graviola são ocasionalmente consumidos frescos ou, mais comumente feito em sucos, sorvetes (PINTO; SILVA, 1994). A maioria das pessoas consideram que é muito ácido para comer fresco, mas é apreciado para a produção de bebidas refrescantes, néctares, sorvetes e alimentos similares. Néctar (polpa adoçado) podem ser preparados e utilizados após diluição com 3 partes de água. Em Java, Indonésia, frutos de graviola são adicionados à sopa (sajoer) (PINTO et al., 2005).

3.3. Fitoquímica

O metabolismo secundário das partes gravioleira é capaz de sintetizar, em geral, uma diversa quantidade de compostos, como por exemplo, fenóis, alcaloides, terpenóides, óleos essenciais e acetogeninas, sendo estas últimas características do gênero.

Em seu fruto encontra-se os ácidos cítrico, oxálico, caféico, cumárico, esteárico, linoleico, málico, γ -butírico (GABA) e oleico; anonol, campesterol, citrulina, dextrose, etanol, fitosteróis (β -sitosterol, estigmasterol), frutose, ipuranol, manganês, leucoantocianidinas, sacarose e taninos (PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004).

As folhas, raízes, caule, frutos e sementes de anonáceas contêm numerosas substâncias químicas bioativas, tais como acetogeninas, alcalóides, terpenos, flavonóides e óleos. Pelo menos algumas acetogeninas (FIGURA 7) possuem propriedades inseticidas, citotóxicas, antitumoral, fastidiosa, antibacteriana, imunossupressora, propriedades pesticidas ou anti-helmínticos (RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990). Substâncias tais como alcalóides, flavonóides e terpenos são potencialmente úteis na medicina, entre os compostos fenólicos destacam-se o ácido caféico, ácido *p*-cumárico, (-)-epicatequina e procianidina, e dentre os esteroides sobressai-se o sitosterol (LEBOEUF et al., 1980).

Há também as notáveis acetogeninas, sendo estas isoladas e caracterizadas a partir de diferentes espécies de anonas possuindo grupamentos como monotetrahidrofurano (MTH) ou bis-tetra-hidrofurano (THF-bis), com os sistemas adjacentes e não adjacentes bis-THF, nas suas estruturas (CORTÉS; FIGADERE; CAVÉ, 1993; CORTÉS et al., 1993; DURET et al., 1994). Estas substâncias podem ser extraídas a partir de sementes usando solventes tais como etanol, metanol ou éter de petróleo (RUPPRECHT; HUI;

MCLAUGHLIN, 1990). A cherimólia, uma das anonas, possui ao menos 6 tipos de acetogeninas que foram identificados nas raízes e alguns deles exibem atividades citotóxicas e antiparasitárias (CORTÉS et al., 1993; DURET et al., 1994). Três alcalóides foram identificados a partir das folhas e caule (DEL FRESNO; CANAVATE, 1983). Os extratos etanólicos das sementes de cherimólia também têm acetogeninas bioativas (CORTÉS; FIGADERE; CAVÉ, 1993; CORTÉS et al., 1993; SAHPAZ et al., 1996) e alcalóides (DEL FRESNO; CANAVATE, 1983).

Além disso, suas sementes têm óleos fixos que contêm ácido oleico (43%), linoleico (35%), ácido palmítico (12%), esteárico (8%), linoleico (1%) e traços de ácidos araquídico (PINTO; SILVA, 1994; MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006). Já a graviroleira, em suas raízes, caules e folhas há diferentes tipos de acetogeninas. Algumas delas exibem atividades antitumorais e agem contra linhagens celulares de câncer humano (KIM et al., 1998; WU et al., 1995a, 1995b; ZENG et al., 1996). As acetogeninas encontradas em folhas de graviroleira são usadas para preparar os extratos que contêm atividades inseticidas. Estes compostos são semelhantes às anoninas e muricinas (PINTO; SILVA, 1994). Além disso, os intermediários de biogenética de acetogeninas são encontrados (GLEYE et al., 1997). Em suas sementes de graviroleira existem amilóides (KOOIMAN, 1967), acetogeninas (RIESER et al., 1996; ROBLOT et al., 1993; PHILIPPOV et al., 1994; WU et al., 1995b; YU et al., 1998), e insaturado e ácidos graxos saturados (PINTO et al., 2005). Os principais tipos de ácidos graxos insaturados encontrados em sementes de graviroleira são oleico (41%), linoleico (33%) e palmitoleico (2%) ácidos, fazendo-se em conjunto 76% de gordura total. Os ácidos graxos saturados são palmítico (19%) e esteárico (5%), fazendo-se em conjunto 24% (PINTO et al., 2005).

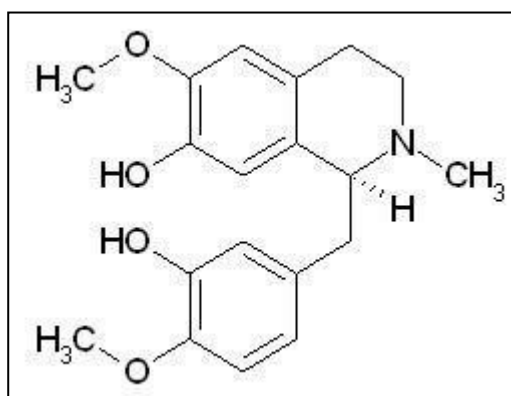
Algumas acetogeninas encontradas na raiz de anonáceas são conhecidas por apresentarem efeitos citotóxicos (GLEYE et al., 1998): panatellina, uvariamicina IV, uvariamicina I, reticulatacina, reticulatacin-10-ona e solamina. Sua casca contém alcaloides; as folhas têm óleos essenciais com propriedades parasiticidas, antidiarreica, reumatológica e propriedades antinevrálgicas (MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006). Infusões de água fervida das folhas apresentam características adstringentes e propriedades antiespasmódicas gástricas (PINTO; SILVA, 1994; KHAN; KORNINE; OMOLOSO, 1997), ajudam a tratar a diabetes e distúrbios gástricos, e são usados em doenças renais (PINTO; SILVA, 1994). As flores e pétalas cozidas são usados para curar inflamações dos olhos; o tratamento requer 2-3 lavagens por dia (PINTO; SILVA, 1994). Frutos imaturos da

graviroleira exibem propriedades medicinais contra a disenteria, câncer, efeitos diuréticos, escorbuto, processos antitérmicos, doenças de pele, erupções cutâneas, febre, malária, úlceras pépticas, cólicas e edema (KHAN; KORNINE; OMOLOSO, 1997). A casca de frutos imaturos tem componentes que agem contra a dispepsia atônica, diarreia e disenteria crônica; é adstringente e provoca vômitos. A polpa ácida é utilizada para curar parasitas do pé e as doenças do fígado. A fruta também tem propriedades que atuam sobre a vesícula biliar (PINTO; SILVA, 1994). As sementes têm propriedades antiespasmódicas e antiparasitárias (BORIES et al., 1991; PHILIPPOV et al., 1994; MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006). Elas contêm amiloides, ácido oleico e esteroides (PINTO et al., 2005).

O uso popular e na medicina moderna das anonas são claros, porém as propriedades tóxicas da maioria destes compostos podem ter efeitos secundários indesejáveis. Caparros-Lefebvre & Elbaz (1999) mostraram que os alcalóides presentes nas folhas, cascas e sementes de annonáceas, quando consumido por seus efeitos sedativos e hipnóticos nas Antilhas Francesas, são responsáveis por induzir efeitos neurotóxicos com sintomas de parkinsonismo. Daí qualquer utilização terapêutica dos anonas só deve ser realizada com orientação médica.

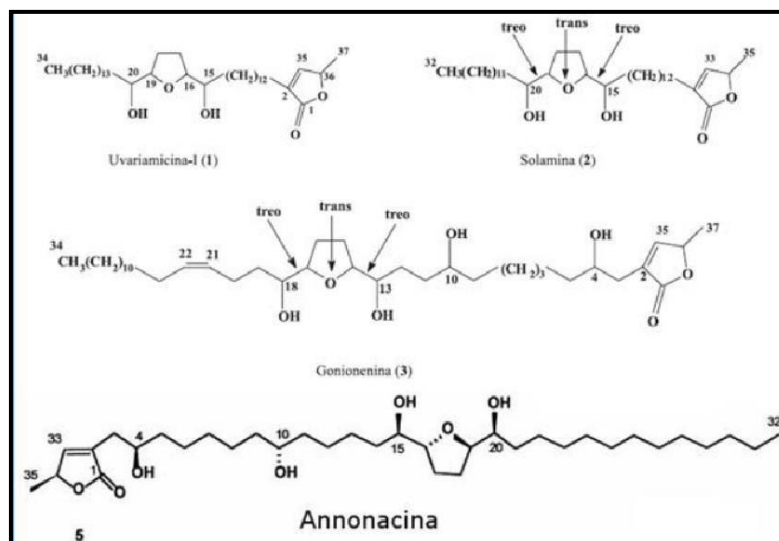
Diversos alcaloides foram identificados em *Annona muricata* L., dentre os quais se destacam: annonáina, anomuricina, anomurina, asimilobina, anomonicina, aterospermina, coclaurina, coreximina, estefarina, muricina, muricinina, normuciferina, reticulina, tiramina e tetrahydrobenzylisoquinolinas (KOTAKE et al., 2004).

Dentre os alcaloides presentes, a reticulina (FIGURA 3) possui maior destaque, trata-se de um composto de anel central benzilisoquinolínico, sendo conhecida como precursor na rota biossintética da morfina e da papaverina, sendo mais estruturalmente relacionado à papaverina, sendo esta um agente conhecido por sua atividade espasmolítica (MARTIN et al., 1993). Além disso, descreve-se que a reticulina apresenta efeito vasorelaxante por inibir o influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem, também apresenta efeitos dopaminérgicos centrais e ação bloqueadora muscular (MARTIN et al., 1993; WATANABE et al., 1981).

Figura 3 - Alcaloide Reticulina

Fonte: <<http://www.coompo.com/compounds/Reticuline+from+Plants+C1693.html>> Acessado em 22 jun 2015.

Atualmente, os estudos fitoquímicos de espécies da família Annonaceae não se concentram apenas nos alcaloides, mas numa nova classe de compostos altamente bioativos, conhecidos como acetogeninas anonáceas (FANG et al., 1993). Estes compostos são metabólitos secundários oriundos da via do acetato, derivados de ácidos graxos de cadeia longa demonstrando consideráveis atividades biológicas, sendo considerados também uma potencial alternativa para novas drogas antitumorais. Do ponto de vista bioquímico tais substâncias caracterizam-se como metabólitos de longa cadeia de hidrocarbonetos, possuindo entre 35-37 átomos de carbono, exibindo também um anel γ -lactônico α,β -insaturado, podendo até haver um rearranjo cetolactônico, comum a três anéis tetrahidrofuranos ao longo da cadeia hidrocarbônica, são encontradas também outras funções oxigenadas tais como hidroxilas, acetoxilas, cetonas, epóxidos, tetrahidrofuranos e tetrahidropiranos (FIGURA 4) (BERMEJO et al., 2005; LEITE, 2009).

Figura 4 - Acetogeninas anonáceas.

Fonte: Adaptado de Ríos (2013).

Foram descritas na literatura científica mais de 400 acetogeninas, obtidas de diversas partes da planta: sementes, frutos, caules e folhas; e muitas delas com suas estruturas químicas estabelecidas (BERMEJO et al., 2005; CHANG; WU, 2001; LIAW et al., 2002, 2005). Alguns dos exemplos de acetogeninas são: Annocatalina, annohexocina, annomonicina, annomontacina, annomuricatina A e B, annomuricinas A, B, C, D, E e F, annomutacina, annonacina (múltiplos, iso, cis, etc.), annonacinona, annopentocina, cohibina A, B, C e D, corepoxilona, coronina, corossolina, corossolona, donhexocina, epomuricenina A e B, gigantetrocina A e B, gigantetrocina (cis e trans), goniothalamicina, javoricina, montanacina, montecristina, muracina A, B, C, D, E, F e G, muricapentocina, muricatalicina, muricatenol, muricatetrocina A e B, muricatina D, muricatocina A, B e C, murihexol, murina, murisolina, reticulatacina, robustocina, rolina, roliniastatina 1 e 2, sabadelina, solamina, uvariamicina I e IV; e xylomaticina (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999; GLEYE et al., 1998; KIM et al., 1998; LIAW et al., 2002; RIESER et al., 1996; WANG et al., 2002).

As acetogeninas são classificadas de acordo com a quantidade de anéis tetrahydrofurânicos (THF) e de subunidades de γ-lactonas. Podendo ser mono-THF, bis-THF adjacentes, bis-THF não-adjacentes, as que não possuem anéis THF e as não-clássicas, acetogeninas que possuem anel tetrahidropirânico. Nas estruturas das acetogeninas podem variar o padrão do anel lactônico. Elas são classificadas em γ-lactonas substituídas, cetolactonas (cis ou trans) ou anel hidroxilado (RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990).

Dentre elas, a primeira acetogenina descoberta na década de 80 foi a uvaricina, a qual apresentou uma atividade antileucêmica *in vivo* e também diversas ações biológicas que apresentaram e tornaram candidatas promissoras para um futuro de geração de drogas contra tumores resistentes ao tratamento quimioterápico tradicional, fazendo também com que aumentasse o interesse pelo estudo desta família. Elas também têm sido amplamente investigadas em pesquisas farmacêuticas, durante as duas últimas décadas devido a muitos constituintes químicos antifúngicos e citotóxicos encontrados em suas folhas e casca. Estas, hoje, são uma das classes que mais crescem como fontes de novos produtos naturais e apresentam algumas atividades farmacológicas, tais como anti-helmíntica, antitumoral, antimalárica, antimicrobiana, antiprotozoária, e pesticida (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999; WRIGHT, 2005).

3.4. Atividades Farmacológicas

3.4.1. Atividade Antiproliferativa e Citotóxica

Jaramillo et al. (2000) avaliaram a atividade citotóxica de extratos hexânicos, acetato de etila e metanólico do pericarpo de *Annona muricata* L. contra linhagens de células isoladas de linfoma histocístico (U 937) usando o método do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólio (MTT), apresentando o extrato acetato de etila como mais ativo que o padrão de referência (Glucantime®), o fracionamento deste extrato levou ao isolamento de três acetogeninas: annonacina, annonacina A e annonamuricina.

Recentemente foram averiguadas também o desempenho do extrato metanólico de partes diante de linhagens tais como HeLa e PC3 (câncer cervical e câncer prostático respectivamente), inibindo 80% das células tumorais (PAUL et al., 2013), o mesmo demonstrado por Sun et al. (2014) a respeito da linhagem PC3 utilizando extrato aquoso/acetônico do fruto. Enquanto que Owolabi et al. (2013) estudaram esta atividade através da extração de óleos essenciais de suas folhas por meio de hidrodestilação contra células de linhagem de adenocarcinoma celular humano (MCF-7), havendo uma taxa de morte celular de $99,2\% \pm 0,1\%$ com uma concentração de 100 µg/mL, atribuindo tal atividade aos componentes majoritários do óleo (*E*)-cariofileno, eugenol e δ -cadineno. Também foi relatada ação contra esta última linhagem celular, sendo ela atribuída à

annonacina (KO et al., 2011).

Já Gavamukulya et al. (2014) determinaram a atividade citotóxica com os extratos etanólico e aquoso das folhas contra células de carcinoma de ascite Ehrlich (EACC) e linhagem de células esplênicas normais, e o etanólico separadamente testado contra linhagens de células de adenocarcinoma pleural (SKBR3) e câncer mamário (MDA), sendo que somente o extrato etanólico mostrou alguma ação nas concentrações avaliadas, entretanto não houve nenhuma ação de inibição de crescimento celular das células normais. Ao passo de que em Gana encontraram atividade do extrato aquoso frente a células de linhagem prostática (BPH-

1) promovendo um *upregulation* no gene Bax e um *downregulation* no gene Bcl-2, também foi relatado em Taiwan além do *upregulation* do gene citado, também da proteína p53, este último atribui tais ações a (-)-annonaína (ASARE et al., 2014; LI et al., 2013). Averiguou-se também a atuação de extratos obtidos por cápsulas de suplemento contendo folhas e casca pulverizadas de *Annona muricata* L. apresentando IC₅₀ (Concentração que inibe 50% das células) de 200 e 73 µg/mL para as linhagens FG/COLO357 e CD18/HPAF respectivamente (TORRES et al., 2013).

Foi realizada uma análise comparativa da citotoxicidade de 10 diferentes acetogeninas anonáceas através do painel do National Cancer Institute (NCI-60) (NCI, 1955), demonstrando uma similaridade nos valores de IC₅₀ para cada uma (FANG et al., 1993).

Já se tratando da atividade antiproliferativa, estudos envolvendo o extrato aquoso de suas folhas utilizando como modelo ratos F344, foram administradas doses de 30 e 300 mg/kg durante um período de 60 dias. Os extratos reduziram o tamanho da próstata, a qual após análise histológica notou-se a presença de células glandulares epiteliais em apoptose, além disso, a secreção prostática a nível epitelial foi mantida. Além disso, a vesícula seminal também foi significativamente reduzida em todos os grupos testados (ASARE et al., 2014). Enquanto que o extrato acetato de etila das folhas nas doses de 250 e 500 mg/kg apresentaram uma redução no foco de criptas aberrantes induzido em células do colón intestinal em ratos (ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

Ademais, o extrato etanólico das folhas apresentou ação quimioprotetora nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg contra papiloma de pele induzidos por 7,12-dimetilbenza(α)antraceno (DMBA) em ratos ICR (HAMIZAH et al., 2012). Já um estudo realizado por Dai et al. (2011), onde utilizou um extrato do fruto de *A. muricata* obtido por uma mistura H₂O:Acetona como solvente, encontrou um efeito de supressão do gene do receptor do fator de crescimento epidermal expresso em câncer de mama quando administrada dose de 200 mg/kg de extrato por 5 semanas em modelos murinos.

3.4.2. Atividade Antibacteriana

Extratos aquoso e etanólico obtidos da casca do caule de *Annona muricata* L. foram testados frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio cholerae* (569B clássico), *Escherichia coli* (4 cepas diferentes – isoladas de peixe, camarão, rio e lago respectivamente -

-) e *Salmonella* Enteritidis, sendo que apenas o extrato aquoso mostrou-se ativo, sendo estas atividades frente a *S. aureus*, *V. cholerae* e a cepa de *E. coli* isolada em rio (VIERA et al., 2010). À medida que no trabalho realizado por Takahashi et al. (2006), os extratos hexânico e etanólico não apresentaram atividade contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922.

Pesquisas efetuadas na Índia com os extratos metanólico e aquoso das folhas foram realizadas para testar tal ação contra *S. aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 29213, *E. coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Streptococcus pyogenes* ATCC 8668, *B. subtilis* ATCC 12432, *Salmonella typhimurium* ATCC 23564, *Klebsiella pneumoniae* NCIM No.2719 e *Enterobacter aerogenes* NCIM (National Collection of Industrial Microorganisms) No. 2340, sendo eles mais ativos frente a *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* e *P. vulgaris* (PRACHI, 2010). Também na Índia, outros estudos mostraram que o extrato aquoso, metanólico e etanólico das folhas, casca e raiz obtiveram atividade em confronto com *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* sendo estas originadas do Departamento de Microbiologia do Sri Sankara Arts and

Science College, Enathur/Índia (VIJAYAMEENA et al., 2013). Li et al. (2013) citaram que a molécula (+)-anonaína possui forte atividade de inibição contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus sp.*, *S. aureus* e *E.coli*.

Extratos metanólico das sementes e aquoso da polpa do fruto mostraram atividade significativa quando avaliadas por metodologia de difusão em disco com as cepas *Salmonella enterica* ser. Enteritidis (CVCMM 497), *S. aureus* (CVCMM 456) e *Listeria monocytogenes* (CVCMM 449), todas oriundas do Centro Venezuelano de Coleções de Microorganismos (RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2015b).

3.4.3. Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória

Foram avaliadas as atividades anti-inflamatórias através da metodologia do edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por xileno em ratos lançando-se mão de extratos obtidos do sobrenadante do sumo do fruto imaturo de *Annona muricata* L. Este experimento apresentou uma redução do edema de pata com um pico de efeito em 6 h de tratamento em comparação ao padrão utilizado, também o edema de orelha foi reduzido através de um pré-tratamento com o extrato (ISHOLA et al., 2014). Na Malásia foi realizado um estudo desta ação pela mesma metodologia utilizada para edema de orelha induzido por xileno em modelos murinos administrando extrato etanólico das folhas por via oral, apresentando resultados satisfatórios quando administrado na dose de 30 mg/kg (FOONG; HAMID, 2012).

De Sousa et al. (2010) lançaram mão da metodologia de edema de pata induzida por carragenina, demonstrando que o extrato etanólico das folhas mostrou-se ativo nas doses administradas (200 mg/kg e 400 mg/kg) oralmente nos modelos experimentais após 3 e 4 h da aplicação da carragenina respectivamente, registrando também redução do volume do exudato e da taxa de migração leucocitária. O mesmo estudo avaliou também as ações antinociceptivas do mesmo extrato, obtendo como resultados uma redução do número de contorções abdominais em 14,42% (dose de 200 mg/kg) e 41,41% (400 mg/kg). As mesmas doses inibiram ambas as fases do tempo de lambida de pata: primeira fase (23,67% e 45,02%) e a segunda fase (30,09% e 50,02%), respectivamente. Assim como aumentou o tempo de

reação sobre uma placa quente nas doses de 200 (30,77% e 37,04%) e 400 mg/kg (82,61% e 96,30%) após 60 e 90 minutos de tratamento.

Em um estudo executado por Wu et al. (2012) demonstrou que a acetogenina denominada isodesacetiluvárica, isolada do extrato metanólico das sementes, inibe a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) bloqueando as vias de transcrição da ativação de tal enzima, ao passo de que a sinalização intracelular mediada pelo cálcio permaneceu inalterada.

A mesma análise realizada por Hamid et al. (2012) contemplou a metodologia da contorção abdominal induzida por ácido acético, o teste da formalina e o teste da placa aquecida. No primeiro teste foi apresentada uma relação dose-dependente onde o extrato na dose de 100 mg/kg apresentou potência similar ao piroxicam (controle). No teste da formalina, o extrato exibiu uma significativa dose-dependência nas fases inicial e tardia. Já o teste da placa aquecida demonstrou uma prolongação do tempo de reação do camundongo na dose de 100 mg/kg.

Ishola et al. (2014) utilizando o sobrenadante do sumo do fruto de *A. muricata* encontrou em doses de 50, 100, e 200 mg/kg uma inibição dose-dependente das contorções e dor induzidos por formalina na fase tardia. Tanto o extrato quanto a morfina produziram um aumento no tempo de limiar da dor no teste da placa aquecida.

3.4.4. Atividade Antioxidante

Extratos obtidos das sementes, via aparelho de Soxhlet usando metanol, via maceração lançando-se mão também de metanol e por decocção utilizando água como solvente, e da polpa (por meio de decocção e água como solvente extrator) foram avaliados quanto a sua ação frente ao DPPH (2, 2-difenil-1-picrilhidrazil), onde os extratos das sementes obtidos por maceração e decocção apresentaram uma maior atividade que os outros avaliados. Atribui-se esta ação ao fato de as sementes possuírem compostos fenólicos, tais como o ácido gálico (LUZIA; JORGE, 2012; RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2015b). Houve também estudos que demonstraram que os extratos etanólico e aquoso das folhas provocaram uma significativa redução da concentração do DPPH, sendo o extrato aquoso possuindo um

efeito mais pronunciado. Este último foi submetido a diversas frações onde todas apresentaram ação antioxidante (GAVAMUKULYA et al., 2014).

Baskar et al. (2007) efetuaram um estudo *in vitro* a respeito da atividade antioxidante das folhas de 3 espécies de *Annona* (*A. muricata*, *A. squamosa* e *A. reticulata*) frente a modelos como DPPH, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS), óxido nítrico (NO), superóxido, radical hidroxila e peroxidação lipídica. O extrato etanólico de *A. muricata* na concentração de 500 µg/mL mostrou máxima atividade de extinção com o ABTS (90,05%), seguido pelo radical hidroxila (85,88%) e óxido nítrico (72,60%). Entretanto mostrou-se moderadamente ativo em relação a inibição da peroxidação lipídica. Vijayameena et al. (2013) detectaram a presença de componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos no extrato aquoso das folhas e sementes, sendo os primeiros as enzimas catalase e superóxido dismutase (SOD), e entre os componentes não-enzimáticos destacam-se as vitaminas C e E, e compostos fenólicos.

Relatou-se também que o extrato acetato de etila de suas folhas exibiu um aumento na ação da SOD no tecido do cólon de modelos murinos, assim como o extrato aquoso das folhas demonstrou tal capacidade quando administrado em doses de 100 mg/kg em ratos diabéticos, aumentando não só a SOD, mas também a catalase nos rins, fígado e artéria aorta e além destes, glutathione (GSH), glutathione peroxidase e malondialdeído (MDA) (ADEWOLE; CAXTON-MARTINS, 2006; FLORENCE et al., 2014; ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

3.4.5. Atividade Antiparasitária

Tomando parte dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico do pericarpo do fruto de *A. muricata* L., Jaramillo et al. (2000) avaliaram a atividade dos mesmos *in vitro* contra *Leishmania braziliensis* e *Leishmania panamensis* no estágio de promastigota, notou-se que o extrato acetato de etila foi o mais ativo frente a esses protozoários, mais ativos até que o padrão usado (Glucantime®), após o fracionamento do extrato obteve-se o isolamento de três acetogeninas. Dentre eles, o acetato de etila mostrou-se mais ativo em relação *L. braziliensis*, *Leishmania amazonenses* e *Leishmania donovani* em suas formas promastigotas e frente a

Trypanossoma cruzi em sua forma epimastigota, porém não apresentou significativa inibição contra *Plasmodium falciparum* tanto uma cepa sensível quanto uma resistente a cloroquina (OSORIO et al., 2007). Raynaud-Le Grandic et al. (2004) atribuíram estes efeitos, particularmente frente a forma promastigota de *L. donovani*, a acetogeninas, especialmente a rolliniastatina (IC₅₀ a 4,7 µM), tendo esta última também uma IC₅₀ de 2,5 µM contra a mesma cepa, porém na sua forma amastigota intra-macrófago. Evidenciou-se também que os efeitos inibitórios das cepas *L. donovani*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania major* foram mais expressivos com a annonacinona isolada do extrato metanólico das sementes (VILA-NOVA et al., 2013).

Analisando a ação dos extratos pentânico, etanólico e aquoso, obtidos das folhas, em relação a 2 cepas de *P. falciparum* – uma resistente e outra sensível a cloroquina –, os resultados demonstraram que o extrato pentânico foi o mais efetivo, necessitando de concentrações menores (< 20 µg/mL) em comparação aos outros para inibir 50% da população do protista (MÉNAN et al., 2006). A atividade contra ambas as cepas foi relatada por Li et al. (2013) como relacionadas à (-)-anonaina. Já estudos como os de Yamthe et al. (2015) isolaram várias frações derivadas dos extratos da casca, raiz e pericarpo de *A. muricata* L., sendo a fração cloreto de metileno do extrato bruto etanólico destas partes da planta as que apresentaram melhores resultados de inibição do crescimento de *P. falciparum*, tendo isolado compostos tais como β-sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosídeo, lichexantona e ácido gálico.

De Luna et al. (2005) avaliaram o potencial moluscicida do extrato etanólico das folhas contra *Biomphalaria glabrata*, mostrando uma inibição de 100% dos adultos numa concentração de 100 ppm. Encontrou-se também, investigando a atividade frente a *B. glabrata*, resultados significativos com os extratos etanólicos das folhas e casca tanto para os moluscos em sua forma adulta quanto para seus ovos (DOS SANTOS; SANT'ANA, 2001). Também se estudou a ação do extrato aquoso das folhas contra os ovos, larvas infectantes e formas adultas do parasita nematoide *Haemonchus contortus* encontrado em ovinos. Em doses mais elevadas, o extrato mostrou 84,91% e 89,08% de eficácia em teste de viabilidade de ovos e teste de motilidade larval, respectivamente (FERREIRA et al., 2013).

3.4.6. Atividade Hipoglicemiante

Um estudo realizado por Adeyemi et al. (2009) demonstrou que o extrato metanólico de *A. muricata* L. possui efeito hipoglicemiante quando utilizado para tratamento de ratos Wistar quando os mesmos foram tratados com estreptozocina (STZ), mantendo o peso e a concentração de glicose sanguínea mais próximos do grupo controle. Enquanto que outra investigação, desta vez com o extrato aquoso das folhas lançando-se mão da indução do diabetes por STZ evidenciou uma significativa alteração a nível tecidual das células β quando tratadas com o extrato, preservando sua integridade estimulando agentes antioxidantes endógenos (ADEWOLE; CAXTON-MARTINS, 2006).

Em ratos diabéticos, uma única administração do extrato aquoso das folhas reduziu significativamente os níveis de glicose no sangue em 75% e 58,22%, respectivamente, na dose de 100 mg/kg e 200 mg/kg quando comparado com o valor inicial. O tratamento de ratos normais 3 dias antes da indução de diabetes mostraram que o extrato não tem qualquer efeito no prazo de 72 horas após a injeção de STZ (FLORENCE et al., 2014).

3.4.7. Atividade Inseticida

Ensaio para avaliar as atividades inseticidas do extrato etanólico das sementes de *A. muricata* L. foram tomadas por Ribeiro et al. (2014) contra as larvas das espécies *Trichoplusia ni*, uma espécie de traça conhecida como “cabbage looper”, e *Myzus persicae* (pulgão-do-pessegueiro). Este extrato apresentou uma dose letal para matar 50% de *T. ni* de > 4000 mg/kg comparado ao inseticida baseado em acetogeninas Anosom® (700,37 mg/kg) por via oral e 430,78 e 40,24 mg/kg por via tópica respectivamente.

De Luna et al. (2005) estudaram as ações do extrato etanólico de várias partes de diversas plantas, dentre elas *A. muricata* L. com esta exibindo uma taxa de mortalidade de 100% sob concentração de 500 ppm frente a larvas de *Aedes aegypti*. Ao passo de que em outro estudo, o extrato etanólico da raiz apresentou uma concentração letal de 200 µg/mL para matar 90% das larvas de *A. aegypti* (DE MENDONÇA et al., 2005). Contudo o extrato bruto etanólico das sementes demonstraram atividade contra a lagarta *Spodoptera litura*,

porém resultados não tão significativos quando comparado a *Annona squamosa* L. (LEATEMIA; ISMAN, 2004).

Outro estudo realizado buscou descrever uma potencial eficácia de extratos das sementes de *A. muricata* L. e *A. squamosa* L. usadas como inseticidas naturais para o controle de larvas e formas adultas dos vetores *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*, sendo estes obtidos com água e solventes orgânicos (etanol, diclorometano e acetona), estudos químicos exibiram que tais extratos contêm alcaloides e flavonoides, provavelmente conferindo as propriedades inseticidas. Os extratos de *A. muricata* induziram alta taxa de mortalidade para ambas as espécies de mosquito em comparação com extratos de *A. squamosa* em todas as concentrações testadas. A LC_{50} de extratos das sementes variou entre 1% e 5% para adultos e de 0,5% a 1% para as larvas (RAVAOMANARIVO et al., 2014). Enquanto que em outra análise, o extrato etanólico das folhas de *A. muricata* apresentaram LC_{50} de 56,47 $\mu\text{g/mL}$ frente a larvas em seu 3º estágio de *C. quinquefasciatus* (MAGADULA; INNOCENT; OTIENO, 2009).

3.4.8. Outras Atividades

Algumas outras atividades de *A. muricata* L. foram investigadas, dentre elas destaca-se o estudo guiado por Moghadamtousi et al. (2014) que investigou a ação gastroprotetora do extrato acetato de etila de suas folhas. Este apresentou uma significativa atividade anti-ulcerogênica em ratos em doses de 400 mg/kg, sendo que esta ação se deu principalmente pela redução do estresse oxidativo causado pela lesão induzida. Já Hamid et al. (2012) avaliou a mesma ação, porém usando o extrato etanólico das folhas, provocando uma intensa redução da lesão ulcerosa numa escala dose-dependente (10-300 mg/kg), atribuindo a ação a compostos tais como taninos, flavonoides e triterpenos que aumentam a produção do grupo sulfidrila não-proteico do muco. O extrato metanólico das folhas apresentou efeito anti-hiperlipidêmico quando administrado em um grupo de ratos comparados a um grupo de ratos com diabetes não tratada, reduzindo o nível de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de baixo peso molecular (LDL) e da lipoproteína de baixíssimo peso molecular (VLDL) e aumentando as taxas de lipoproteína de alto peso molecular (HDL) (ADEYEMI et al., 2009).

Também foi realizado um monitoramento do efeito hepatoprotetor do extrato etanólico da casca de *A. muricata* através das estimativas das transaminases séricas (TGO e TGP), fosfatase alcalina sérica, oxidação lipídica e conteúdo proteico. Este extrato foi capaz de prevenir o aumento das taxas das transaminases, da fosfatase alcalina e da oxidação lipídica, bem como auxiliou na redução do conteúdo proteico do fígado de ratos lesionados por tetracloreto de carbono (PADMA; CHANSOURIA; KHOSA, 1998).

O extrato etanólico da casca também foi avaliado, porém desta vez o seu potencial cicatrizante utilizando como modelo o método de ferida aberta em ratos por um período de 12 dias. Os resultados obtidos demonstraram uma maior redução na dimensão do ferimento que do grupo controle a partir do 4º dia de tratamento (PAARAKH; CHANSOURIA; KHOSA, 2009).

Nwokocha et al. (2012) sugeriu um possível mecanismo de ação do efeito hipotensivo do extrato aquoso das folhas, tendo em vista os resultados obtidos nas doses de 9,17-48,5 mg/kg frente, sendo este efeito não mediado via as rotas muscarínica, histaminérgica, adrenérgica e do óxido nítrico, porém a ação foi possível através de um mecanismo periférico envolvendo o antagonismo do cálcio.

Hasrat et al. (1997) estudou a atividade ligante do receptor 5-HT_{1A} de algumas espécies do gênero *Annona*, incluindo *A. muricata* através do ensaio de ligação de ligantes (LBA), demonstrando uma grande atividade ligante, e foram isolados, a partir de várias frações do fruto, alguns alcaloides isoquinolínicos: asimilobina, nornuciferina e anonaína.

Alguns outros ensaios foram realizados com esta espécie como para verificar suas possíveis atividades antifúngicas e antivirais. A respeito da atividade antifúngica, Johnny et al. (2011) avaliou esta atividade em folhas de 15 espécies de plantas, dentre elas *A. muricata* L., utilizando extratos metanólico, clorofórmio e acetônico. Seus resultados demonstraram que os extratos metanólico, clorofórmio e acetônico inibiram o crescimento radial de *Colletothricum capsici* – esta cepa fora adquirida da Faculdade de Agricultura, Universidade de Putra na Malásia – na ordem de 39,96, 18,01, 33,55 mm respectivamente para uma concentração de 10 µg/ml e com uma concentração mínima inibitória de > 20 µg/ml para todos os solventes testados. Ao passo de que Abubacker & Deepalakshmi (2013) ao realizar um estudo tendo como objeto o extrato aquoso das folhas de *A. muricata* L. em vista das cepas de *Alternaria solani* (NCBT 118), *Aspergillus albicans* (NCBT-120) *Aspergillus erithrocephalus* (NCBT- 124), *Aspergillus fumigatus* (NCBT-126) e

Penicillium chrysogenum (NCBT-162) todas estas obtidas do Departamento de Biotecnologia do National College, Tiruchirappalli. Apresentando inibição total do crescimento das cepas *A. solani*, *A. albicans*, *A. erithrocephalus* e *A. fumigatus* numa concentração de 15 mg/ml, sendo que os autores atribuíram estas ações ao metil-éster do ácido hexadecanóico, componente majoritário do extrato.

Tratando-se das possíveis atividades antivirais, Padma et al. (1998) analisaram a possível ação inibitória dos efeitos citopáticos dos extratos etanólico e aquoso da casca de *A. muricata* L. frente a cepas de Herpes simplex vírus-1 (HSV-1), apenas o extrato etanólico apresentou atividade, obtendo uma concentração mínima inibitória na ordem de 1 mg/ml. Já Betancur-Galvis et al. (1999) estudaram a atividade antiviral de diversos extratos de espécimes da família *Annonaceae*, dentre eles *A. muricata* L., tomando parte do extrato etanólico de suas folhas, observaram atividades satisfatórias contra cepas de Herpes simplex vírus-2 (HSV-2) quando este fora cultivado em células HEp-2 (células de carcinoma epidermóide de laringe humana, ATCC CCL23) e MDBK (células de rim bovino, ATCC CCL22).

3.5. Estudos de Toxicidade

Antes de quaisquer estudos para a avaliação de atividades biológicas especialmente *in vivo* ou alguma projeção para a produção de algum medicamento para uso, são necessárias etapas que avaliem a toxicidade dos compostos a serem testados.

Omoja et al. (2014) avaliaram possíveis efeitos de toxicidade aguda em modelos murinos através da metodologia de detecção da dosagem letal mínima para a mortalidade de 50% da população estudada (LD₅₀), foram testadas as doses de 175, 313 e 550 mg/kg do extrato metanólico das folhas frescas de *A. muricata* L. Os resultados demonstraram uma LD₅₀ calculada de 354,8 ± 8 mg/kg, porém estudos *post mortem* não revelaram nenhuma alteração patológica a nível anatômico nos rins e fígado dos grupos analisados. Também não foram registradas alterações a nível morfológico e comportamental em um trabalho realizado na Nigéria com o mesmo extrato, porém utilizando doses de 20, 50, 100, 200, 400 e 600 mg/kg em 72 h de observação (ADEYEMI et al., 2010)

De Sousa et al. (2010) partindo do mesmo extrato com as doses administradas de 0,5, 1, 1,5, 2 e 3 mg/kg encontraram uma LD₅₀ na ordem de 1,67 mg/kg após 48 h de observação. Tomando-se parte também do extrato etanólico, foram avaliados seus efeitos de hepatoproteção frente a ratos Wistar com seus fígados injuriados por administração de doses de 2 g/kg de paracetamol utilizando doses de 200 e 400 mg/kg do extrato em comparação com o padrão silimarina. Porém este mesmo extrato foi estudado sobre possíveis danos renais em concentrações de 10, 20 e 40 mg/kg em ratos durante 40 dias, foram registrados aumento nos níveis de creatinina sérica e apresentou danos na estrutura das células tubulares, com uma maior expressão da enzima caspase-9 – uma protease envolvida em processos apoptóticos --, levando a insuficiência renal (DAYEEF; KARYONO; SUJUTI, 2013).

Já nos estudos de Moghadamtousi et al. (2014), o extrato etanólico das folhas foi submetido à observação frente a ratos em duas diferentes concentrações (1 e 2 g/kg) por 2 semanas. Porém, após este período não foram registrados nenhum evento de toxicidade aguda, como perda de peso, comportamento (isto é, ataxia, hiporatividade e hiperatividade), morfologia microscópica e alterações em testes de funcionalidade dos rins e fígado, concluindo que a LD₅₀ por via oral deste extrato é maior que 2 g/kg de massa corporal. Em contrapartida observaram os níveis séricos de enzimas tais como transaminase oxaloacética (TGO), transaminase pirúvica (TGP), fosfatase alcalina e bilirrubina, além da observação de alterações tissulares; apresentando uma redução nos níveis sanguíneos das enzimas relatadas e da bilirrubina, especialmente na dose de 400 mg/kg e não foram verificados sinais de necrose (OYEDEPO, 2014).

Em outros trabalhos foram realizados ensaios de toxicidade através da metodologia usando *Artemia salina* (*Artemiidae*), conhecida como artêmia. Com seus náuplios com 24 h de idade nos estágios II e III expostos às concentrações de 10000, 1000, 100, 10 e 1 ppm por vários segundos. Os três compostos isolados do extrato etanólico das folhas (escoparona, corossolona e annonacinona) demonstraram uma toxicidade frente a *A. salina* com IC₅₀ na ordem de 59,4, 7,09 e 17,05 µg/ml respectivamente (VILA-NOVA et al., 2013).

Foram relatados também casos em que o consumo da graviola, fruto de *A. muricata* L., em Guadalupe (departamento ultra marítimo da França) gerou alguns casos (cerca de 1/3) de pacientes apresentando parkinsonismo atípico. Isto fora atribuído à ação da annonacina, encontrada especialmente nas folhas e no fruto, por agir como um inibidor do complexo mitocondrial I, atuando na rota desta síndrome neurológica (CAPARROS-LEFEBVRE; ELBAZ, 1999; LANNUZEL et al., 2007).

Ao passo de que Florence et al. (2014) efetuaram tanto os estudos de toxicidade aguda quanto os de toxicidade subcrônica. O primeiro foi realizado em ratos os quais receberam uma administração do extrato aquoso das folhas nas doses de 2000 e 5000 mg/kg para cada grupo teste. Não foram observadas alteração no comportamento, tampouco ocorreram óbitos, também não foram evidenciadas alterações macroscópicas, sugerindo uma LD₅₀ maior que 5000 mg/kg. Enquanto que a toxicidade subcrônica fora avaliada em quatro grupos, recebendo 200, 400 e 800 mg/kg – um dos grupos foi o controle – diariamente durante um período de 4 semanas. Contudo não foram registradas diferenças significantes entre os grupos testados e o grupo controle durante o período de estudo. Um estudo semelhante fora conduzido por Arthur et al. (2011) onde tomaram camundongos suíços albinos e tratados com o extrato aquoso nas doses de 100, 1000, 2500 e 5000 mg/kg, estes animais foram submetidos a avaliação de sinais de toxicidade e mortalidade desde as primeiras 4 h críticas até 7 dias. Já tratando-se da avaliação da toxicidade subcrônica, houve a administração de doses de 100, 1000 e 2500 mg/kg durante um período de 14 dias. Não houve mudanças no comportamento, na coloração e massa dos órgãos, na natureza das fezes, urina e cor dos olhos; por via oral a dose de 5000 mg/kg foi bem tolerada até o último dia, sendo esta a dose estimada para a LD₅₀, contudo houve redução dos níveis plasmáticos de glicose, de colesterol e LDL e um aumento da creatinina sérica em dosagens superiores a 1000 mg/kg. Estes resultados indicaram uma segurança em seu uso, até efeitos de proteção contra lesões hepáticas, porém há a necessidade de monitoramento renal em usos crônicos.

3.6. Microorganismos de Interesse Clínico

Doenças infecciosas são as principais causas de mortes prematuras no mundo, há uma estimativa de 15 milhões de óbitos por ano. Um dos fatores que favorecem a essa crescente mortalidade trata-se do crescimento da resistência bacteriana, ao passo de que, este evento dificulta a cura e onera os gastos com a assistência a saúde (WHO, 2010).

Dentre as bactérias, as Gram-positivas, sobretudo as que pertencem ao gênero *Staphylococcus* sp. são importantes causadoras de infecções tanto comunitárias como hospitalares, sendo que vários estudos as associaram às causas de mortalidade, sendo que 53,92% das infecções são causadas por *Staphylococcus aureus* e coagulase negativos. Além de tal gênero, o gênero *Micrococcus* sp. pode também estar associado à ocorrência de

infecções como em certos abscessos, casos de pneumonia, artrite séptica, meningite e choque séptico em pacientes imunodeprimidos.

Já tratando-se das estirpes Gram-negativas, estas apresentam-se associadas a casos de septicemia, infecções pós-cirúrgicas e principalmente do trato urinário. De Sousa et al. (2014) demonstraram a presença dessas bactérias em cerca de 48% das hemoculturas positivas de pacientes de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Dentre as cepas relacionadas às infecções recorrentes por Gram-negativos, estão relacionadas: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp.

Alguns outros tipos de microorganismos, tais como as leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções hospitalares originadas por fungos. Dentre os pacientes hospitalizados, vários fatores são relacionados ao risco do desenvolvimento de candidíase: idade avançada, sexo feminino, antibioticoterapia de amplo espectro, o uso de corticosteroides e imunossupressores, presença de anormalidades anatômicas do trato urinário, diabetes, sondagem vesical e pós-operatório de cirurgias de grande porte (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

3.6.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus trata-se de uma bactéria Gram-positiva, que pertence à família *Staphylococcaceae*, são microorganismos anaeróbios facultativos sob a forma de cocos distribuídos em forma de “cachos de uva” apresentando um perfil de colônias de coloração amarelo-dourada. São positivos aos testes da coagulase, catalase, DNase e fermentadores do manitol, além de negativas ao teste da oxidase (KONEMAN, 2008).

Sendo esta a espécie mais conhecida do gênero, é constituinte da microbiota natural do ser humano, são encontradas na pele, narinas, axilas, períneo e intestino, porém pode tornar-se patogênica em condições tais como a quebra da barreira cutânea ou imunossupressão. Diversas infecções são causadas por este microorganismo, por exemplo infecções na pele e subcutâneas, infecções pós-cirúrgicas, osteomielites, pneumonias, abscessos, endocardites e septicemia. São os agentes mais comuns de infecções hospitalares e comunitárias, apresentando-se como responsável por altos índices de morbidade e mortalidade (GELATTI et al., 2009). A secreção de toxinas antigênicas é o fator responsável por sua virulência, as

quais são capazes de causar Síndrome do Choque Tóxico (SCT) e uma exacerbada produção de citocinas a partir dos macrófagos e células T (FEY et al., 2003).

Desde os anos 60 do século passado, *S. aureus* tem trazido preocupação quanto à resistência contínua apresentada aos antibióticos, após a introdução da penicilina na terapêutica (EVANGELISTA; OLIVEIRA, 2015). Para contornar o problema, foi introduzida a meticilina, resistente à ação das enzimas beta-lactamases, produzidas pelos *S. aureus*. Porém relatos de resistência adquirida à meticilina, nos Estados Unidos, associados à expressão da multirresistência, introduziram o uso da sigla MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), utilizada para identificar as cepas com tais características (GELATTI et al., 2009; LOWY, 1998). As cepas MRSA apresentam o gene *MecA*, o qual codifica a síntese da proteína *PBP2a*, uma ligante de penicilina alterada, que, embora capaz de realizar o “cross link” entre as moléculas de peptidoglicano, tem afinidade de ligação extremamente baixa a muitos antibióticos betalactâmicos, justificando a resistência.

Atualmente, algumas situações ocorrem simultaneamente no mundo, a existência de cepas MRSA com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina, denominadas *S. aureus* com Resistência Intermediária à Vancomicina (VISA) ou cepas resistentes à vancomicina, conhecidas como *S. aureus* Resistentes à Vancomicina (VRSA) (CDC, 2002), a prevalência de clones de MRSA multirresistentes considerados endêmicos em hospitais de diversas localidades no mundo, e a emergência de cepas não-multirresistentes de MRSA, isoladas principalmente de infecções comunitárias (OKUMA et al., 2002).

3.6.2. *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN)

Staphylococcus coagulase negativo (SCN) é o componente majoritário da microbiota da pele e por viverem em equilíbrio com os ecossistemas onde estão inseridos, foram tratados durante muito tempo como microrganismos isentos de virulência. Atualmente, porém, estes microrganismos apresentam-se como bactérias oportunistas emergentes, especialmente em pacientes hospitalizados, imunodeprimidos, neonatos prematuros e com dispositivos implantados (VUONG; OTTO, 2002).

As principais espécies de SCN envolvidas em infecções são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus*

warneri, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus xylosus*, embora outras espécies possam também causar infecções em humanos. Entre elas, *S. epidermidis* é o agente mais associado com as infecções, especialmente com as septicemias (CHANG et al., 2003).

Staphylococcus coagulase negativos são produtores de *slime* ou biofilme, fator de virulência que permite estas bactérias aderir às superfícies lisas de biomateriais, sendo por isso, associadas aos processos de infecção por meio dos procedimentos invasivos. Através disso, estudos têm demonstrado que cepas de SCN têm apresentado alta resistência à oxacilina (BERNARDI; PIZZOLITTO; PIZZOLITTO, 2007; CORDEIRO, 2007; TERASAWA, 2015) e avaliada a produção do gene *MecA*, até mesmo em cepas isoladas da saliva de profissionais da Enfermagem.

3.6.3. *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são bacilos Gram-negativos, aeróbios e não fermentadores de glicose. Dentre as principais espécies patogênicas deste gênero, destacam-se *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. maltophilia* e *P. putrefaciens*. Dentre estas, a *P. aeruginosa* é a que apresenta maior importância clínica, por além de estar relacionada com consideráveis taxas de morbidade, prolongada hospitalização e aumento dos custos com tratamentos nas unidades hospitalares (MICEK et al., 2015), ainda tem apresentado amplo espectro de resistência a várias classes de antimicrobianos (FIGUEIREDO et al., 2007; LAGATOLLA et al., 2004).

P. aeruginosa apresenta uma capacidade em desenvolver mecanismos de resistência, sendo os genes que codificam essas enzimas geralmente adquiridos através de mecanismos de transferência genética intra e/ou interespecies. Por isso, alguns estudos têm sido desenvolvidos para determinar a frequência genotípica de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e apresentando resultados preocupantes a respeito do surgimento de novos genes em locais onde não havia, contribuindo significativamente para a disseminação da resistência por isolados destas bactérias (KOBAYASHI et al., 2007).

3.6.4. Família Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae abrange mais de 30 gêneros e 130 espécies. Dentre os gêneros mais comumente isolados em amostras biológicas estão *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Providencia* e *Yersinia*. Estes microrganismos são bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, móveis ou imóveis e não formadores de esporos. Geralmente apresentam positividade para a prova da catalase, porém, são negativos para a oxidase. As bactérias pertencentes a esse gênero são os maiores componentes da microbiota intestinal humana (NAVON-VENEZIA et al., 2003).

Possuem diversos fatores de virulência e são agentes etiológicos em infecções hospitalares e comunitárias, especialmente infecções do trato urinário (ITU), infecção de ferida cirúrgica, infecções respiratórias e infecções da corrente sanguínea. Também podem estar envolvidos em abscessos abdominais e peritonites. Espécies desta família são responsáveis por cerca de 50% das septicemias, 70% a 90% das ITU (hospitalares e comunitárias) e uma significativa percentagem das infecções intestinais (OLIVEIRA, 2008).

Um importante mecanismo de resistência desenvolvido pelas bactérias dessa família foi a produção de ESBLs. O tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBL oferece um substancial desafio à terapia antimicrobiana, pois tais enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactâmicos, reduzindo as alternativas terapêuticas. Os principais gêneros produtores dessas enzimas são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* sp, *Providencia* sp. e *Enterobacter* sp. Enterobactérias produtoras das enzimas estão amplamente disseminadas, já tendo sido reportadas em vários países europeus e do continente americano (SHAH et al., 2004; CARATTOLI et al., 2009; LAGO; FUENTEFRÍA; FUENTEFRÍA, 2010).

No entanto, entre os anos 2001 e 2003 foram descritas novas enzimas que hidrolisam os antibióticos carbapenêmicos, elas foram isoladas inicialmente em *Klebsiella pneumoniae*, e por isso denominadas *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) (YIGIT, 2003). Essas bactérias tiveram rápida expansão nos Estados Unidos, países europeus e América do Sul, incluindo o Brasil. Estudos realizados por Borges et al. (2015) evidenciaram altas mortalidades em pacientes infectados por KPC, o que tem tornado preocupantes os quadros

destas infecções. Além disso, verificou-se que o mecanismo de resistência da KPC foi implicado em surtos causados por outros membros da família das enterobactérias.

3.6.5. *Candida* sp.

O gênero *Candida* corresponde a grande maioria das infecções atribuídas a fungos registradas, tornando assim um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido aos problemas envolvendo o diagnóstico e a terapêutica das infecções causadas por tais agentes. As leveduras de *Candida* têm grande importância pela grande frequência com que colonizam e sua capacidade de infecção em humanos. Espécies de *Candida* são normalmente encontradas como parte da microbiota do tubo gastrointestinal em adultos saudáveis. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* na vagina. Estes microorganismos comensais podem tornar-se patogênicos em alterações no sistema imunológico do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimaduras ou procedimentos invasivos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Dentre as principais espécies de interesse clínico enquadram-se: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitaniae*. Contudo, casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas e espécies emergentes de *Candida* têm sido descrito, envolvendo isolamentos de novas espécies como: *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida norvegensis*, *Candida inconspicua* entre outras (DIGNANI; SOLOKIN; ANAÏSSIE, 2003).

Dentre as espécies, *Candida albicans* trata-se da isolada com mais frequência em casos de infecções superficiais e invasivas em vários ambientes anatômicos. Este microorganismo trata-se de uma levedura com potencial patogênico bem compreendido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa, e a produção de enzimas. Ela é sensível a todos os antifúngicos de uso sistêmico, mas casos de resistência

adquirida a antifúngicos azólicos são relatados em casos de pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos (SANGLARD; ODDS, 2002).

4. METODOLOGIA

4.1. Material vegetal

A coleta das folhas de *Annona muricata* L. foi realizada entre os meses de março e maio de 2014, no município de Camocim de São Félix – PE (Latitude: 08°21'31"; Longitude: 35°45'43"; Altitude: 691 metros), no sítio Palmeira. A exsicata foi depositada no Herbário da Empresa Pernambucana de Pesquisas Agropecuárias (IPA), sob o número de registro 89139.

4.1.1. Procedimentos extrativos

Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem, pesadas e extraídas sob refluxo por meio de um aparelho de Soxhlet utilizando os solventes hexano, acetato de etila, etanol e água. As extrações partiram de 49,3 g das folhas da mesma amostra vegetal, sobre as quais foram realizadas sucessivas extrações, de acordo com a ordem crescente de polaridade dos solventes utilizados, durante seis horas para cada ciclo extrativo. Após as extrações, os solventes foram evaporados com auxílio de um evaporador rotatório e os extratos secos armazenados a uma temperatura de 8-10 °C.

4.1.2. Análise Fitoquímica

O perfil fitoquímico foi identificado a partir dos extratos brutos secos: hexânico, acetato de etila, etanólico e aquoso das folhas. Os extratos foram analisados através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando placas de gel de sílica, empregando-se diversas fases móveis e reveladores em relação aos metabólitos a serem pesquisados, de acordo com a metodologia descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Sistemas cromatográficos, padrões e reveladores empregados na prospecção fitoquímica de *Annona muricata* L.

CLASSE DE METABÓLITO	SISTEMA DE ELUIÇÃO	PADRÃO	REVELADOR	REFERÊNCIA
Alcaloides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ¹	Pilocarpina	Dragendorff	(WAGNER; BLADT, 1996)
Mono e Sesquiterpenos	Tolueno-AcOEt ²	Timol	Vanilina Sulfúrica	(WAGNER; BLADT, 1996)
Triterpenos e Esteroides	Tolueno-AcOEt ³	β-sitosterol	Liebermann Buchard	(HARBORNE, 1998)
Cumarinas	n-Hexano-AcOEt ⁴	Umbeliferona	KOH 10% em EtOH	(WAGNER; BLADT, 1996)
Flavonoides, Fenilpropanoglicosídeos e Derivados Cinâmicos	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ¹	Rutina	NEU + UV	(WAGNER; BLADT, 1996)
Taninos Condensados	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ⁵	Epicatequina	Vanilina Clorídrica	(WAGNER; BLADT, 1996)
Taninos Hidrolisáveis	AcOEt-HCOOH- AcOH-H ₂ O ¹	Ácido gálico	NEU + UV	(WAGNER; BLADT, 1996)

¹ 100:11:11:27 v/v; ² 97:3 v/v; ³ 90:10 v/v; ⁴ 95:5 v/v; ⁵ 100:3:3:3 v/v; ⁶ 97:3 v/v; AcOEt = Acetato de Etila; HCOOH = Ácido Acético; AcOH = Ácido Fórmico; H₂O = Água; CHCl₃ = Clorofórmio; MeOH = Metanol; UV = Ultravioleta; KOH = Hidróxido de Potássio.

4.2. Atividade antimicrobiana

4.2.1. Linhagens microbianas

Neste estudo foram utilizadas dezesseis cepas bacterianas, das quais sete delas Gram- positivas e nove Gram-negativas. Dentre as Gram-positivas, três foram pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus* (duas cepas padrão e um isolado clínico), três foram isolados clínicos de *Staphylococcus coagulase negativo* e um isolado clínico da espécie *Micrococcus luteus* (TABELA 3).

Tabela 3 - Cepas de bactérias Gram-positivas utilizadas nos ensaios e suas respectivas origens.

ESPÉCIE	CÓDIGO	ORIGEM
<i>Staphylococcus aureus</i>	AM 103	ATCC 6538
<i>Staphylococcus aureus</i>	AM 106	ATCC 6538P
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA	AM 1235	Secreção
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	AM 235	Esperma
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	AM 1162	Fragmento ósseo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AM 1198	Secreção
<i>Micrococcus luteus</i>	AM 1200	Líquido peritoneal

AM: Código da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE; ATCC: American Type Culture Collection; MSSA: *Staphylococcus aureus* Metilicina Sensível.

Dentre as Gram-negativas foram estudados seis isolados clínicos únicos e três cepas padrão, sendo duas de *Escherichia coli*, duas de *Klebsiella pneumoniae*, duas de *Salmonella*, duas de *Pseudomonas aeruginosa* e uma de *Proteus mirabilis* (TABELA 4).

Tabela 4 – Cepas de bactérias Gram-negativas utilizadas nos ensaios e suas respectivas origens.

ESPÉCIE	CÓDIGO	ORIGEM
<i>Escherichia coli</i>	AM 251	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	AM 1281	ATCC 35218
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AM 342	Ponta de Cateter
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AM 411	Bile
<i>Salmonella</i> sp.	AM 1182	Fezes
<i>Salmonella choleraesuis</i>	AM 1280	ATCC 14028
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AM 457	Urocultura
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AM 458	Urocultura
<i>Proteus mirabilis</i>	AM 1115	Urocultura

AM: Código da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE; ATCC: American Type Culture Collection

Para a determinação da atividade antifúngica dos extratos brutos secos utilizados, foram utilizados dois fungos leveduriformes, todos pertencentes à espécie *Candida albicans*, desta foram um isolado clínico e uma cepa padrão (Tabela 5).

Tabela 5 - Fungos leveduriformes utilizados nos ensaios e suas respectivas origens.

ESPÉCIE	CÓDIGO	ORIGEM
<i>Candida albicans</i>	AM 1284	Sangue
<i>Candida albicans</i>	AM 1288	ATCC 14053

AM: Código da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE; ATCC: American Type Culture Collection.

4.2.2. Preparação dos inóculos

A partir de culturas recém-obtidas (em 24 h) bacterianas e fúngicas, foram realizadas suspensões de 5 mL em solução fisiológica esterilizada, ajustando o padrão de turbidez do tubo de acordo com a escala 0,5 de McFarland, obtendo-se 10^8 e 10^6 UFC/mL (Unidades Formadores de Colônias por mililitro), respectivamente para cada linhagem (CLSI, 2003; 2004).

4.2.3. Preparação dos padrões antimicrobianos e dos extratos

Para os ensaios realizados, todos os extratos foram solubilizados em solução aquosa de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 20% (v/v). Os antimicrobianos padrões utilizados nos testes foram a Tetraciclina (300 µg/mL) e a Ceftriaxona (300 µg/mL), para as bactérias; e o Cetoconazol (100 µg/mL) para as leveduras. Para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), utilizaram-se os mesmos antimicrobianos, porém, foram preparadas diversas concentrações.

4.2.4. Técnica de poços / Difusão em Ágar

Os ensaios de difusão são métodos quantitativos, nos quais o efeito pode ser graduado. Fundamentam-se na difusão da substância a ser ensaiada, em um meio de cultura sólido com o microrganismo inoculado. Diante disso, os inóculos previamente preparados foram semeados em placa de Petri contendo 20 mL de Ágar Mueller-Hinton (para bactérias) e Ágar Sabouraud Dextrose (para fungos). Em seguida, foram realizadas as perfurações assépticas dos poços com auxílio de um perfurador (de 6 mm de diâmetro) e as aplicações das soluções dos extratos secos em DMSO a 20% em duas diferentes concentrações (10mg e 5mg mg/poço), utilizando-se pipeta automática na razão de 100 µL/poço. Os

antimicrobianos- controle foram: tetraciclina (300 µg/mL), ceftriaxona (300 µg/mL) e o cetoconazol (100 µg/mL). Como controle do solvente, foi utilizada a solução de DMSO a 20%.

Após a incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (bactérias) e $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (fungos) por 24 horas, a atividade antibacteriana foi avaliada pela medição dos halos de inibição (CLSI, 2003; 2004).

4.2.5. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) por Microdiluição em caldo

Os extratos testados que apresentaram atividade antimicrobiana preliminar, pela técnica de poços/difusão em Agar, foram submetidos à determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) pela técnica de microdiluição em caldo. Os testes foram realizados em caldo Muller Hinton contidos em placa de microtitulação de 96 poços, tipo ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Uma alíquota de 20 µL de cada extrato nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 e 62,5 mg/mL foi depositada em cada poço da placa contendo caldo Muller-Hinton e 10 µL suspensão de microorganismos para um volume final de 100 mL em cada poço. Foram realizados controles dos extratos, do caldo Muller Hinton, das suspensões de microorganismos e do DMSO a 20% (utilizado para solubilizar os extratos). Os antimicrobianos utilizados foram a tetraciclina e a ceftriaxona, todos em concentrações de 0,062 a 128 µg/mL. As placas foram cobertas e incubadas a 35 °C por 24 h. Às placas, adicionaram-se 10 µL de Rezasurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido), a fim de se determinar o crescimento de acordo com a coloração apresentada. Os ensaios foram realizados em triplicata e considerou-se como CMI a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano.

No que se referem ao potencial de atividade antimicrobiana, as medidas dos halos de inibição foram estabelecidas de acordo com os parâmetros descritos por Alves et al. (2000): < 9 mm, inativo; 9 - 12 mm, pouco ativo; 13 - 18 mm, ativo; e, > 18 mm, muito ativo. Quanto ao potencial antimicrobiano, pela medida da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos vegetais, são considerados como muito ativos aqueles que apresentarem CMI < 100 µg/mL; ativos com CMI entre 100 - 500 µg/mL e moderadamente ativos com CMI de 500 - 1000 µg/mL, baixa atividade com CMI de 1000 - 2000 µg/mL e inativos com CMI >

2000 µg/mL. O estudo da CMI foi realizado apenas com os extratos que apresentaram boa atividade pela técnica de poços/difusão em Agar, ou seja, halos ≥ 13 mm.

Os resultados foram expressos pelas médias das triplicatas realizadas através da análise estatística ANOVA.

4.3. Atividade Citotóxica

A atividade antiproliferativa dos extratos hexânico, acetato de etila, etanol e água de *A. muricata* L. foi avaliada nas seguintes linhagens de células cancerígenas humanas: NCI H292 (carcinoma de pulmão) HL-60 (leucemia pró-mielocítica) e HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana) fornecido pelo Banco de Células do Rio de Janeiro/Brasil, mantidas pelo laboratório de cultura de células do departamento de antibióticos/UFPE. Todas as células cancerígenas foram mantidas em meio RPMI 1640 e DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 mg mL de estreptomicina a 37 °C com 5% de CO₂. A citotoxicidade de todos os extratos foi testada utilizando o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA).

A avaliação da atividade citotóxica dos extratos hexânico, acetato de etila, etanólico e aquoso das folhas de *Annona muricata* foi realizada em 3 tipos de linhagens celulares diferentes, todas elas obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro/Brasil, a origem delas pode ser verificada pela Tabela 6.

Tabela 6 - Origem das linhagens celulares utilizadas no ensaio de atividade citotóxica.

Nome da Linhagem celular	Origem da Linhagem
NCI H292	Carcinoma de pulmão
HL-60	Leucemia pró-mielocítica
HEp-2	Carcinoma epidermóide de laringe humana

Dentre os diversos métodos para a avaliação das propriedades biológicas de diversos produtos de origem natural, foi utilizado o método de microcultura baseado na redução metabólica do MTT. O sal de tetrazólio é reduzido através do metabolismo de células

viáveis resultando num composto chamado azul de formazan que é mensurado espectrofotometricamente. Os resultados obtidos por esta técnica foram expressos em porcentagem de inibição das linhagens celulares frente aos extratos, foram utilizados como padrões-controle os antineoplásicos cisplatina e doxorubicina.

Os ensaios foram realizados no laboratório de farmacologia e cancerologia experimental (UFPE). Em todos os ensaios realizados, as células tumorais foram plaqueadas em placas de 96 poços (10^5 células/ml para células aderentes ou 3×10^5 células/ml para as células leucêmicas). Os extratos foram dissolvidos em DMSO a 1%, partindo de 10 mg a fim de se obter a concentração final de 25 µg/mL, seguidamente adicionados a cada poço e incubados durante 72 h. Os grupos controle receberam uma mesma quantidade de DMSO. Após 69 h de tratamento, 25 µl de MTT (concentração de 5 mg/ml) foram adicionados, três horas mais tarde, o produto formazana obtido do MTT foi dissolvido em 100 µl de DMSO, e a absorbância foi medida a 595 nm em aparelho espectrofotométrico de leitura de microplacas. Foram utilizados como controles para a proliferação celular doxorubicina e cisplatina. Os valores de IC_{50} e seus intervalos de confiança de 95% para dois experimentos diferentes foram obtidos por regressão não linear, utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 (Software intuitivo para a Ciência, San Diego, CA) (BARROS et al., 2014a).

4.4. Atividade Anti-Inflamatória

As amostras utilizadas foram derivadas do sobrenadante de células submetidas ao tratamento com o extrato em diferentes concentrações e estimuladas com LPS ou meio de cultura DMEM. A dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada de acordo com a metodologia de Griess. Para realização do teste, foi preparada uma solução de nitrito a 69 µM e gerada a curva padrão e inoculadas 50 µL das amostras em uma placa de 96 poços. Sob proteção da luz, foram adicionados 50 µL do reagente de Griess e a leitura foi realizada após 10 minutos em leitor de microplacas a 540 nm (BARROS et al., 2014b). Os resultados foram expressos através da análise estatística ANOVA, teste de Bonferroni.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Prospecção Fitoquímica

A triagem fitoquímica de todos os extratos evidenciou a presença de diversos metabólitos secundários, como pode ser visto na Tabela 6. Pode-se observar que o extrato hexânico de *Annona muricata* apresentou mono e sesquiterpenos, além de triterpenos e esteroides. Nos extratos acetato de etila e etanólico, foram encontrados cumarinas, flavonoides, taninos hidrolisáveis e condensados, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides. Por fim, no extrato aquoso se observou a presença de cumarinas, flavonoides, taninos hidrolisáveis e alcaloides.

Foram detectados 319 metabólitos na família *Annonaceae*, dentre as espécies *A. muricata* apresenta em sua composição diversos metabólitos tais como alcaloides, compostos fenólicos, esteroides e terpenoides como descrito anteriormente. Dentre os alcaloides, são comumente encontrados reticulina, coreximina, coclarina, annomuricina e annourina. Já entre os compostos fenólicos destacam-se o ácido caféico, ácido *p*-cumárico, (-)-epicatequina e procianidina, e dentre os esteroides sobressai-se o sitosterol (LEBOEUF et al., 1980).

Nos extratos de espécies da família *Annonaceae*, incluído de *A. muricata*, são encontrados com mais frequência flavonoides, taninos, terpenoides, cumarinas, esteroides e alcaloides (Tabela 7) (ARUN JYOTHI et al., 2011; VIJAYAMEENA et al., 2013).

Tabela 7 - Prospecção fitoquímica dos extratos brutos de *Annona muricata* L.

Metabólitos	Ext-Hex- <i>Am</i>	Ext-AcOEt- <i>Am</i>	Ext-EtOH- <i>Am</i>	Ext-H₂O- <i>Am</i>
Alcaloides	+	++	+++	-
Mono e Sesquiterpenos	++	+++	++	-
Triterpenos e Esteroides	++	++	+	-
Cumarinas	-	+	+	+
Flavonoides	+	+	++	++
Taninos Condensados	-	-	++	++
Taninos Hidrolisáveis	-	+	+	++
Rendimento (%)	3,37	3,20	6,22	9,09

Ext. Hex. : Extrato Hexânico; Ext. AcOEt: Extrato Acetato de Etila; Ext. EtOH: Extrato

Etanólico; Ext. Aq. : Extrato Aquoso; +++ Mais de 6 bandas; ++ 4 a 6 bandas; + 1 a 3 bandas; -

Ausência.

Chauhan & Mittu (2015) encontraram por triagem fitoquímica no extrato metanólico das folhas obtido por Soxhlet, flavonoides, taninos, terpenoides, esteroides, saponinas, glicosídeos cardioativos e alcaloides. Ao realizar o mesmo estudo com o extrato aquoso encontrou flavonoides, terpenoides, esteroides, glicosídeos cardioativos, saponinas, antraquinonas e cumarinas, estes em conformidade com o encontrado por Arthur et al. (2011) e Prachi (2010). Uma investigação com o macerado metanólico das folhas demonstrou apenas a presença de saponinas, taninos e alcaloides e ausência de flavonoides (OMOJA et al., 2014). Vijayameena et al. (2013) também identificou os mesmos compostos para o extrato aquoso realizado por maceração, porém encontrou a presença de alcaloides e ausência de terpenoides e antraquinonas nos extratos metanólico e etanólico.

Diferentemente deste trabalho que não identificou no extrato aquoso terpenoides, esteroides e saponinas. A identificação de glicosídeos cardioativos e antraquinonas não foram realizadas, assim como não foram identificados alcaloides na composição do extrato aquoso. Entretanto no extrato etanólico foram identificados, alcaloides e terpenoides. Embora, estudos com os extratos aquosos das sementes e polpa de *A. muricata* demonstraram a presença de alcaloides em sua composição (RAVAMANARIVO et al., 2014; RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2015a).

Em conformidade com este trabalho foram encontrados nos extratos etanólicos das folhas (FOONG; HAMID, 2012; HAMID et al., 2012). No extrato etanólico obtido por decocção, foram encontrados também taninos, terpenoides, esteroides, flavonoides, alcaloides, saponinas, antraquinonas, glicosídeos cardioativos, cumarinas e lactonas (GAVAMUKULYA et al., 2014).

No extrato *n*-butanólico, obtido pela técnica de Soxhlet, foram identificados flavonoides, terpenoides, taninos e glicosídeos cardioativos e registrada a ausência de esteroides, antraquinonas e saponinas (GEORGE et al., 2012).

5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *Annona muricata* L.

Através da técnica de difusão em ágar, a avaliação da atividade antimicrobiana de um extrato é determinada através da medida do diâmetro do halo de inibição desse frente aos microrganismos testados (LENETTE et al., 1987), já pela Concentração Mínima Inibitória (CMI) verificamos a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um determinado microorganismo.

Os extratos hexânico e acetato de etila não demonstraram atividade antimicrobiana em todas as espécies testadas seja por técnica de difusão em ágar, tampouco pela técnica de CMI. Na literatura não houveram registros de estudos utilizando tais solventes em técnicas extrativas, além dos estudos reportados por Takahashi et al. (2006), onde avaliaram a atividade dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *A. muricata*, esses não exibiram atividade frente às cepas testadas: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922. Porém isto pode ser explicado pela dificuldade de difusão do extrato no meio de cultura, pois de acordo com Rios et al. (1988), que apresentaram pesquisas sobre atividade

antimicrobiana de extratos de plantas e de substâncias isoladas encontram problemas devido à característica lipofílica de algumas amostras, como é o caso de extratos utilizando hexano e acetato de etila como solventes extratores.

Já se tratando do extrato etanólico de *Annona muricata*, como se pode observar na Tabela 6, foi considerado moderadamente ativo ou muito ativo frente às cepas Gram-positivas utilizadas nos ensaios (TABELA 7). O maior halo de inibição apresentado foi de 19 mm, na concentração de 10 mg/poço, para a cepa de *Micrococcus luteus* (AM 1200) em contrapartida do achado por Takahashi et al. (2006) os quais testaram uma cepa ATCC de *M. luteus*, enquanto que Li et al. (2013) informou que o alcaloide (+)-anonaína apresentou inibição de *M. luteus*, atestado pela presença de alcaloides no extrato etanólico como verificado no *screening* fitoquímico.

Houve também uma moderada inibição das cepas de *Staphylococcus aureus* AM 103, onde o extrato exibiu halos de 13 mm, na concentração de 10 mg/poço e 12 mm na concentração de 5 mg/poço; já frente a cepa de *S. aureus* AM 106, foram observados halos de 14 mm e 12 mm, nas concentrações de 10 mg/poço e 5 mg/poço, respectivamente; já frente à cepa de *S. aureus* AM 1235, o extrato apresentou apenas um halo de 12 mm na concentração de 10 mg/poço, consequentemente demonstrando ser pouco ativo, não encontrou-se atividade antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* em outros estudos tais como os de Takahashi et al. (2006), assim como Vijayameena et al. (2013) encontraram halo de 18 mm para *S. aureus* (obtido de cultura local), sendo os alcaloides, flavonoides e taninos os compostos mais presentes nesse extrato, de acordo com o reportado por Li et al. (2013) onde o alcaloide benzilisoquinolínico (+)-anonaína apresentou atividade frente a *S. aureus*, sendo que alcaloides se mostram presentes no extrato etanólico, já Prachi (2010) utilizando extrato metanólico das folhas registrou atividade contra *S. aureus* (ATCC 29213).

Haro et al. (2014) encontrou halos que variaram de 8,6 a 16,4 mm nas respectivas concentrações de 5 a 300 mg/mL do extrato metanólico das folhas de *A. muricata* quando avaliou a ação frente a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, do mesmo extrato partiu-se para a fração com clorofórmio, obtendo halos de 8,8 a 12,1 mm respectivamente às concentrações de 50 e 300 mg/mL. Foi atribuída tal ação à presença de compostos fenólicos tais como taninos e flavonoides, ambos detectados no extrato metanólico e apenas o segundo na fração clorofórmica em baixa quantidade. Os mesmos compostos foram identificados em Ext-EtOH-Am avaliado neste trabalho. Essa atribuição foi justificada pela

capacidade de desarranjar a membrana citoplasmática da bactéria pela coagulação proteica provocada pelos taninos, e os flavonoides dificultando a permeabilidade da parede celular bacteriana.

Em relação às cepas *Staphylococcus* coagulase negativos, uma delas, a AM 1162 apresentou um halo de inibição na ordem de 11 mm na concentração de 10 mg/poço. Enquanto que em relação às outras duas cepas, AM 235 e AM 1198, o extrato demonstrou-se ativo nas maiores concentrações e pouco ativos nas menores, com halos de 15 mm e 12 mm (a 10 mg/poço e 5 mg/poço, respectivamente) para a primeira e de 15 e 11 mm (a 10 mg/poço e 5 mg/poço, respectivamente) para a última, também no mesmo estudo efetuado por Li et al. (2013) também atribuiu atividade inibitória contra *Staphylococcus epidermidis* (uma espécie de estafilococo coagulase negativo) à (+)-anonáina.

Em contrapartida, quando verificada sua atividade frente às cepas Gram-negativas, o extrato apresentou atividade em apenas duas delas, *Salmonella typhimurium* serovar *choleraesuis* AM 1280, com halos de 13 mm na maior concentração e frente à *Proteus mirabilis* AM 1115 com uma baixa atividade, apresentando um halo de inibição de 11 mm na maior concentração (10 mg/poço). Em um estudo realizado por Prachi (2010) utilizando extrato metanólico das folhas encontrou ação antimicrobiana frente à *S. typhimurium* (ATCC 23564) e *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) atribuindo essa ação aos taninos presentes, visto que os mesmos já foram reportados por possuir propriedades antibacterianas, diferentemente dos alcaloides para os Gram-positivos, ao passo de que Vijayameena et al. (2013) observaram atividade frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, todas as cepas adquiridas do Departamento de Microbiologia do Sri Sankara Arts and Science College, Enathur/Índia.

Os estudos realizados por Haro et al. (2014) demonstraram atividade do extrato metanólico frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922), obtendo um halo de 15,3 mm na concentração de 300 mg/mL, já a fração clorofórmica do extrato exibiu um halo de 11,5 mm na mesma concentração de 300 mg/mL sugerindo tais atividades relacionadas aos taninos e flavonoides (extrato metanólico) e somente aos flavonoides tratando-se de sua fração clorofórmica, sendo então a ação dos taninos responsável por destruir a membrana citoplasmática bacteriana coagulando suas proteínas e os flavonoides por danificar a permeabilidade da parede celular, justificando uma ação sinérgica entre os dois componentes.

O extrato não apresentou atividade frente aos fungos leveduriformes testados. Para todos os experimentos realizados, os antimicrobianos padrões confirmaram o perfil de sensibilidade/resistência das bactérias ensaiadas.

As concentrações mínimas inibitórias confirmaram os resultados preliminares obtidos pela técnica de poços. Diante disso, foi notada atividade frente à cepa Gram-negativa *Salmonella choleraesuis* AM 1280, com CMI de 125 µg/mL. Para as cepas de *Staphylococcus aureus* AM 103, *Staphylococcus* coagulase-negativa AM 235 e *Micrococcus luteus* AM 1200, o extrato também foi ativo, estabelecendo CMI de 500 µg/mL. Já em relação às cepas *Staphylococcus aureus* AM 106 e *Staphylococcus* coagulase-negativa AM 1162, Ext-EtOH- Am apresentou moderada atividade, com CMI $\geq$ 1000 µg/mL. Até o presente momento não foram encontrados estudos mais aprofundados da análise antimicrobiana por CMI.

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana do Extrato Etanólico de *Annona muricata* L. frente cepas padrão e de interesse clínico.

CEPA ¹	HALOS DE INIBIÇÃO (mm)							
	10 mg/poço	DP	5 mg/poço	DP	Padrões*	DP	CMI**	DP
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 103	13	1,0	12	2,0	34	4,0	1000	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 106	14	2,0	12	3,0	35	2,0	1000	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 1235	12	3,0	--	0	35	1,0	NT	0
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 235	15	2,0	12	0	35	5,0	1000	1,0
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1162	11	1,0	--	0	32	1,0	NT	0
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1198	15	1,0	11	1,0	20	3,0	1000	1,0
<i>Micrococcus luteus</i> AM 1200	19	2,5	16	3,0	50	2,0	500	1,0
<i>Escherichia coli</i> AM 251	--	0	--	0	35	0	NT	0
<i>Escherichia coli</i> AM 1181	--	0	--	0	40	3,0	NT	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 342	--	0	--	0	32	4,0	NT	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 411	--	0	--	0	38	1,0	NT	0
<i>Salmonella choleraesuis</i> AM 1280	13	3,0	10	2,0	31	3,0	500	1,0
<i>Salmonella</i> sp. AM 1282	--	0	--	0	34	5,0	NT	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 457	--	0	--	0	--	0	NT	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 458	--	0	--	0	24	2,0	NT	0
<i>Proteus mirabilis</i> AM 1115	11	3,0	--	0	43	3,0	NT	0
<i>Candida albicans</i> AM 1284	--	0	--	0	--	0	NT	0
<i>Candida albicans</i> AM 1288	--	0	--	0	19	4,0	NT	0

1: AM – Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas - UFPE; * Padrões utilizados: Tetraciclina 30 µg (Gram-positivas); Ceftriaxona 30 µg (Gram-negativas); Cetoconazol (Leveduras); --: Sem halo de inibição; **Concentração Mínima Inibitória em µg/ml; DP: Desvio padrão amostral; NT: Não testado.

Tratando-se do Extrato Aquoso de *Annona muricata* (Ext-H₂O-Am) observou-se atividade frente às cepas Gram-positivas, entretanto frente às Gram-negativas, o extrato demonstrou pouca ou nenhuma atividade. Assim como o extrato não exibiu nenhuma atividade frente às leveduras (Tabela 9).

Os halos de inibição foram de ativos a muito ativos para as cepas Gram-positivas, para as cepas de *Staphylococcus aureus*, houve uma baixa atividade frente à cepa AM 103 -- apresentando um halo de apenas 10 mm na concentração de 10 mg/poço -- já para a AM 106 apresentou halos na ordem de 14 e 12 mm para a maior e menor concentração respectivamente, enquanto para *S. aureus* AM 1235 exibiu um halo de 13 mm na concentração de 10 mg/poço, em contrapartida com o achado no Ext-EtOH-Am, nesse não houve a detecção de alcaloides em sua composição, ao contrário do encontrado por Li et al. (2013) onde os mesmos citaram a respeito da (+)-anonáina. Assim como o descrito a respeito do estudo de Prachi (2010) lançando mão do extrato aquoso de suas folhas, também não detectou a presença de alcaloides no mesmo, atribuiu -- como o fizera no extrato metanólico -- a taninos.

Enquanto para as estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativo os resultados demonstraram-se mais expressivos, sobretudo em relação a cepa AM 1198, onde ocorreram halos de inibição de 18 mm para a concentração de 10 mg/poço e 16 para 5 mg/poço, enquanto a cepa AM 235 exibiu halos de 15 e 12 mm para a maior e menor concentração respectivamente, a estirpe AM 1162 apresentou apenas halo na concentração de 10 mg/poço (12 mm). Já para a cepa de *Micrococcus luteus* AM 1200 o extrato apresentou halos de 15 e 12 mm nas concentrações de 10 e 5 mg/poço respectivamente, assim como relatado para o extrato etanólico -- para as cepas de *Staphylococcus epidermidis* (coagulase negativo) e *M. luteus* --, sugere-se que a inibição do crescimento seja devido a presença de compostos fenólicos tais como flavonoides e taninos, tal como relatado por Prachi (2010), detalhado por Paulo et al. (1992).

Dentre as Gram-negativas, apenas *Salmonella typhimurium* sorovar *choleraesuis* AM 1280, *Pseudomonas aeruginosa* AM 457 e *Proteus mirabilis* AM 1115, exibiram halos de inibição, porém somente a AM 1280 apresentou halo de inibição relevante (considerado ativo) demonstrando um halo de 14 mm (10 mg/poço) e 11 mm (5 mg/poço), as cepas AM 457 e AM 1115 apresentaram halos somente na maior concentração na ordem respectiva de 10 e 12 mm. Segundo Prachi (2010), as atividades do extrato aquoso frente a bactérias Gram-

negativas se deu pela presença de taninos, demonstrando atividade frente a *S. typhimurium* (ATCC 23564) e *Proteus vulgaris* (ATCC 13315). Ao passo de que Vijayameena et al. (2013) estudaram também a atividade do extrato aquoso e registraram que o mesmo demonstrou ação frente a Gram-negativos tais como *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, sendo todas as cepas originadas do Departamento de Microbiologia do Sri Sankara Arts and Science College, Enathur/Índia, o extrato apresentou flavonoides, taninos e terpenoides como constituintes e reportou a ausência de alcaloides.

A respeito da concentração mínima inibitória (CMI), o extrato aquoso de *Annona muricata* apresentou pouca atividade frente às cepas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* AM 106 e AM 1235 (CMI de 1000 µg/mL). Enquanto para as cepas de *Staphylococcus coagulase-negativa* AM 235 e AM 1198 apresentaram CMI na ordem de 1000 e 500 µg/mL. As concentrações mínimas que inibiram o crescimento estiveram entre 250 e 500 µg/mL respectivamente. Para *Micrococcus luteus* AM 1200, observou-se CMI de 500 µg/mL.

Apenas uma das cepas Gram-negativas foi testada com o extrato aquoso, *Salmonella typhimurium* serovar *choleraesuis* AM 1280, o qual exibiu uma CMI na ordem de 500 µg/mL. Até o presente momento não foram encontrados estudos mais aprofundados da análise antimicrobiana por CMI.

Tabela 9 - Atividade antimicrobiana do Extrato Aquoso de *Annona muricata* L. frente cepas padrão e de interesse clínico.

CEPA ¹	HALOS DE INIBIÇÃO (mm)							
	10 mg/poço	DP	5 mg/poço	DP	Padrões*	DP	CMI**	DP
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 103	10	3,0	--	0	37	2,0	NT	0
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 106	14	1,0	12	2,0	38	5,0	1000	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 1235	13	2,0	--	0	39	4,0	1000	1,0
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 235	15	4,0	11	2,0	39	1,0	1000	1,0
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1162	12	4,0	--	0	33	2,0	NT	0
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1198	18	3,0	16	3,0	29	3,0	500	0
<i>Micrococcus luteus</i> AM 1200	15	2,0	12	2,0	45	0	500	0
<i>Escherichia coli</i> AM 251	--	0	--	0	36	1,0	NT	0
<i>Escherichia coli</i> AM 1181	--	0	--	0	38	1,0	NT	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 342	--	0	--	0	37	3,0	NT	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 411	--	0	--	0	32	4,0	NT	0
<i>Salmonella choleraesuis</i> AM 1280	14	1,0	11	1,0	32	3,0	500	0
<i>Salmonella</i> sp. AM 1282	--	0	--	0	34	2,0	NT	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 457	10	1,0	--	0	--	0	NT	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 458	--	0	--	0	25	5,0	NT	0
<i>Proteus mirabilis</i> AM 1115	12	0	--	0	44	1,0	NT	0
<i>Candida albicans</i> AM 1284	--	0	--	0	21	0	NT	0
<i>Candida albicans</i> AM 1288	--	0	--	0	--	0	NT	0

1: AM – Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas - UFPE; * Padrões utilizados: Tetraciclina 30 µg (Gram-positivas); Ceftriaxona 30 µg (Gram-negativas); Cetoconazol (Leveduras); --: Sem halo de inibição; **Concentração Mínima Inibitória em µg/mL; DP: Desvio padrão amostral; NT: Não testado.

5.3. Estudos de Atividade Citotóxica dos extratos de *Annona muricata* L.

Na tabela 10, pode-se observar os dados obtidos com seus respectivos desvios-padrão amostrais. Nos resultados é notada uma intensa capacidade de inibição do crescimento celular dos extratos, particularmente quando se trata da linhagem celular HEp-2, onde todos os extratos apresentaram uma inibição em 100% da população de células testadas, assim como os antineoplásicos usados como controle. Já a respeito da linhagem NCI H292, houve uma diversidade tratando-se da inibição, onde observamos os extratos hexânico, etanólico e aquoso apresentando uma porcentagem de inibição de 71,90, 72,69 e 73,05 respectivamente; ao passo de que o extrato acetato de etila exibiu inibição de 100% da população celular, este em correspondência com o padrão.

Tabela 10 - Resultados da Atividade Citotóxica dos Extratos das Folhas de *Annona muricata* L. expressos em porcentagem de inibição da viabilidade celular.

Amostras	HEp-2		NCI H292		HL60	
	% de inibição	DP	% de inibição	DP	% de inibição	DP
Ext-Hex-Am	100	3,00	71,90	3,65	100	2,15
Ext-AcOEt-Am	100	3,01	100	3,65	102,60	1,43
Ext-EtOH-Am	100	2,70	72,69	1,76	98,83	0,52
Ext-H₂O-Am	100	2,25	73,05	1,82	95,62	5,12
Cisplatina	100	2,37	85,59	2,20	96,04	1,10
Doxorrubicina	100	5,71	100	5,26	100	0,20

HEp-2: linhagem de células tumorais de laringe; NCI-H292: linhagem de células tumorais de pulmão; HL-60: linhagem de células tumorais de cólon uterino; Ext-Hex-Am: Extrato Hexânico de *Annona muricata* L.; Ext- AcOEt: Extrato Acetato de Etila de *A. muricata* L.; Ext-EtOH-Am: Extrato Etanólico de *A. muricata* L.; Ext- H₂O-Am: Extrato Aquoso de *A. muricata* L.; DP: Desvio-padrão.

Todos os extratos apresentaram citotoxicidade para as linhagens testadas. Em relação à linhagem HL60 os extratos apresentaram altas porcentagens de inibição, tendo os extratos elucidando inibição de 100, 102,60, 98,83 e 95,62% para os extratos hexânico, acetato de etila, etanólico e aquoso concomitantemente. Os últimos correspondendo com a ação dos padrões cisplatina e doxorrubicina que demonstraram inibição respectiva de 96,04 e 100% dentro do coeficiente de variação.

Para a linhagem celular HEp-2, foram relatadas atividades inibitórias com o extrato metanólico das folhas de *A. muricata*, exibindo uma concentração inibitória

mínima (IC₅₀) de 54,92 µg/mL, o mesmo estudo encontrou uma IC₅₀ 24,94 µg/mL frente a linhagem NCI H292 (DE MELO et al., 2010).

Enquanto que outro estudo investigou a atividade citotóxica de extratos hexânico, acetato de etila e metanólico do pericarpo de *A. muricata* contra linhagens de células isoladas de linfoma histocístico (U 937) usando o mesmo método do MTT, demonstrou que o extrato acetato de etila foi o mais ativo até mesmo, sendo ele posteriormente fracionado encontrando em seguida três acetogeninas: annonacina, annonacina A e annonamuricina, tendo a ação antiproliferativa atribuída às moléculas isoladas (JARAMILLO et al., 2000).

Paul et al. (2013) encontraram uma inibição do crescimento das linhagem celular HeLa (câncer cervical) na ordem de 80% quando testado o extrato metanólico das folhas, e obteve uma IC₅₀ de 50,74 µg/mL ao passo de que apresentou 67,73 µg/mL para a linhagem PC3 (câncer prostático), foi feito um estudo de *docking* destacando o potencial citotóxico da anonamina, outra acetogenina anonácea. Enquanto que numa investigação conduzida por Sun et al. (2014) utilizando frações aquosa/acetônica do fruto pulverizado de *A. muricata*, chegaram ao isolamento de três novas acetogeninas: muricina J, K e L. Estas moléculas apresentaram ação inibitória frente a linhagem PC3.

Foi-se demonstrado também que os extratos etanólico e aquoso das folhas de *Annona muricata* L. agiram contra células de carcinoma de ascite Ehrlich (EACC) e linhagens de células esplênicas normais, tendo sido o extrato etanólico avaliado isoladamente contra linhagens de células de adenocarcinoma pleural (SKBR3) e câncer mamário (MDA), contudo o extrato etanólico foi o único que mostrou alguma ação (GAVAMUKULYA et al., 2014). Entretanto em outra investigação, esta realizada em Gana, encontrou ação inibitória do extrato aquoso frente a células de linhagem prostática (BPH-1), esta ação foi atribuída ao *upregulation* do gene Bax e *downregulation* do gene Bcl-2, sugerindo um mecanismo de ação apoptótico do extrato.

Em Taiwan foi relatado além do *upregulation* do gene Bax, também para proteína p53, sendo que este último atribui tais ações a (-)-annonaína (ASARE et al., 2014; LI et al., 2013). Li et al. (2013) ao estudar a ação do alcaloide (-)-anonaína, encontraram atividade frente a linhagens tais como HeLa, HepG2 e H1299, sugerindo através de pesquisa bibliográfica que além dos efeitos frente aos genes Bax, Bcl-2 e a proteína p53, houve também a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), todos esses mecanismos

convergiendo para a indução da morte celular.

Torres et al. (2013) demonstraram que as cápsulas de suplemento contendo folhas e caule pulverizados de *A. muricata* apresentaram IC₅₀ de 200 e 73 µg/mL para as linhagens pancreáticas FG/COLO357 e CD18/HPAF respectivamente. Enquanto Ko et al. (2011) ponderou a atividade da annonacina frente à linhagem MCF-7 (adenocarcinoma celular humano) ERα-positiva, possuindo esta molécula propriedade de agir no ciclo celular, sobretudo na fase G₀/G₁, quando associada ao 4-hidróxitamoxifeno houve uma redução da expressão da proteína ERα.

Além das propriedades citotóxicas citadas, o trabalho de Owolabi et al. (2013) demonstrou que os óleos essenciais das folhas de *A. muricata* exibiu ação citotóxica frente a células de linhagem MCF-7, com inibição celular de 99,2% ± 0,1% com uma concentração de 100 µg/mL, o grupo de pesquisa conferiu tal atividade aos componentes majoritários do óleo: (*E*)-cariofileno, eugenol e δ-cadineno.

George et al. (2012) relataram atividade citotóxica do extrato *n*-butanólico das folhas frente a linhagens MDA-MB-435S (carcinoma mamário humano) e HaCaT (célula queratinóide imortalizada humana), os quais atribuíram tal ação a flavonóis, polifenóis e flavonas. Gavamukulya et al. (2014) apesar de terem encontrado diversos metabólitos secundários tais como alcaloides, esteróis, flavonoides, terpenoides, cumarinas, antraquinonas, lactonas e saponinas, tanto no extrato etanólico como no aquoso, a atividade citotóxica foi atribuída a outra classe de compostos, as acetogeninas anonáceas, sendo esta classe não detectável por métodos de *screening* fitoquímicos convencionais.

A respeito das acetogeninas, há uma grande predominância destas em várias partes de plantas da família *Annonaceae*, tal como com *A. muricata*, Gajalakshmi et al. (2012) listaram que algumas destas substâncias estão presentes nas sementes, raízes e folhas. Nestas últimas foram isoladas a partir dos extratos etanólicos a muricoreacina, annohexocina e muricohexocina C. O mesmo estudo identificou outras acetogeninas isoladas de extratos alcoólicos (etanol e metanol) das sementes (annomuricatocina B e C, annonacina A, annomuricatocina A e clonhexocina). A partir do extrato metanólico das raízes também foram encontradas 6 acetogeninas, dentre elas as cohibinas A e B (GAJALAKSHMI; VIJAYALAKSHMI; DEVI RAJESWARI, 2012; GLEYE et al., 1997, 1998).

As acetogeninas também foram avaliadas após seu isolamento de extratos de *A.*

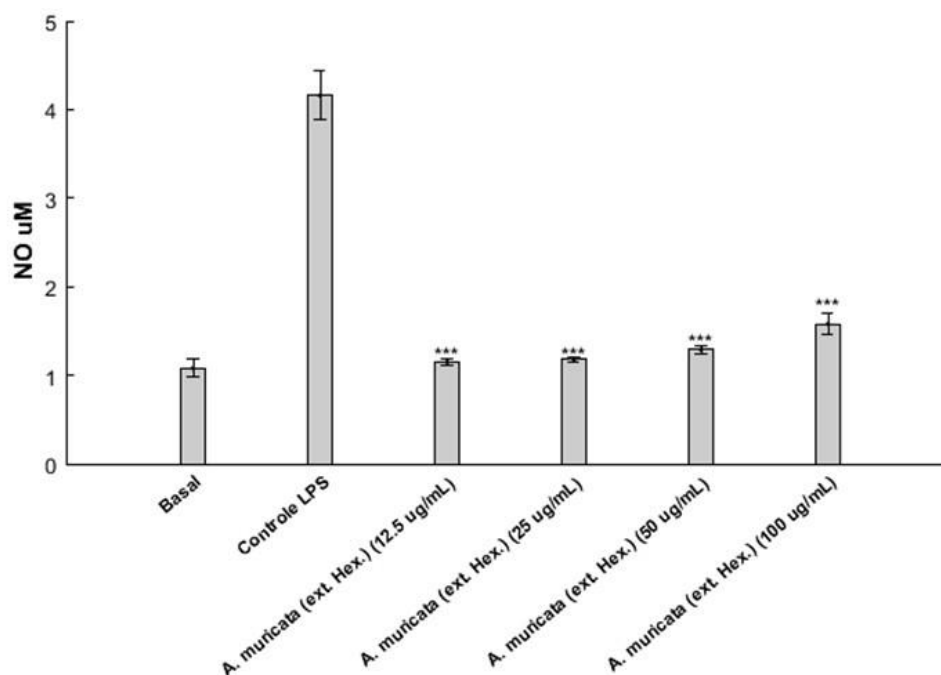
muricata utilizando como solventes hexano, etanol e metanol, dentre várias acetogeninas, a annonacina apresentou uma intensa atividade citotóxica, sobretudo na fase de mitose durante o ciclo celular (RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990). Enquanto Kojima & Tanaka (2009) avaliando a síntese e variações estruturais de acetogeninas, dentre elas a corossolona e a solamina, encontraram uma inibição de crescimento em 100% das células nas concentrações de 68 e 24 µg/mL para HL-60 e 31 e 59 µg/mL para K562 (leucemia mielóide humana) respectivamente, correspondendo também ao encontrado por Liaw et al. (2002). À medida de que a partir dos extratos hexânico, acetato de etila, etanólico e metanólico das folhas foi isolada a Annomuricina E, a qual demonstrou IC₅₀ 1,62 µg/mL para a linhagem HT-29, bem como evidenciaram a ação sobre o ciclo G₁ e sua atuação como indutora da ação das caspases 3,7 e 9 gerando um mecanismo de apoptose (ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2014, 2015).

Os estudos reforçam a universalidade da distribuição das acetogeninas em diferentes solventes extrativos, além de que foi feita uma análise comparativa da citotoxicidade de 10 diferentes acetogeninas anonáceas através do painel NCI-60 (NCI, 1955), demonstrando uma similaridade nos valores de IC₅₀ para cada uma (FANG et al., 1993), podendo assim ser justificado os valores próximos dos resultados obtidos neste trabalho.

5.4. Resultados da Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória dos extratos de *Annona muricata* L.

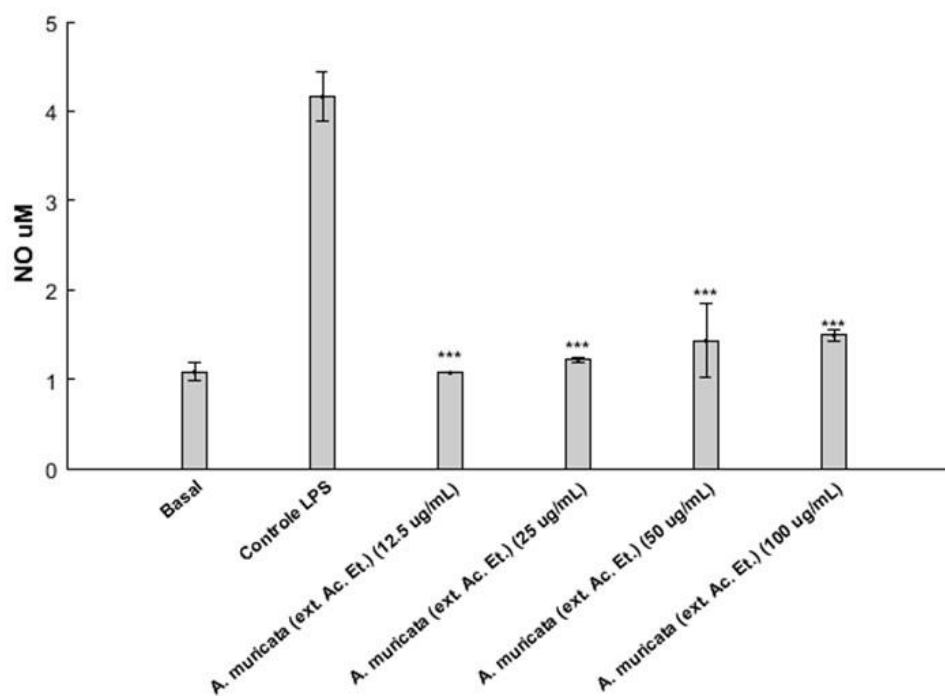
A avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de *A. muricata* L. foi realizada a fim de mensurar sua capacidade de inibição da síntese de NO por macrófagos induzidos por LPS. Os resultados estão descritos nas Figura 2, 3, 4 e 5, onde foram testadas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL para cada extrato (hexânico, acetato de etila, etanólico e aquoso), todos os extratos avaliados em todas suas respectivas concentrações não apresentaram efeitos citotóxicos frente aos macrófagos. Estes resultados apresentaram significância estatística ($p < 0,0001$) para todos os extratos.

Figura 5 - Efeito do extrato Ext-Hex-*Am* sobre os níveis de óxido nítrico no exsudato inflamatório.



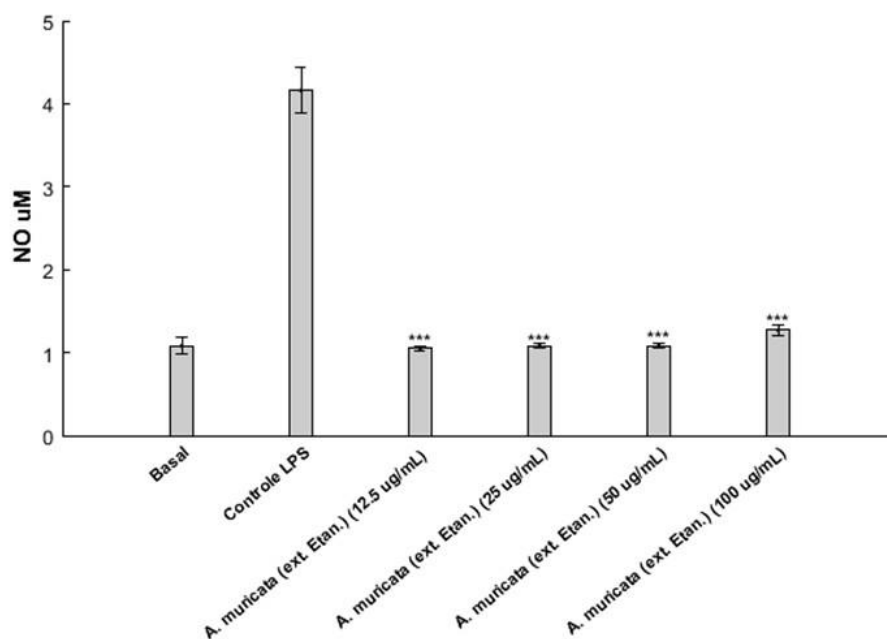
Valores expressos em média ± DP (n = 3), *** p < 0,0001 v.s controle. ANOVA, teste de Bonferroni.

Figura 6 - Efeito do extrato Ext-AcOEt-*Am* sobre os níveis de óxido nítrico no exsudato inflamatório.



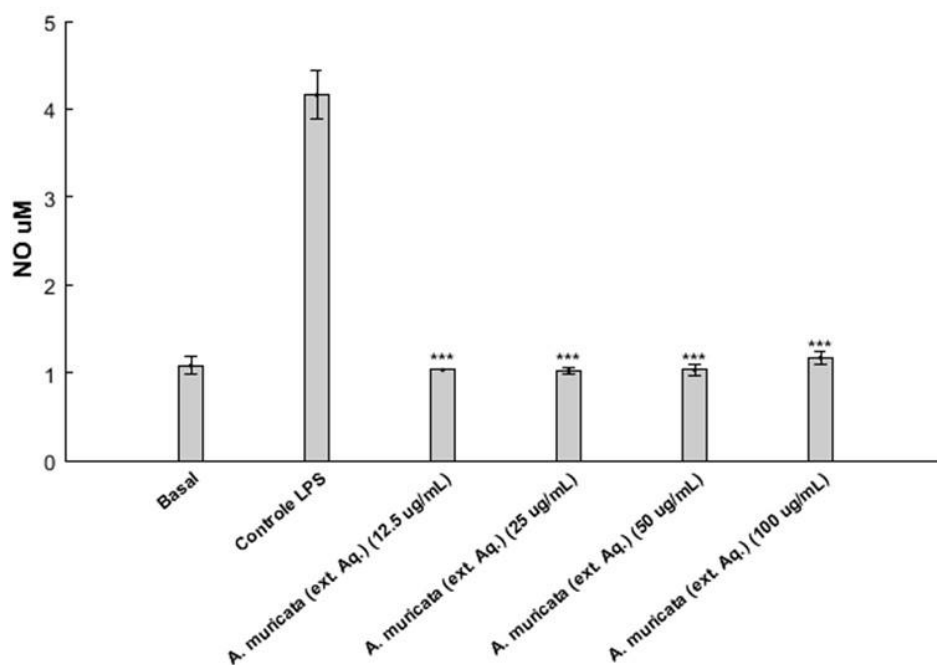
Valores expressos em média ± DP (n = 3), *** p < 0,0001 v.s controle. ANOVA, teste de Bonferroni.

Figura 7 - Efeito do extrato Ext-EtOH-Am sobre os níveis de óxido nítrico no exsudato inflamatório.



Valores expressos em média ± DP (n = 3), *** p < 0,0001 v.s controle. ANOVA, teste de Bonferroni.

Figura 8 - Efeito do extrato Ext-H₂O-Am sobre os níveis de óxido nítrico no exsudato inflamatório.



Valores expressos em média ± DP (n = 3), *** p < 0,0001 v.s controle. ANOVA, teste de Bonferroni.

O NO é um importante agente mediador da resposta inflamatória, tanto nas fases aguda quanto na crônica, agindo como um potente vasodilatador. Usualmente seu envolvimento se relaciona com a capacidade de aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos possibilitando a formação de edemas justamente devido a alteração da circulação sanguínea local, estimulando também a atividade da COX, e levando a uma exarcebada produção de prostaglandinas (SALVEMINI et al., 1993).

Normalmente se aceita que a lesão tecidual ocorrida em processos inflamatórios é atribuída a infiltração de neutrófilos e macrófagos, posteriormente pela produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como os produtos da via do ácido araquidônico, ROS e enzimas. Por conseguinte, vários fármacos anti-inflamatórios têm como mecanismo de ação a inibição da função de macrófagos e neutrófilos (SALVEMINI et al., 1996). Nos resultados nota-se que houve uma inibição significativa da produção de NO em todos os extratos avaliados, os quais reduziram sua produção a níveis basais nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL. Os macrófagos presentes em processos inflamatórios expressam invariavelmente a isoforma indutível de óxido nítrico sintase (iNOS) a qual gera uma maior produção de NO, que desempenha um papel bastante diverso na inflamação que atua desde um aumento da permeabilidade vascular até a formação de edema de tecido citotóxico (MONCADA et al., 1991). Neste trabalho, os extratos de *A. muricata* inibiram significativamente a produção de NO, entretanto não foi visualizado efeito dose dependência em Ext-EtOH-*Am* e Ext- H₂O-*Am* na produção de NO.

Enquanto um estudo realizado por Quilez et al. (2015) evidenciou uma inibição dose- dependente da produção de NO do decocto das folhas de *A. Muricata* L. nas concentrações de 100, 200 e 500 µg/mL. Entretanto, no estudo realizado por Nunes et al. (2011) o extrato aquoso dos frutos de *A. muricata* L. demonstrou uma inibição mínima da produção de NO numa concentração de 500 µg/mL, sugerindo que em altas concentrações, o extrato possa induzir sua produção em contrapartida a menores concentrações. Segundo os autores, o mecanismo pelo qual os extratos inibem o NO aparenta estar envolvido na redução da indução da iNOS.

Os extratos Ext-AcOEt-*Am*, Ext-EtOH-*Am* e Ext-H₂O-*Am* exibiram a presença de flavonoides, enquanto o Ext-Hex-*Am* apresentou menos bandas destes compostos, porém com abundância de terpenoides. Por conseguinte sugere-se que a atividade inibidora da formação de NO ocorra por ação sinérgica entre diversos compostos, sobretudo

flavonoides, taninos e terpenoides.

Certos derivados de flavonoides demonstram atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*. Foi revelado que algumas flavonas e flavonóis demonstraram atividade inibitória sobre a produção de iNOS, por meio de supressão de sua indução. Entre os derivados citados, incluindo compostos prenilados como morusina, kuwanona C, e D e biflavonoides tais como bilobetina e ginkgetina inibiram a produção de NO a partir de células RAW induzidas por LPS em concentrações > 10 μ M. A inibição da produção de óxido nítrico foi mediada através supressão da enzima iNOS, mas não por inibição direta da atividade da enzima iNOS. Uma vez que o NO produzido pela iNOS desempenha um papel importante em doenças inflamatórias, a inibição da produção de NO por estes flavonoides contribuem, ao menos parcialmente, para o seu potencial anti-inflamatório (CHEON et al., 2000).

Enquanto que a inibição de iNOS por taninos foi descrita, em parte, devido à sua interferência na sua ativação pela calmodulina. É improvável que o tanino deslocaria a calmodulina a partir do seu domínio de ligação, sobretudo da iNOS. Mas pode evitar que a mudança de conformação que ocorre durante a interação de calmodulina com as várias isoformas de NOS (CHIESI; SCHWALLER, 1995).

Alguns autores relataram a ação anti-inflamatória também de terpenoides, tais como o celastrol, o qual reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ em macrófagos humanos. Tal substância não teve nenhum efeito sobre a produção de NO na ausência de $\text{IFN-}\gamma$ e estimulação com LPS, porém inibiu fortemente quando induzido por estas citocinas (ALLISON et al., 2001). Também foi registrado que lactonas sesquiterpênicas, estruturalmente diferentes, as quais possuam um grupamento α -metileno- γ -lactona e um grupo carbonila conjugado, reduzem a produção das citocinas citadas, incluindo IL-6 no exsudato peritoneal de modelos murinos (KOCH et al., 2001).

6. CONCLUSÃO

- ✓ Do ponto de vista fitoquímico, *A. muricata* exibiu neste trabalho uma presença de diversas classes de metabólitos importantes tais como taninos, flavonoides, cumarinas, triterpenos e esteróis, mono e sesquiterpenos, sobretudo de alcaloides os quais estão envolvidos com uma grande variedade de propriedades biológicas;
- ✓ Nos ensaios de atividade antimicrobiana, os extratos apresentaram uma moderada atividade frente a diversas cepas testadas, sejam isolados clínicos ou cepas padrão. Tais ações foram atribuídas a uma variedade de compostos como flavonoides, taninos e alcaloides, estes presentes em certa abundância. Porém as propriedades não foi densamente explorada, particularmente em estudos envolvendo CMI e com mais cepas de origem de isolados clínicos;
- ✓ Ao observar os resultados dos ensaios farmacológicos, *A. muricata* apresentou atividades citotóxicas e anti-inflamatórias, inibindo o crescimento celular em todas as linhagens avaliadas, bem como reduziu a níveis basais a produção do óxido nítrico – um importante mediador da resposta inflamatória –, sem apresentar citotoxicidade aos macrófagos, em todos os extratos testados, demonstrando assim um excelente potencial farmacológico e terapêutico;
- ✓ *A. muricata* é uma valiosa alternativa para a busca de novos agentes terapêuticos para diversas enfermidades e como fonte de moléculas de grande interesse científico. Sendo os resultados encontrados corroboraram com o seu uso tradicional, reforçando mais ainda sua comprovação científica a respeito de suas propriedades, possibilitando assim maiores estudos para a sua viabilidade terapêutica.

6.1. Perspectivas

- Dosear os metabólitos dos respectivos extratos e obter suas frações, sobretudo os mais ativos para chegar ao isolamento de compostos;
- Realizar ensaios de atividade antimicrobiana com mais cepas oriundas de isolados clínicos, especialmente *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistentes;
- Efetuar novos ensaios antifúngicos utilizando outras espécies de *Candida*;
- Prosseguir com novos estudos de atividade anti-inflamatória, como por exemplo, estudos de liberação de citocinas e ensaios *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABUBACKER, M. N.; DEEPALAKSHMI, T. In vitro Antifungal Potentials of Bioactive Compound Methyl Ester of Hexadecanoic Acid Isolated from *Annona muricata* Linn . (Annonaceae) Leaves. **BIOSCIENCES BIOTECHNOLOGY RESEARCH ASIA**, v. 10, n. 2, p. 879–884, 2013.
- AD HOC ADVISORY PANEL ON UNDEREXPLOITED TROPICAL PLANTS WITH PROMISING ECONOMIC VALUE; SCHULTES, Richard Evans; AYENSU, Edward S. **Underexploited tropical plants with promising economic value**. National Academy of Sciences, 1975.
- ADEWOLE, S.; CAXTON-MARTINS, E. Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic β -cells of streptozotocin-treated diabetic rats. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, n. 3, p. 173–187, 2006.
- ADEYEMI, D. O. et al. Anti hyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 1, p. 62–69, 2009.
- ADEYEMI, D. O. et al. Histomorphological and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with extracts of *Annona muricata*. **Folia Morphologica**, v. 69, n. 2, p. 92–100, 2010.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: Recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504–540, 1999.
- ALLISON, A. C. et al. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 25, n. 7, p. 1341–1357, 2001.
- ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, n. 4, p. 310–322, 2001.
- ALVES, T. M. DE A. et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367–373, 2000.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts and figures 2012**, 2012.

ARTHUR, F. K. . et al. Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona muricata* (Linn.) aqueous extract in animals. **European Journal of Experimental Biology**, v. 1, n. 4, p. 115–124, 2011.

ARUN JYOTHI, J. et al. Phytochemical and pharmacological potential of *Annona cherimola*-a review. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 439–447, 2011.

ASARE, G. A. et al. Antiproliferative Activity of Aqueous Leaf Extract of *Annona muricata* L. on the Prostate, BPH-1 Cells, and Some Target Genes. **Integrative Cancer Therapies**, v. 14, n. 1, p. 65–74, 2014.

BADRIE, N.; SCHAUSS, A. G. Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, Nutritional Value, Medicinal Uses, and Toxicology. **Bioactive Food in Promoting Health**, p. 621–643, 2010.

BAILEY, Liberty Hyde. **Manual of cultivated plants**. 1949.

BANDOW, J. E. et al. Proteomic Approach to Understanding Antibiotic Action Proteomic Approach to Understanding Antibiotic Action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 948–955, 2003.

BARROS, C. J. P. et al. A Convenient Synthesis And Cytotoxic Activity Of 3-Aryl-5-Pentyl-1, 2, 4-Oxadiazoles From Carboxylic Acid Esters And Arylamidoximes Under Solvent-Free Conditions. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 59, n. 1, p. 3–6, 2014a.

BARROS, M. E. S. B. et al. Synthesis and evaluation of (-)-Massoialactone and analogues as potential anticancer and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 291–300, 2014b.

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T. S. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, n. 5, p. 480–485, 2007.

BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 269–303, 2005.

BERNARDI, A. C. A.; PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 57–66, 2007.

BETANCUR-GALVIS, L. A. et al. Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 531–535, 1999.

BORGES, F. K. et al. Perfil dos pacientes colonizados por enterobactérias produtoras de KPC em hospital terciário de Porto Alegre, Brasil. **Clinical And Biomedical Research**, v. 35, n. 1, p. 20–26, 2015.

BORIES, Christian et al. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta medica**, v. 57, n. 5, p. 434-436, 1991.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141–148, 2008.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. 2011.

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ELBAZ, A. Possible relation of atypical parkinsonism In the French West indies with consumption of tropical plants : a case-control study. **Lancet**, v. 354, n. 9175, p. 281–286, 1999.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, 2009.

CASTRO, F. A. D. E. et al. Características físicas e químicas da graviola. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 19, n. 3, p. 361–365, 1984.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC et al. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 51, n. 26, p. 565, 2002.

CHANG, F. R.; WU, Y. C. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of natural products**, v. 64, n. 7, p. 925–931, 2001.

CHANG, S. et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1342-1347, 2003.

CHAUHAN, A.; MITTU, B. Phyto-Chemical Screening and Anti Listerial Activity of *Annona muricata* (L) Leaf Extract. **Journal of Chromatography & Separation Techniques**, v. 06, n. 03, 2015.

CHEON, Bong Sun et al. Effects of prenylated flavonoids and biflavonoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from the mouse macrophage cell line RAW 264.7. **Planta medica**, v. 66, n. 7, p. 596-600, 2000

CHIESI, M.; SCHWALLER, R. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. **Biochemical pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 495–501, 1995.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.

CONFORTI, F. et al. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 144–151, 2008.

CORDEIRO, D. N. DA G. **Significância Clínica da Presença de *Staphylococcus Coagulase-Negativo* Isolados de Recém-Nascidos de uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal em Brasília-DF**. [s.l.] Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical; Universidade de Brasília, 2007.

CORTÉS, D. et al. Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1475–1482, 1993.

CORTÉS, D.; FIGADERE, B.; CAVÉ, A. Bis-tetrahydrofuran acetogenins from annonaceae. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1467–1473, 1993.

CORTNER, J.; WOUDE, G. F. V. Essentials of molecular biology–cDNA libraries. **Cancer: Principles and practice of oncology**. DeVita VT Jr., Hellman S. and Rosenberg SA (ed), 5th ed, Lippincott–Raven Publishers, Philadelphia, 1997.

DAI, Y. et al. Selective growth inhibition of human breast cancer cells by graviola fruit extract in vitro and in vivo involving downregulation of EGFR expression. **Nutrition and cancer**, v. 63, n. 5, p. 795–801, 2011.

DAYEEF, A. Y. M.; KARYONO, S.; SUJUTI, H. The Influence Of *Annona muricata* Leaves Extract In Damaging Kidney Cell And Inducing Caspase-9 Activity. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 8, n. 5, p. 48–52, 2013.

DE LUNA, J. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199–206, 2005.

DE MELO, J. G. et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534–8542, 2010.

DE MENDONÇA, F. A C. et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 629–636, 2005.

DE SOUSA, M. A. et al. Hemoculturas Positivas de Pacientes da Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Escola de Goiânia-Go, Entre 2010 E 2013. **Estudos**, v. 41, n. 3, 2014.

DE SOUSA, O. V. et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 5, p. 2067–2078, 2010.

DEL FRESNO, A. Villar; CANAVATE, JL Rios. Alkaloids from *Annona cherimolia* seed. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 3, p. 438-438, 1983.

DI STASI, L. C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69–91, 2002.

DIGNANI; M. C.; SOLOMKIN.; J. S., ANAISSIE, E. *Candida*. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA (eds) Medical Mycology. 1ª Edição, Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239, 2003.

DINARELLO, C. A.; VAN DER MEER, J. W. M. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 469–484, 2013.

DOS SANTOS, A F.; SANT'ANA, A E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 115–120, 2001.

DURET, P. et al. Isolation and Structure of Three New Bis-Tetrahydrofuran Acetogenins from the Roots of *Annona cherimolia*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 7, p. 911–916, 1994.

EKALUO, U. B. et al. Protective role of soursop (*Annona muricata* L.) fruit on testicular toxicity induced by caffeine in albino rats. **Journal of Life Sciences Research and Discovery**, v. 1, p. 26–30, 2014.

EVANGELISTA, S. DE S.; OLIVEIRA, A. C. DE. *Staphylococcus aureus* metilina resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem - REBEn**, v. 68, n. 1, p. 136–143, 2015.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **Environmental Health**, v. 109, n. 1, p. 69–75, 2001.

FANG, X. et al. Annonaceous Acetogenins : An Updated Review. **Phytochemical Analysis**, v. 4, p. 27–48, 1993.

FERREIRA, L. E. et al. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 327–332, 2013.

FEY, P. D. et al. Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 196–203, 2003.

FIGUEIREDO, E. A. P. DE et al. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, p. 421–427, 2007.

FLORENCE, N. T. et al. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 784–790, 2014.

FOONG, C. P.; HAMID, R. A. Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1301–1307, 2012.

FOUQUÉ, A. Espèces fruitières d'amérique tropicale. **Fruits**, 1974.

GAJALAKSHMI, S.; VIJAYALAKSHMI, S.; DEVI RAJESWARI, V. Phytochemical and pharmacological properties of *Annona muricata*: A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 13–16, 2012.

GAVAMUKULYA, Y. et al. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. S355–S363, 2014.

GELATTI, L. C. et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501–506, 2009.

GEORGE, V. C. et al. Quantitative assessment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic leaf extract of *Annona muricata* Linn. in normal and immortalized human cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 2, p. 699–704, 2012.

GEURTS, F. Annonaceous fruits. **Royal Tropical Institute, Amsterdam**, 1981.

GILANI, A. H.; ATTA-UR-RAHMAN. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 43–49, 2005.

GLEYE, C. et al. Cohibins A and B, acetogenins from roots of *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1541–1545, 1997.

GLEYE, C. et al. cis -Monotetrahydrofuran Acetogenins from the Roots of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 5, p. 576–579, 1998.

GOLD, H. S.; MOELLERING JR., R. C. Antimicrobial-Drug Resistance. **Drug Therapy**, v. 335, n. 19, p. 1445–1453, 1996.

HAMID, R. A. et al. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 630–641, 2012.

HAMIZAH, S. et al. Chemopreventive potential of *Annona muricata* L leaves on chemically-induced skin papillomagenesis in mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 6, p. 2533–2539, 2012.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis**. 1998.

HARO, G.; UTAMI, N. P.; SITOMPUL, E. Study Of The Antibacterial Activities Of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves. **International Journal of PharmTech Research**, v. 6, n. 2, p. 575–581, 2014.

HASRAT, J. A. et al. Screening of medicinal plants from Suriname for 5-HT_{1A} ligands: Bioactive isoquinoline alkaloids from the fruit of *Annona muricata*. **Phytomedicine**, v. 4, n. 2, p. 133–140, 1997.

HEINRICH, M.; GIBBONS, S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 425–432, 2001.

HERMOSO, J. M. et al. The Spanish germplasm bank of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Acta Hort.(ISHS)**, v. 497, p. 201–224, 1999.

IBRAHIM, E. H. et al. The Influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting. **Chest**, v. 118, n. 1, p. 146–155, 2000.

ISHOLA, I. O. et al. Mechanisms of Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Fruit Extract in Rodents. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 12, p. 1375–1382, 2014.

JARAMILLO, M. C. et al. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 183–186, 2000.

JOHNNY, L. et al. Antifungal activity of selected plant leaves crude extracts against a pepper anthracnose fungus , *Colletotrichum capsici* (Sydow) butler and bisby (Ascomycota: Phyllachorales). **Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 20, p. 4157–4165, 2011.

JONES, R. N. Resistance Patterns Among Nosocomial Pathogens. **Chest**, v. 119, n. 2, p. 397–404, 2001.

KAMB, A.; KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 2, p. 161–5, 2005.

KHAN, M. R.; KORNINE, K.; OMOLOSO, A. D. Antibacterial activity of some Annonaceae. Part 1. **Fitoterapia**, v. 69, n. 4, p. 367–369, 1997.

KIM, G.-S. et al. Muricoreacin and murihexocin C, monotetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 565–571, 1998.

KO, Y. M. et al. Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor- α -related pathways in MCF-7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1283–1290, 2011.

KOBA, K. et al. Chemical Composition of *Hyptis pectinata* L., *H. lanceolata* Poit , *H. suaveolens* (L) Poit and *H. spicigera* Lam. Essential Oils from Togo. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 10, n. November 2014, p. 357–364, 2007.

KOCH, E. et al. Inhibition of inflammatory cytokine production and lymphocyte proliferation by structurally different sesquiterpene lactones correlates with their effect on activation of NF- κ B. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 795–801, 2001.

KOOIMAN, P. The constitution of the amyloid from seeds of *Annona muricata* L. **Phytochemistry**, v. 6, n. 12, p. 1665-1673, 1967.

KOJIMA, N.; TANAKA, T. Medicinal chemistry of annonaceous acetogenins: Design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3621–3661, 2009.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. **Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas**. Ed. Médica Panamericana, 2008.

KOTAKE, Y. et al. Detection and determination of reticuline and N-methylcoculaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 806, n. 1, p. 75–78, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. **Robbins e Cotran—Patologia**, p. 49-89, 2005.

LAGATOLLA, C. et al. Endemic Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Acquired Metallo- β -lactamase Determinants in European Hospital. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 535–538, 2004.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. ESBL-producing enterobacteria in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430–434, 2010.

LANNUZEL, A. et al. Atypical parkinsonism in Guadeloupe: A common risk factor for two closely related phenotypes? **Brain**, v. 130, n. 3, p. 816–827, 2007.

LEATEMIA, J. A.; ISMAN, M. B. Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. **Phytoparasitica**, v. 32, n. 1, p. 30–37, 2004.

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

LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J. et al. **Manual de microbiologia clinica**. 4^a. ed., Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires. Argentina, 1407p, 1987.

LI, H. T. et al. The pharmacological activities of (-)-anonaine. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8257–8263, 2013.

LIAW, C.-C. et al. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of natural products**, v. 65, n. 4, p. 470–475, 2002.

LIAW, C.-C. et al. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 15, p. 4767–4776, 2005.

LIMA, G. R. DE M. et al. Database survey of anti-inflammatory plants in South america: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 4, p. 2692–2749, 2011.

LIZANA, L. A.; REGINATO, G. Cherimoya. **Fruits of Tropical and Subtropical. Composition, properties and uses. Florida: Florida Science Source. Lake Alfred**, p. 131-148, 1990.

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

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Sour sop (*Annona muricata* L.) and sugar apple (*Annona squamosa* L.). **Nutrition & Food Science**, v. 42, n. 6, p. 434–441, 2012.

MAGADULA, J. J.; INNOCENT, E.; OTIENO, J. N. Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. **Journal of Medicinal Plants** ..., v. 3, n. 9, p. 674–680, 2009.

MARTIN, M. L. et al. Antispasmodic activity of benzyloquinoline alkaloids analogous to papaverine. **Planta medica**, v. 59, n. 1, p. 63–67, 1993.

MANICA, I. Taxonomia, morfologia e anatomia. **São José, AR; Souza, IVB; Morais, OM e Rebouças, TNH-Anonáceas, produção e mercado (Pinha, Graviola, Atemóia e Cherimólia). Vitória da Conquista, UESB\ DFZ**, p. 20-21, 1997.

MÉNAN, H. et al. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 131–136, 2006.

MICEK, S. T. et al. An international multicenter retrospective study of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 19, p. 1–8, 2015.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. Gastroprotective activity of *Annona muricata* leaves against ethanol-induced gastric injury in rats via Hsp70/Bax involvement. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 2099–2111, 2014.

MONCADA, S. R. M. J.; PALMER, R. M. L.; HIGGS, EA_. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal Plants of Brazil**. Algonac, Michigan, Reference Publications Inc., 2000.

MORTON, Julia Frances. Fruits of warm climates. **Fruits of warm climates**, 1987.

MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. **Características Botânicas das Principais Anonáceas e Aspectos Fisiológicos de Maturação**. Fortaleza, CE: [s.n.].

NAVON-VENEZIA, S. et al. Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum β -lactamases among members of the family Enterobacteriaceae at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and evaluation of diagnostic tests. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 1, p. 155-158, 2003.

NCI. **Screening Services – NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screen**. Disponível em: <<http://dtp.nci.nih.gov.gate2.inist.fr/branches/btb/ivclsp.html>>. Acesso em 16 jun. 2015.

NUNES, C. DOS R. et al. Inibição da produção de óxido nítrico e efeito citotóxico de extrato aquoso de *Annona muricata* L. **Perspectivas online**, v. 1, n. 2, p. 1–8, 2011.

NWOKOCHA, C. R. et al. Possible mechanisms of action of the hypotensive effect of *Annona muricata* (soursop) in normotensive Sprague–Dawley rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 11, p. 1436–1441, 2012.

OLIVEIRA, K. R. P. DE. **β -lactamases na família Enterobacteriaceae: Métodos de detecção e prevalência.** [s.l.] Dissertação de Mestrado em Medicina – Ciências Médicas; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

OKUMA, K. et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4289–4294, 2002.

OMOJA, V. U. et al. Ethnopharmacology Evaluation of the acute toxicity , phytochemical constituents and anti - ulcer properties of methanolic leaf extract of *Annona muricata* in mice. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 3, n. 1, p. 37–43, 2014.

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630–635, 2007.

OWOLABI, M. S. et al. The Cytotoxic Activity of *Annona muricata* Leaf Oil from Badagary, Nigeria. **American Journal of Essential Oil and Natural Product**, v. 1, n. 1, p. 1–3, 2013.

OYEDEPO, T. A. Hepatoprotective Activity of *Annona muricata* Leaf Extract against Paracetamol Induced Hepatotoxicity. **Journal of Advances in Scientific Research & Applications**, n. 1, p. 115–120, 2014.

PAARAKH, P.; CHANSOURIA, J.; KHOSA, R. Wound healing activity of *Annona muricata* extract. **Journal of Pharmacy Research ...**, v. 2, n. 3, p. 404–406, 2009.

PADMA, P. et al. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 81–83, 1998.

PADMA, P.; CHANSOURIA, J. P. N.; KHOSA, R. L. Hepatoprotective activity of *Annona muricata* Linn and *Polyalthia cerasoides* Bedd . **Ancient Science of Life**, v. 19, n. 1-2, p. 7–10, 1998.

PAPAC, R. J. Origins of cancer therapy. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 74, n. 6, p. 391–398, 2001.

PAUL, J. et al. Anti Cancer Activity on Graviola, an Exciting Medicinal Plant Extract vs Various Cancer Cell Lines and a Detailed Computational Study on its Potent Anti-Cancerous Leads. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 14, p. 1666–1673, 2013.

PAULO, M. D. Q. et al. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 39–41, 1992.

PHILIPOV, S. et al. Liriodenine from *Annona muricata* seeds. **Fitoterapia**, v. 65, p. 555, 1994.

PINTO, A. C. Q.; SILVA, E. M. Graviola para exportação: aspectos técnicos da produção. **Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária**. Secretaria de Desenvolvimento Rural-SRD. Programa de Apoio à Produção e Exporta. EMBRAPA-SPI. Brasília, DF, 1994.

PINTO, A. C. D. Q. et al. **Fruits for the Future 5: *Annona* species**. Southampton, UK: International Centre of Underutilised Crops, 2005.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. D. V.; MAAS, P. J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 281–293, 2004.

POOLE, K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 1, p. 12–26, 2004a.

POOLE, K. Resistance to β -lactam antibiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 17, p. 2200–2223, 2004b.

POPENOE, H. Lost crops of the incas: Little-known plants of the andes with promise for worldwide cultivation. 1989.

PRACHI, P. In Vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of the Leaves of *Annona muricata*. **International Journal of Pharma Research and Development**, v. 2, n. 5, p. 1–6, 2010.

QUILEZ, A. M. et al. Validation Of Ethnopharmacological Use As Anti-Inflammatory Of A Decoction From *Annona muricata* Leaves. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 12, n. 4, p. 14–20, 2015.

RAVAOMANARIVO, L. H. R. et al. Efficacy of seed extracts of *Annona squamosa* and *Annona muricata* (Annonaceae) for the control of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 10, p. 798–806, 2014.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. et al. An Analysis In-vitro of the Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Annona muricata* L. Seed and Pulp. **British Journal of Applied Science & Technology**, v. 5, n. 4, p. 333–341, 2015.

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

RIBEIRO, L. P. et al. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. **Crop Protection**, v. 62, p. 100–106, 2014.

RIESER, M. J. et al. Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 100–108, 1996.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of ethnopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 127-149, 1988.

RÍOS, M. E. F. **Estudo da atividade citotóxica e do potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L. (AMSA), em modelos experimentais in vitro e in vivo.** [s.l.] Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2013.

ROBLOT, F. et al. Two acetogenins from *Annona muricata* seeds. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 281–285, 1993.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: A review. **Journal of Natural Products (Lloydia)**, v. 53, n. 2, p. 237–278, 1990.

SACRAMENTO, C. K. DO et al. Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 329–331, 2003.

SAHPAZ, S. et al. Annosenegalin and annogalene : Two cytotoxic mono-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona senegalensis* and *Annona cherimolia*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 103–107, 1996.

SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 15, p. 7240-7244, 1993.

SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British journal of pharmacology**, v. 118, n. 4, p. 829, 1996.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 73–85, 2002.

SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 2, p. 325–332, 2007.

SHAH, A. A. et al. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 409-421, 2004.

SUN, S. et al. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 12, p. 2773–2776, 2014.

TAKAHASHI, J. A. et al. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. **Natural Product Research**, v. 20, n. 1, p. 37–41, 2006.

TERASAWA, L. B. **CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE CURITIBA - PARANÁ**. [s.l.] Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia; Universidade Federal do Paraná, 2015.

TORRES, M. P. et al. Graviola: A Novel Promising Natural-Derived Drug That Inhibits Tumorigenicity and Metastasis of Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo Through Altering Cell Metabolism. **Cancer Letters**, v. 323, n. 1, p. 29–40, 2013.

VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439–444, 2013.

VIERA, G. H. F. et al. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 3, p. 129–132, 2010.

VIJAYAMEENA, C. et al. Phytochemical screening and assessment of antibacterial activity for the bioactive compounds in *Annona muricata*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2013.

VILA-NOVA, N. S. et al. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corossolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 334–338, 2013.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 481–489, 2002.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 1996.

WANG, L.-Q. et al. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, n. 3, p. 561–565, 2002.

WATANABE, H. et al. Effects on Central Dopaminergic Systems of d-Coclaurine and d-Reticuline, extracted from *Magnolia salicifolia*. **Planta medica**, v. 42, n. 7, p. 213–222, 1981.

WÉLÉ, A. et al. Annomuricatin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, n. 10-11, p. 981–988, 2004.

WESTH, H.; ZINN, C. S.; ROSDAHL, V. T. An international multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 10, n. 2, p. 169–176, 2004.

WU, F.-E. et al. Muricatocins A And B, Two New Bioactive Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins From The Leaves Of *Annona muricata*. **Journal of natural products**, v. 58, n. 6, p. 902–908, 1995a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2010**. World Health Organization, 2010.

WU, F.-E. et al. Two New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins, Annomuricins A and B, From The Leaves Of *Annona muricata*. **Journal of natural products**, v. 58, n. 6, p. 830–836, 1995b.

WU, T. Y. et al. Isodesacetyluricin, an annonaceous acetogenin, specifically inhibits gene expression of cyclooxygenase-2. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 572–576, 2012.

YAMTHE, L. et al. Extracts from *Annona muricata* L. and *Annona reticulata* L. (Annonaceae) Potently and Selectively Inhibit Plasmodium Falciparum. **Medicines**, v. 2, p. 55–66, 2015.

YIGIT, H. et al. Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3881–3889, 2003.

YU, J.-G. et al. Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1689–1692, 1998.

ZENG, L. et al. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of natural products**, v. 59, n. 11, p. 1035–1042, 1996.

ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, S. et al. *Annona muricata* leaves induce G1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 277–289, 2014.

ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, S. et al. The Chemopotent Effect of *Annona muricata* Leaves against Azoxymethane-Induced Colonic Aberrant Crypt Foci in Rats and the Apoptotic Effect of Acetogenin Annomuricin E in HT-29 Cells: A Bioassay-Guided Approach. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. 28, 2015.