



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**BEATRIZ DE SOUSA E LIMA**

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI- INFLAMATÓRIA E ANTIBACTERIANA  
DOS EXTRATOS ETANÓLICO E HEXÂNICO DAS FOLHAS DA GRAVIOLEIRA**

*(Annona muricata L.)*

**FORTALEZA**

**2013**

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIBACTERIANA  
DOS EXTRATOS HEXÂNICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DA GRAVIOLEIRA**

*(Annona muricata L.)*

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial para  
obtenção do Título de Mestre em  
Bioquímica.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Dirce Fernandes  
de Melo.**

**Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Erika Freitas  
Mota.**

**FORTALEZA**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

S696          Sousa e Lima, Beatriz de.

Atividades antioxidante, anti- inflamatória e antibacteriana dos extratos etanólico e hexânico das folhas da gravioleira (*Annona muricata* L.) / Beatriz de Sousa e Lima. – 2013.

85 f. : il. color., ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.

Orientação: Prof. Dra. Dirce Fernandes de Melo. Coorientação: Prof. Dra. Erika Freitas Mota.

1. *Annona muricata* L. 2. Xilenos. 3. Ação antimicrobiana. 4. Ação antioxidante. I. Título.

---

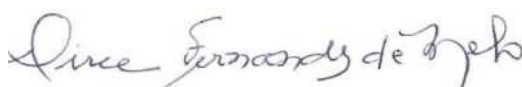
CDD 574.192

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS  
HEXÂNICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DA GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Dissertação aprovada em 05/03/2013.

**BANCA EXAMINADORA**



Prof<sup>ª</sup>. Dra. Dirce Fernandes de Melo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof<sup>ª</sup>. Dra. Erika Freitas Mota (Co-Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC



Pesquisadora Dra. Neuza Felix Gomes

Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof<sup>ª</sup>. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro

Universidade Estadual do Ceará – UECE

A Deus.

À minha família

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter me dado força, coragem e por ter iluminado meus caminhos para a realização deste trabalho;

Aos meus pais, por todo o amor, esforço, dedicação e incentivo durante toda essa caminhada, sempre me apoiando e motivando a seguir em frente;

Aos meus irmãos, Laiz, Aluisio e Ricardo, por toda a compreensão, paciência e amizade.

À Thaís e Beth, por toda a torcida e companhia nos muitos momentos de dificuldade;

À minha orientadora Dra. Dirce Fernandes de Melo do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, a quem agradeço a aceitação como orientanda e a quem tenho muita admiração pela grande capacidade e experiência acadêmica;

À minha co-orientadora Dra. Erika Freitas Mota do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, por sua orientação, sugestões, auxílio e dedicação para a realização deste trabalho;

A Professora Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, pela contribuição na realização do presente trabalho e por ter aceitado convite para participar desta banca;

A Dra. Neuza Félix Gomes, por toda a experiência, apoio, paciência, amizade e por ser essa pessoa tão querida e abençoada;

Aos amigos do laboratório de Bioenergética, por todos os momentos alegres, conversas e brincadeiras e por sempre manterem um clima harmonioso e agradável de trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão  
uma gota de água no mar.*

*“Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

*Madre Tereza de Calcutá*

## RESUMO

A gravioleira (*Annona muricata L.*) é uma árvore da família *Annonaceae* largamente distribuída em todas as regiões tropicais do mundo, produz fruto conhecido como graviola e suas folhas são usadas na medicina tradicional como fitoterápicos. Alguns compostos presentes na *A. muricata* já foram relacionados com as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana dessa planta. Esse trabalho teve por objetivos avaliar as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana dos extratos hexânico (EH) e etanólico (EE) das folhas de gravioleira. Para tanto, foram utilizadas folhas de gravioleira para o preparo dos extratos utilizados em análises da composição fitoquímica, da capacidade antioxidante total, ensaios de edema de orelha *in vivo* e da atividade antibacteriana *in vitro*. Para a análise da atividade antioxidante dos extratos hexânico e etanólico foram determinados os polifenóis totais, flavonoides amarelos e antocianinas totais e a capacidade antioxidante total pelos métodos ABTS●+ e DPPH. Para avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos, foi utilizado o modelo de edema de orelha induzido por xileno ou TPA em camundongos (Swiss fêmeas, 25-35g) submetidos a tratamentos por via intragástrica (i.g.) por 7 dias consecutivos ou por via tópica (dose única) com diferentes concentrações dos extratos (EH ou EE): 10, 100 e 1000 mg/kg. A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada contra cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Listeria monocytogenes* (ATCC 33090), *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028). Os extratos apresentaram grande variedade de compostos fitoquímicos, principalmente o EE, além de elevada atividade antioxidante. O pré-tratamento por via i.g. com os extratos foi capaz de inibir o edema induzido por xileno, com um percentual máximo de inibição de 61,72% para o EE10 e de 57,08% para o EH100, mas nenhum efeito no edema induzido por TPA. O tratamento tópico por EH inibiu de forma dose-dependente o edema induzido por xileno, com máximo de inibição de 78,89% para EH1000, enquanto para EE1000 foi de 67,95%, sem diferença significativa com EE10 e EE100. Já para o edema induzido por TPA, EH (10, 100 e 1000 mg/kg) inibiram o edema em 84,39%, 68,68% e 65,96%, enquanto para EE (10, 100 e 1000 mg/kg) a inibição foi de 75%, 56% e 51%, respectivamente. Ademais, os extratos não apresentaram atividade antibacteriana frente às cepas testadas. Os extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira apresentam elevada capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória diferenciada em relação aos edemas induzidos por xileno e TPA.

**Palavras-chave:** *Annona muricata L.* Atividade antioxidante. Atividade anti-inflamatória. Edema de orelha. Xileno. TPA.



## ABSTRACT

Soursop (*Annona muricata* L.) is a tree of Annonaceae family widely distributed in all tropical regions of the world, produces fruit known as graviola and its leaves are used in traditional medicine as phytotherapy. Some compounds present in *A. muricata* have been related to antioxidant activity, anti-inflammatory and antimicrobial activities of this plant. This study aimed to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities of hexane (HE) and ethanol (EE) soursop leaves extracts. To this end, we used soursop leaves for preparation of extracts for further analyzes of phytochemical composition, antioxidant capacity, ear edema assays in vivo and in vitro antibacterial activity. For analysis of the antioxidant activity of hexane and ethanol extracts were determined total polyphenols, yellows flavonoids and anthocyanins and total antioxidant capacity by ABTS<sup>•+</sup> and DPPH methods. To evaluate the anti-inflammatory activity of the extracts was performed ear edema model induced by xylene or TPA in mice (Swiss females, 25-35g)-treated intragastrically (ig) for 7 consecutive days or topically (single dose) of different concentrations of the extracts (EE or HE):10, 100 and 1000 mg/kg. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated against strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Listeria monocytogenes* (ATCC 33090), *Escherichia coli* (ATCC 11775) and *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028). The extracts showed wide variety of phytochemical compounds, especially EE, and high antioxidant activity. Pretreatment via i.g. with the extracts was able to inhibit the edema induced by xylene, with a maximum percentage of inhibition of 61.72% for EE 10 and 57.08% for HE 100, but no effect on TPA-induced edema. The topical application with HE inhibited in a dose-dependent form the xylene-induced edema with maximum inhibition of 78.89% for HE1000, while for EE1000 was 67.95%, with no significant difference EE10 and EE100. As for the TPA-induced edema, HE (10, 100 and 1000 mg / kg) inhibited edema at 84.39%, 68.68% and 65.96%, while for EE (10, 100 and 1000 mg / kg ) the inhibition was 75%, 56% and 51%, respectively. Moreover, the extracts showed no antibacterial activity against all tested strains. The hexane and ethanol extracts of soursop leaves exhibit high differentiated antioxidant and anti-inflammatory activity compared to edema induced by xylene and TPA.

**Keywords:** *Annona muricata* L. Antioxidant activity. Anti-inflammatory activity. Ear edema. Xylene. TPA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	(A) Graviroleira ( <i>Annona muricata</i> L.); (B) Flores; (C) Frutos e (D) Sementes.	<b>20</b>
<b>Figura 2</b>	Folhas de graviroleira.	<b>21</b>
<b>Figura 3</b>	Estrutura química de alguns flavonoides.	<b>24</b>
<b>Figura 4</b>	Migração de leucócitos para o sítio inflamatório.	<b>27</b>
<b>Figura 5</b>	Estrutura química da Indometacina	<b>30</b>
<b>Figura 6</b>	Estrutura química da Dexametasona	<b>31</b>
<b>Figura 7</b>	Efeito do pré-tratamento com o extrato etanólico de folhas de <i>Annona muricata</i> sobre a inflamação tópica induzida por xileno em camundongos.	<b>49</b>
<b>Figura 8</b>	Efeito do pré-tratamento com o extrato etanólico de folhas de <i>Annona muricata</i> sobre a inflamação tópica induzida por TPA em camundongos.	<b>49</b>
<b>Figura 9</b>	Efeito do pré-tratamento com o extrato hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> sobre a inflamação tópica induzida por xileno em camundongos.	<b>50</b>
<b>Figura 10</b>	Efeito do pré-tratamento com o extrato hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> sobre a inflamação tópica induzida por TPA em camundongos.	<b>51</b>
<b>Figura 11</b>	Efeito do tratamento tópico do extrato etanólico das folhas de <i>Annona muricata</i> sobre o edema de orelha induzido por xileno.	<b>54</b>
<b>Figura 12</b>	Efeito do tratamento tópico do extrato etanólico das folhas de <i>Annona muricata</i> sobre o edema de orelha induzido por TPA.	<b>54</b>
<b>Figura 13</b>	Efeito do tratamento tópico do extrato hexânico das folhas de <i>Annona muricata</i> sobre o edema de orelha induzido por xileno.	<b>56</b>
<b>Figura 14</b>	Efeito do tratamento tópico do extrato hexânico das folhas de <i>Annona muricata</i> sobre o edema de orelha induzido por TPA.	<b>56</b>
<b>Figura 15</b>	Efeito dos extratos hexânico e etanólico sobre a inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. choleraesuis</i> .	<b>58</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Caracterização fitoquímica <i>in vitro</i> dos extratos etanólico e hexânico de folhas de gravioleira.	<b>45</b>
<b>Tabela 2</b>	Conteúdo de antocianinas, flavonoides amarelos e polifenóis presentes nos extratos etanólico e hexânico de folhas de gravioleira.	<b>46</b>
<b>Tabela 3</b>	Atividade antioxidante total dos extratos etanólico e hexânico de folhas de gravioleira.	<b>47</b>
<b>Tabela 4</b>	Avaliação da presença de bactérias ou fungos nos extratos etanólico e hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> .	<b>47</b>
<b>Tabela 5</b>	Efeito do pré-tratamento com os extratos etanólico e hexânico sobre a indução da inflamação por xileno e TPA.	<b>52</b>
<b>Tabela 6</b>	Efeito do tratamento tópico dos extratos etanólico e hexânico no modelo de edema de orelha induzido por xileno e TPA.	<b>57</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – percentagem

μL – microlitro

mL – mililitro

μm – micrômetro

μM – micromolar

AA – ácido araquidônico

AAT – atividade antioxidante total

ABTS – 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]

ADP – adenosina difosfato

AINES – anti-inflamatórios não esteroidais

ANOVA – análise de variância

*Annona muricata L.* – gravioleira

ATCC – American Type Culture Collection

BDA – ágar batata dextrose

BHA – butilhidroxianisol

BHI – caldo de infusão cérebro coração

BHT – butilhidroxitolueno

COX – ciclooxigenase

DEXA – dexametasona

DL<sub>50</sub> – dose letal para 50% dos camundongos

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – método varredor de radical livre (1,1-difenil-2-picrihidrazil)

EE – Extrato Etanólico

EH – Extrato Hexânico

ERNS – Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GC– Glicocorticoides

HCl – ácido clorídrico

HO° – radicais hidroxila

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico

Ig E – imunoglobulina E

IL– interleucina

INDO - indometacina

LOX – lipooxigenase

LT – leucotrienos

NCCLS – National Committee For Clinical Laboratory Standards

NO – Óxido Nítrico

O<sub>2</sub><sup>o-</sup> – Ânion superóxido

OH – Hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAF – Fator de ativação de plaquetas

PG – Prostaglandinas

PGI<sub>2</sub> – Prostaciclina

PLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub>

SNO – Sintase do óxido nítrico

Swiss – Linhagem de camundongos

TNF -  $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TPA – 12-O-tetradecanoil forbol acetato

Tx – Tromboxano

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1	Plantas Medicinais.....	19
2.2	<i>Annona Muricata L.</i> .....	21
2.3	Estresse Oxidativo e Antioxidantes.....	24
2.4	Inflamação e o processo inflamatório.....	28
2.4.1	<i>Eventos celulares e vasculares</i> .....	29
2.4.2	<i>Mediadores Químicos</i> .....	31
2.5	Fármacos Anti-inflamatórios.....	32
2.5.1	<i>Anti-inflamatórios não-esteroidais</i> .....	32
2.5.2	<i>Anti-inflamatórios esteroidais</i> .....	34
2.6	Agentes Antimicrobianos.....	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Objetivos Específicos.....	37
4	MATERIAL.....	38
4.1	Material Vegetal.....	38
4.2	Animais.....	38
4.3	Micro-organismos.....	38
4.4	Drogas e reagentes.....	38
5	MÉTODOS.....	39
5.1	Preparo dos Extratos.....	39
5.2	Estudo Fitoquímico dos extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Annona muricata L.</i> .....	39
5.2.1	Preparo das amostras a partir dos extratos para determinação dos fitoquímicos.....	39
5.2.1.1	<i>Determinação de Fenóis e Taninos</i> .....	39
5.2.1.2	<i>Determinação de Flavonoides</i> .....	40
5.2.1.3	<i>Determinação de Flavonóis, Flavononas, Flavononóis e Xantonas</i> .....	40
5.2.1.4	<i>Determinação de Catequinas</i> .....	40
5.2.1.5	<i>Determinação de Esteroides e Triterpenoides</i> .....	40
5.2.1.6	<i>Determinação de Saponinas</i> .....	40

5.2.1.7	<i>Determinação de Alcaloides.....</i>	41
5.3	<b>Atividade antioxidante total dos extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Annona muricata</i> L.....</b>	41
5.3.1	<i>Preparo dos extratos.....</i>	41
5.3.2	<i>Atividade antioxidante total pelo método ABTS.....</i>	41
5.3.3	<i>Atividade antioxidante total pelo método DPPH.....</i>	42
5.4	<b>Estudo dos antioxidantes não enzimáticos dos extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Annona muricata</i> L.....</b>	43
5.4.1	<i>Determinação de Polifenóis Extraíveis Totais.....</i>	43
5.4.2	<i>Determinação de Flavonoides Amarelo.....</i>	43
5.4.3	<i>Determinação de antocianinas totais.....</i>	44
5.5	<b>Análise microbiológica dos extratos etanólico e hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i>.....</b>	44
5.6	<b>Efeito dos extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Annona muricata</i> L. sobre a resposta inflamatória.....</b>	44
5.6.1	<i>Efeito do pré-tratamento com os extratos etanólico e hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> sobre a inflamação tópica induzida por xileno e TPA em camundongos.....</i>	44
5.6.1.1	<i>Efeito do pré-tratamento com os extratos hexânico e etanólico de folhas de <i>Annona muricata</i> sobre a inflamação tópica induzida por xileno e TPA em camundongos.....</i>	45
5.6.1.2	<i>Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de xileno.....</i>	45
5.6.1.3	<i>Avaliação do Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Tópica de TPA.....</i>	46
5.6.2	<i>Efeito do tratamento tópico dos extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Annona muricata</i> sobre o edema de orelha induzido por xileno e TPA.....</i>	46
5.6.2.1	<i>Grupos experimentais.....</i>	46
5.7	<b>Avaliação da Atividade Antibacteriana dos extratos etanólico e hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> L.....</b>	47
5.8	<b>Análise Estatística.....</b>	48
6	<b>RESULTADOS.....</b>	49
6.1	<b>Caracterização fitoquímica dos extratos etanólico e hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> L.....</b>	49
6.2	<b>Atividade antioxidante total dos extratos etanólico e hexânico de folhas de</b>	50



	<i>Annona muricata</i> .....	
6.3	Estudo dos antioxidantes não enzimáticos dos extratos etanólico e hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> .....	50
6.4	Avaliação da contaminação dos extratos etanólico e hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> por bactérias e fungos.....	51
6.5	Efeito dos extratos etanólico e hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> sobre a resposta inflamatória.....	52
6.5.1	Efeito do pré-tratamento com os extratos etanólico e hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> sobre a inflamação tópica induzida por xileno e TPA em camundongos.....	52
6.5.2	Efeito do tratamento tópico dos extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Annona muricata</i> sobre o edema de orelha induzido por xileno e TPA em camundongos.....	57
6.6	Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Annona muricata</i> .....	62
7	DISCUSSÃO.....	63
8	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72

## 1. INTRODUÇÃO

---

Segundo a OMS, plantas medicinais são aquelas que, nativas ou cultivadas, são utilizadas para fins medicinais ou fitoterapia. Nos últimos anos, os fitoterápicos têm recebido grande atenção, uma vez que a diversidade química das plantas faz com que elas sejam uma das principais fontes para o isolamento de compostos orgânicos bioativos (BASSO, 2005).

Os produtos de origem natural, especialmente as plantas, são considerados uma fonte alternativa de medicação. A grande diversidade vegetal do território brasileiro possibilita encontrar diversas plantas medicinais e torna comum a prática de fitoterapia. O conhecimento popular sobre o uso e a eficiência de fitoterápicos é bem antigo e passa de uma geração a outra e têm despertado o interesse de muitos pesquisadores (BASTOS, 2007).

A fitoterapia, tratamento que utiliza as plantas para o tratamento de doenças, já era conhecida e praticada pelas civilizações egípcias e gregas, ainda sendo bastante utilizada principalmente no Oriente, no qual se observa que inúmeras doenças são eliminadas por uso de plantas medicinais, sendo bastante comum em países como China, Paquistão e Tailândia (HERBARIUM, 2002). Estima-se que atualmente 25 a 30% das drogas prescritas mundialmente são oriundas de plantas medicinais (RATES, 2001; CALIXTO, 2005). No Brasil, 20% da população é responsável por 63% do consumo de medicamentos alopáticos, os 80% restantes encontram nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO *et al.*, 2006). No entanto, muitas plantas da flora nativa com propriedades terapêuticas são utilizadas sem a certificação precisa e necessária de suas propriedades farmacológicas e possíveis riscos e/ou efeitos adversos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos obtidos pela pesquisa de fontes naturais tais como extratos de plantas, levou à descoberta de drogas muito úteis clinicamente, que desempenham papel importante no tratamento de doenças humanas (DOS SANTOS; SANT'ANA, 2001). Com o avanço da ciência, intensificaram-se os estudos sobre as plantas medicinais utilizadas popularmente, relacionando sua composição química com seus efeitos, sendo indispensável sua validação científica para aceitação de sua utilização (McGAW; ELOFF, 2008).

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade e o potencial farmacológico dos fitoterápicos dessa enorme biodiversidade ainda é utilizado de forma incipiente, o que justifica intensificar as pesquisas nessa área. Nesse contexto, a graviroleira encontra-se, portanto, na atual tendência de busca por medicamentos naturais, contribuindo para o

esclarecimento de atributos funcionais, orientação da população e crescimento sócio econômico do país. Essa planta, além de ser utilizada na alimentação humana vem sendo utilizada como fitoterápico devido às propriedades medicinais apresentadas por suas folhas, frutos, sementes e raízes (MENDONÇA *et al.*, 2002).

Dados na literatura sugerem um potencial efeito antioxidante e anti-inflamatório das folhas da gravioleira, porém estudos mais aprofundados são necessários para que se possa consolidar essa planta como uma alternativa natural aos medicamentos químicos convencionais. Vale ainda salientar, que não há trabalhos avaliando o efeito anti-inflamatório dos extratos etanólico e hexânico das folhas da gravioleira frente a diferentes agentes flogístico, sendo interessante investigar se esses extratos apresentam atividades antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

### 2.1 Plantas Medicinais

Plantas medicinais são aquelas que contêm um ou mais princípios ativos que lhes conferem atividade terapêutica, possuem tradição de uso pela população ou comunidade e são capazes de prevenir, aliviar ou curar enfermidades (LORENZI; MATOS, 2002; CARVALHO *et al.*, 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Desde os tempos antigos as plantas medicinais passaram a ser utilizadas pelo homem como principais fontes de drogas, para estabelecer a cura ou o alívio de doenças. O conhecimento adquirido pelas comunidades sobre a sua utilização é repassado, nas diferentes culturas, através das gerações, perpetuando-o (PHILLIPSON, 2001; McGAW; ELOFF, 2008; MUKANDIWA *et al.*, 2012;). Os registros históricos sobre a utilização das plantas medicinais para tratamento de doenças vão desde 4.000 a. C. O primeiro registro médico depositado no Museu da Pensilvânia é datado de 2.100 a. C. e inclui uma coleção de fórmulas de trinta diferentes drogas de origem vegetal, animal ou mineral. O manuscrito Egípcio “Ebers Papyrus” (1.500 a. C.) contém 811 prescrições e 700 drogas e o primeiro texto Chinês sobre plantas medicinais (500 a. C.) relata nomes, doses e indicações de uso de plantas para tratamento de doenças. Algumas dessas plantas ainda são utilizadas, como Ginseng (*Panax spp.*), *Ephedra spp.*, *Cassia spp.* e *Rheum palmatum* L., inclusive como fontes para indústrias farmacêuticas (DUARTE, 2006). No Brasil, a utilização das plantas como medicamento recebeu influências tanto da cultura indígena como da africana e europeia, que durante muito tempo foi a principal forma de cura utilizada, sobretudo, pela população rural (LORENZI & MATOS, 2002).

Nas últimas décadas a quantidade de informações sobre o uso de recursos vegetais aumentou, fato que intensificou a pesquisa de plantas medicinais utilizadas popularmente, relacionando sua composição química com seus efeitos, uma vez que a diversidade química das plantas faz com que elas sejam uma das principais fontes para o isolamento de compostos orgânicos bioativos (BASSO *et al.*, 2005; CARTAXO *et al.*, 2010). Existe em todo o mundo uma maior procura por terapias alternativas em relação às já existentes, na busca de uma

diminuição dos efeitos colaterais indesejáveis relacionados ao uso de drogas sintéticas, que não são efetivas em todos os casos (IBRAHIMA *et al.*, 2012), além de um aumento em pesquisas que possam determinar a segurança e eficácia do uso de plantas medicinais (NISSEN; EVANS, 2012).

Acredita-se que 25 a 30% das drogas produzidas mundialmente são derivadas direta ou indiretamente de plantas (CALIXTO, 2005; McGAW; ELOFF, 2008). No Brasil, 20% da população é responsável por 63% do consumo de medicamentos disponíveis, os 80% restantes encontram-se nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais (FOGLIO *et al.*, 2006).

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos obtidos pela pesquisa de fontes naturais tais como extratos de plantas levou à descoberta de drogas muito úteis clinicamente, que desempenham papel importante no tratamento de doenças humanas (DOS SANTOS; SANT`ANA, 2001). O conhecimento da medicina tradicional, junto a técnicas modernas tem acelerado esse processo (SAKLANI e KUTTY, 2008; SCHOEPE *et al.*, 2006), possibilitando que vários medicamentos fitoterápicos derivados de extratos de plantas sejam utilizados no tratamento de uma ampla variedade de doenças, apesar de ser relativamente pequeno o conhecimento sobre seus mecanismos de ação (BAGUL *et al.*, 2005; RATHEESH; HELEN , 2007).

As atividades biológicas das plantas utilizadas na medicina tradicional geralmente são atribuídas aos seus metabólitos secundários, que na maioria das vezes, possuem estrutura química complexa com muitos centros quirais, o que determina os mais variados tipos de compostos bioativos com ação farmacológica (AGRA *et al.*, 2007). Produtos naturais derivados de plantas tais como alcaloides, taninos, terpenos e flavonoides têm recebido atenção considerável nos últimos anos devido às suas diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividades analgésicas, anti-inflamatórias e antioxidantes (PANDURANGAN *et al.*, 2009).

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas pertencentes à família Annonaceae, que apresentam espécies de importância terapêutica, ecológica e econômica.

## 2.2 *Annona Muricata* L.

A gravioleira (*Annona muricata* L.), pertence à família Annonaceae é, entre as Magnoliales, a que possui maior número de espécies. Apresenta aproximadamente 135 gêneros e 2500 espécies (CHATROU *et al.*, 2004; LOBÃO; SILVA, 2007; CHATROU *et al.*, 2012). Dentro do gênero *Annona* destacam-se, além da gravioleira, a pinha, a ata ou fruta-do Conde (*Annona squamosa*), a cherimólia (*Annona cherimola*) e a atemóia (híbrido entre cherimólia e pinha) (LIMA *et al.*, 2006).

Segundo Manica (1997), a gravioleira (Figura 1A) é uma árvore de pequeno porte, com altura de 3,5 a 8 m, copa pequena, de ramificação assimétrica e de folhagem compacta. As folhas são inteiras, ovadas, oblongas ou elípticas, coriáceas, duras, de pecíolos curtos, de cor verde-escura-brilhante na página superior e verde-amarelada na página inferior, medindo de 5 a 18 cm de comprimento por 2 a 7 cm de largura, quando adultas. As flores (Figura. 1B) no estágio de “capulho” têm um formato subgloboso ou piramidal, são hermafroditas, de cor verde-escura quando em crescimento e verde clara quando próximas da antese, distribuídas em pedúnculos curtos axilares ou diretamente do tronco, solitárias ou agrupadas de 2 a 4 flores, originadas de raminhos curtos dos ramos de plantas velhas que, após a fecundação, formam cachos de frutos. O fruto (Figura. 1C) é uma baga composta, frutos múltiplos ou sincarpo, carnoso, o maior do gênero *Annona*, medindo de 16,2 a 30,1 cm de comprimento por 11,3 a 21,2 cm de largura, com peso de 1 kg até 10 kg, de forma elipsoidal ou ovóide de cor verde, apresentam falsos espinhos carnosos curtos e moles. A sua polpa é branca, doce, mas ligeiramente ácida e produz muitas sementes escuras. As sementes (Figura 1D), acima de 95 por fruto, são ovóides e aplainadas, medindo entre 15 e 20 mm de comprimento, pesando entre 0,57 g e 0,61 g, tendo a testa dura e cor marrom-escura-brilhante (MOSCA *et al.*, 2006).

As espécies de *Annona* foram trazidas para as Américas pelos espanhóis, e tornaram-se largamente distribuídas pelos trópicos, sendo encontradas nas regiões subtropicais e tropicais do mundo, como nas Índias Ocidentais, América do Norte e do Sul, planícies da África, ilhas do Pacífico e Sudeste da Ásia (BADRIE; SCHAUSS, 2010). Uma infinidade de outras espécies dentro do gênero *Annona*, é encontrada em diversas regiões brasileiras, nas mais variadas condições climáticas. No Brasil, além da região Nordeste, a graviola é amplamente cultivada nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste (MICHELETTI *et al.*, 2001; MANICA *et al.*, 2003).

Apesar de as anonáceas serem consumidas geralmente como frutas *in natura*, elas são amplamente usadas na medicina tradicional e listadas como plantas medicinais do Brasil

(WANG *et al.*, 2002; MATOS *et al.*, 2004; CARBALLO *et al.*, 2010). Destacam-se pelos compostos presentes, como alcaloides, amidas, diterpenos, esteroides, flavonoides e acetogeninas (PONTES *et al.*, 2004). Espécies da família Annonaceae, incluindo *Annona muricata* L., têm sido investigadas devido à presença de fitoquímicos, como os alcalóides, terpenoides, esteroides, algumas acetogeninas e ciclopeptídeos (BRITO *et al.*, 2008).

Substâncias das classes das acetogeninas têm sido encontradas em raízes, folhas, cascas, sementes e frutos, sendo derivadas de ácidos graxos de cadeia longa isolada, exclusivamente de plantas pertencentes à família Annonaceae (WANG *et al.*, 2002). Essas acetogeninas possuem propriedades citotóxicas contra linhagens de células tumorais e atividades moluscicida, citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana, e interesse crescente tem sido despertado devido ao potencial por inibir células resistentes a múltiplos fármacos (PIMENTA *et al.*, 2003; BERMEJO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2010; DE SOUSA *et al.*, 2010; CARBALLO *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012).

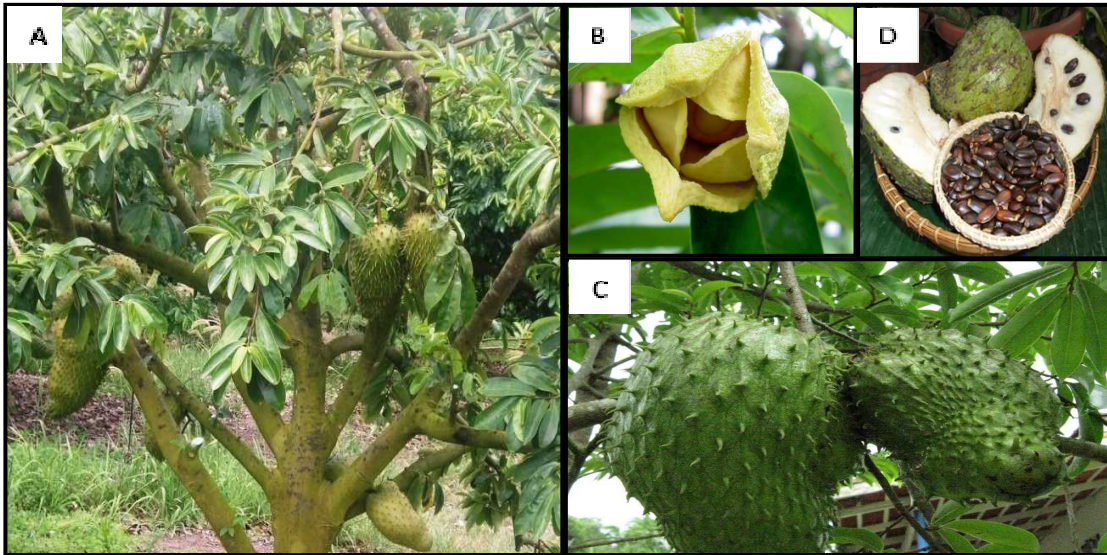
*Annona muricata* L. também é reconhecida por conter taninos, flavonoides, polifenóis e triterpenóides (CHANG, 2001). Os ciclopeptídeos encontrados em *Annona muricata* L. apresentam atividades antitumoral, antifúngica, antiviral e de inibição de enzimas, cujas funções estão intimamente relacionadas com a conformação molecular dos mesmos (WU *et al.*, 2007). Extratos de folhas de *Annona muricata* possuem propriedades antioxidantes (BASKAR *et al.*, 2007), moluscicida (LUNA *et al.*, 2006; SANTOS & SANTÁNA, 2001) e estudos recentes também mostraram nas folhas atividades analgésica e anti-inflamatória (ROSLIDA *et al.*, 2010; DE SOUSA *et al.*, 2010), além da atividade anti-ulcerogênica (ROSLIDA *et al.*, 2012). O extrato etanólico bruto das folhas de *Annona muricata* L. também se revelou tóxico para larvas do mosquito *Aedes aegypti* (LUNA *et al.*, 2003) e efetivo nos bioensaios com larvas de *Artemia salina* (LUNA *et al.*, 2003; LUNA *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, as folhas (Figura 2) de *Annona muricata* L. são usadas para dores de cabeça, insônia, cistite, problemas do fígado, diabetes, hipertensão, como anti-inflamatório, antiespasmódico, antidisentérico, sedativo, expectorante, broncodilatador e contra o câncer (TAYLOR *et al.*, 2002; LORENZI, 2008). A decocção das folhas tem efeitos parasiticida, antirreumático e antineurálgico, quando usadas internamente, enquanto que as folhas cozidas, aplicadas topicamente, combatem reumatismo e abscessos (DISTASI *et al.*, 2002). Tem sido demonstrado que as sementes da graviola são usadas com função emética e adstringente, e suas cascas como antidiabéticas e espasmo-líticas (LORENZI; MATOS, 2002).

Os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da *Annona muricata* L. têm sido mencionados na literatura, mas em relação aos extratos obtidos das folhas de gravioleira ainda

são necessários maiores estudos para que se possam avaliar seus constituintes, como também sua atividade anti-inflamatória. Ademais há poucos trabalhos relatando o efeito anti-inflamatório de extratos hexânico e etanólico de folhas de gravioleira.

Figura1. (A) Gravioleira (*Annona muricata*); (B) Flores; (C) Frutos e (D) Sementes.



Fonte: <http://www.ipa.br/novo/noticias/ipa-realiza-curso-de-enxertia-em-cha-grande/>

Figura 2. Folhas de gravioleira



Fonte: <http://eol.org/pages/1054863/overvie>



### 2.3 Estresse Oxidativo e Antioxidantes

Espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são termos que abrangem todas as formas reativas do oxigênio e nitrogênio, incluindo radicais e não-radicaís (CERQUEIRA *et al.*, 2007). Nas últimas décadas tem havido um grande interesse no estudo do papel desses oxidantes devido ao fato de estarem associados com o desenvolvimento de várias doenças (VALKO *et al.*, 2006). O ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio, radicais hidroxilas, e os peróxidos orgânicos, são geralmente produzidas durante o metabolismo celular e são importantes para várias funções celulares (KUNDUR; SUHR, 2012). Sob condições fisiológicas normais, a eliminação de EROs é mediada através de uma grande variedade de vias antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides (SOUSA *et al.*, 2007). Contudo, a produção excessiva de EROs, em consequência de estresses ambientais, infecção ou doença metabólica, resulta no estresse oxidativo e esse é responsável por mediar modificações de diversas biomoléculas (KUNDUR; SUHR, 2012).

As EROS têm sido implicadas na etiologia de diversas doenças, como cirrose hepática, aterosclerose, câncer, diabetes, dentre outras, como também podem levar à mutação do DNA, alteração da expressão gênica, modificação de transdução de sinal da célula, apoptose celular, peroxidação lipídica e degradação de proteínas. Em contrapartida, existem compostos que podem eliminar ou minimizar os efeitos prejudiciais das EROS e que apresentam importância fundamental na melhoria desses processos (GOUTHAMCHANDRA *et al.*, 2010; FU *et al.*, 2011).

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, mesmo presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz, diminuindo a velocidade da reação ou prolongando sua estabilidade oxidativa (MOURE *et al.*, 2001). Assim, os antioxidantes são responsáveis por auxiliar as células a resistir ou minimizar os danos causados pelas EROS, retardando o processo de envelhecimento e diminuindo o risco de doenças degenerativas associadas à idade, o declínio do sistema imunológico e disfunção cerebral, além de câncer e doenças cardiovasculares (BOUHLEL *et al.*, 2007). Por conta disso, existe um crescente interesse na descoberta de antioxidantes naturais, por exemplo, polifenóis, presentes em

plantas medicinais e em alimentos, que podem ajudar na prevenção do dano oxidativo (SHUKLA *et al.*, 2009).

O interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas explica-se também por sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Extratos de frutas, vegetais, cereais e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidante e têm demonstrado eficaz atividade antioxidante em sistemas modelos (WOLFE; WU; LIU, 2003; MANACH *et al.*, 2004), além de possuírem baixa toxicidade em relação aos dois antioxidantes sintéticos mais comumente usados, BHA e BHT, que começaram a ser restringidos devido à sua toxicidade e indução de danos no DNA (ARABSHAHI-D *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos, que são metabólitos secundários de plantas, desempenham papel importante na proteção contra EROs e apresentam variadas estruturas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). A elevada atividade antioxidante dos polifenóis, além de sua capacidade de alterar o mecanismo de inibição das enzimas responsáveis pela produção de EROs tem sido atribuída a sua estrutura química que é ideal para a captura de radicais livres. Além disso, tem sido reportado que os polifenóis são mais eficazes do que os tocoferóis e o ácido ascórbico (FU *et al.*, 2011). As propriedades antioxidantes dos polifenóis surgem de sua alta reatividade como o hidrogênio e da sua capacidade em estabilizar e deslocar o elétron desemparelhado (SHUKLA *et al.*, 2009), atuando como agentes redutores, doadores de hidrogênio e quelantes de metais (JAVANMARDI *et al.*, 2003). Essas atividades são influenciadas pelo número e posição dos grupos OH, assim como pelas posições de glicosilação (JUBETE *et al.*, 2010). O balanço entre as EROs e os antioxidantes é, portanto, o melhor mecanismo na prevenção do estresse oxidativo (WU *et al.*, 2008).

Os flavonoides são pigmentos naturais presentes nos vegetais que desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, como por exemplo, os raios ultravioletas, a poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, entre outros, e atuam também como agentes terapêuticos num elevado número de patologias, tais como arteriosclerose e cancro (COUTINHO *et al.*, 2009). Eles têm estruturas químicas relativamente simples, mas mais de 4.000 derivados foram relatados na natureza, indicando as suas diversidades químicas (Figura 3). São conhecidas suas atividades antimicrobianas, antivirais, antiulcerogênicas, citotóxicas, antineoplásicas, mutagênicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, anti-hipertensiva, hipolipidêmicas e antiplaquetárias (GUARDIA *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2004).

Acredita-se que as propriedades relacionadas à saúde humana, exercidas pelos compostos fenólicos, destacando-se os flavonoides, são baseadas principalmente na sua

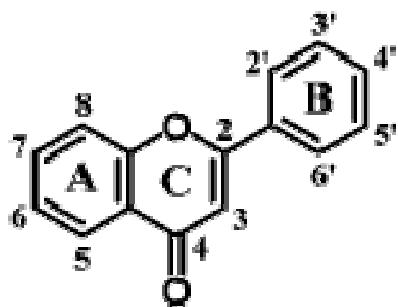
atividade antioxidante, atuando como sequestradores de radicais livres e quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (HUBER, 2008). O mecanismo pelo qual os flavonoides exercem seus efeitos anti-inflamatórios envolve a inibição da atividade da COX e LOX, a biossíntese de eicosanoides e a degranulação de neutrófilos. Flavonoides como a quercetina inibem tanto a atividade da COX como da LOX (YUAN *et al.*, 2006).

Existem várias propostas de mecanismos de ação celular explicando a atividade anti-inflamatória dos flavonoides *in vivo*. Eles poderiam regular a atividade celular de algumas células relacionadas à inflamação, como os mastócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Por exemplo, alguns flavonoides inibem a liberação de histamina por mastócitos e outros inibem a proliferação de células T, alguns modulam a atividade de enzimas do ácido araquidônico (AA) enzimas metabolizadoras como a fosfolipase A2 (PLA2), ciclo-oxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) e óxido nítrico (NO), a produção de enzimas e a sintase do óxido nítrico (SNO). A inibição dessas enzimas por flavonóides reduz a produção de AA, prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), e NO, mediadores cruciais da inflamação (KIM *et al.*, 2004). Incluem os Flavonóis, Flavonas, Flavanóis, Antocianidinas, Flavanonas e Isoflavonas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

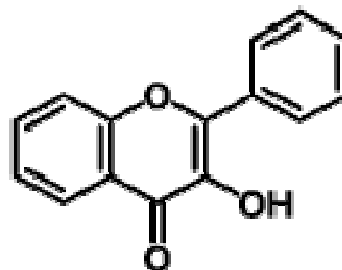
As antocianinas são flavonóides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas. São compostos solúveis em água e instáveis em altas temperaturas (DORNAS *et al.*, 2007). Nos últimos anos, o interesse por esses pigmentos se intensificou uma vez que pesquisas têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos e que possuem capacidade antioxidante, entre vários outros efeitos farmacológicos (KÄHKÖNEN & HEINONEN, 2003).

As flavononas ou dihidroflavononas são intermediários biossintéticos dos flavonoides e podem apresentar diferentes sabores, doce ou amargo, dependendo da modificação molecular que é feita, estando ligadas intrinsecamente com a indústria organoléptica, podendo ser utilizadas como flavorizantes (SIMÕES, 2004).

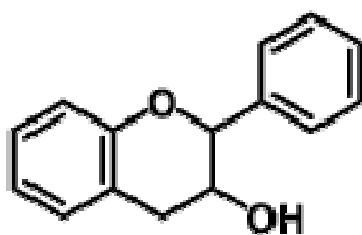
Figura 3. Estrutura química de alguns flavonoides.



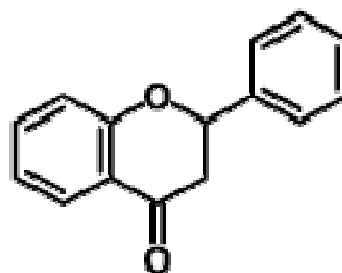
Flavonas



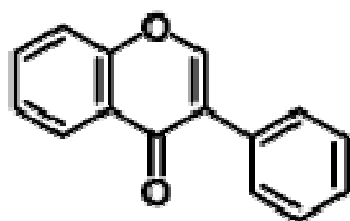
Flavonois



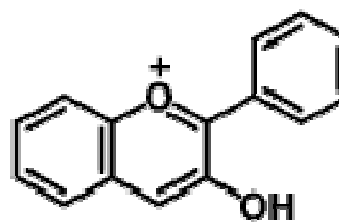
Flavanois



Flavanonas



Isoflavonas



Antocianidinas

Fonte: PAN *et. al.*, 2010 (modificada).

## 2.4 Inflamação e o processo inflamatório

Inflamação é um processo que envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por numerosos estímulos, tais como agentes infecciosos, isquemia, complexos imunes ou antígeno-anticorpo e injúrias químicas, térmicas e mecânicas. Trata-se de um evento dinâmico e complexo, que consiste no reconhecimento do agente nocivo, sua posterior destruição ou inativação e tentativa de reconstruir o tecido lesado (VAJDOVICH, 2008).

A resposta inflamatória é caracterizada clinicamente por quatro sinais clássicos, que incluem calor, eritema, edema e dor e ocorre em três fases distintas, mediada por diferentes mecanismos: um agudo caracterizado por uma vasodilatação local e aumentada permeabilidade capilar, uma fase sub-aguda caracterizada por infiltração de leucócitos e células fagocíticas e uma fase proliferativa crônica, na qual ocorre degeneração do tecido e fibrose (ROTELLI *et al.*, 2003).

Em geral, a inflamação é uma reação protetora essencial para a sobrevivência do indivíduo. Entretanto, quando ela acontece de maneira inapropriada, comportando-se excessivamente ou de forma insuficiente, pode tornar-se prejudicial, passando a fazer parte integrante do processo patológico de algumas doenças, o que contribui para a elevada prevalência de morbimortalidade (RANG *et al.*, 2007). É responsável pela manifestação de várias doenças agudas ou crônicas, como choque séptico, cancro, diabetes, aterosclerose, obesidade, doenças vasculares e câncer (McGEER; McGEER, 2008; YU *et al.*, 2011; KUNDU; SUHR, 2012). Uma das formas de prevenir o aparecimento dessas doenças é reduzir o excesso de respostas inflamatórias (MASSAROTTI, 2008).

A resposta inflamatória inicial é inespecífica, independente do tipo da agressão. Os eventos que se seguem após essa reação inicial dependem de fatores associados ao agente agressor e ao próprio tecido agredido. Dessa forma, a inflamação pode mostrar uma variedade de quadros clínicos. Basicamente, a reação inflamatória consiste de: uma reação inata e uma resposta imune específica e caracteriza-se por eventos vasculares e celulares e pode se manifestar como um processo agudo ou crônico, dependendo da persistência da lesão e severidade dos sinais clínicos (COUTINHO *et al.*, 2009).

A inflamação aguda é uma resposta rápida e de duração relativamente curta (horas ou dias) a um agente nocivo, que envolve o recrutamento de mediadores de defesa ao local da lesão, principalmente neutrófilos. Tem como principais características alterações no calibre vascular, que levam a um aumento no fluxo sanguíneo; alterações estruturais na

microcirculação, que permitem que proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação e também a eliminação dos leucócitos da microcirculação, seu acúmulo no foco de lesão e sua ativação para eliminar o agente nocivo. Já a inflamação crônica é de longa duração e está relacionada com algumas alterações histológicas, como presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose do tecido (ROBBINS, 2005).

#### **2.4.1 Eventos celulares e vasculares**

Inicialmente observa-se uma vasoconstrição transitória, seguida por vasodilatação, responsável pelo surgimento de eritema e calor característico da inflamação. Essa transição de vasoconstrição para vasodilatação é mediada por diversos fatores, dentre os quais produtos endoteliais e fatores derivados de mastócitos como leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) e também histamina (ALLER *et al.*, 2006).

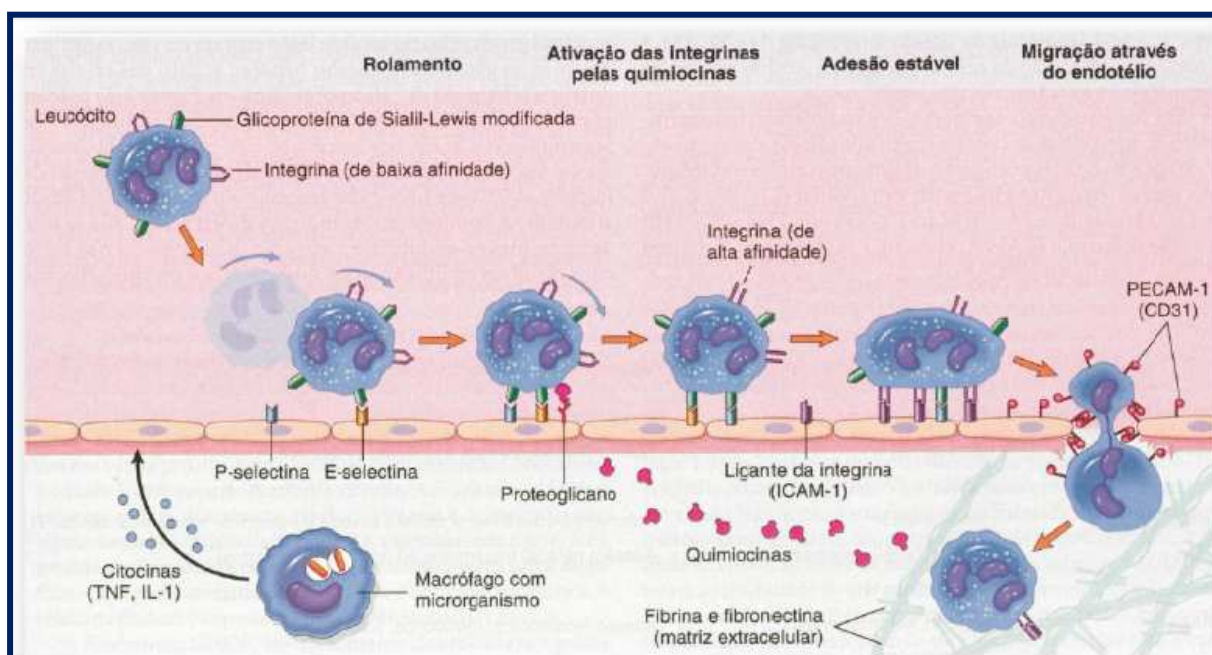
A vasodilatação também é responsável pela formação de edema, que por sua vez, é causado pelo fluxo vascular de proteínas ricas em fluido (plasma), a partir do compartimento intravascular para o interstício. O papel fundamental dessa mudança de permeabilidade celular é permitir a chegada de células e mediadores inflamatórios para os locais da lesão a fim de diminuir a inflamação. Ainda ocorre no local uma estase sanguínea, que impede a disseminação de agentes infecciosos que possam estar presentes no local (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

O principal fenômeno celular da inflamação consiste na migração de leucócitos para o sítio da lesão. Ao alcançarem o local lesionado, estas células fagocitam, degradam e matam antígenos estranhos. Além disso, o próprio infiltrado contribui para a amplificação da resposta inflamatória, através da liberação de mediadores vasoativos e quimiotáticos. Os neutrófilos são os leucócitos predominantes no infiltrado nas primeiras 24 horas, sendo, mais tarde, substituído por células mononucleares (ROBBINS, 2005).

De forma geral, os grupos básicos de leucócitos que tomam parte nas reações inflamatórias são neutrófilos, eosinófilos e granulócitos basófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Todos, com exceção de mastócitos e as células de plasma, são habitantes normais do sangue circulante. Cada tipo de célula desempenha um papel distinto e entra no processo inflamatório em resposta a estímulos específicos (VAJDOVICH, 2008).

O processo de migração dos neutrófilos do espaço intravascular para a região inflamada é complexo e envolve uma série de interações com o endotélio e a matriz extracelular, culminando com a passagem da célula para o espaço extravascular. A sequência de eventos nesse processo envolve a marginação, o rolamento, adesão, diapedese e quimiotaxia e é iniciada pela secreção de mediadores inflamatórios pelo endotélio (Figura 4) (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004, CORTÉS-VIEIRA, 2012).

Figura 4 .Migração de leucócitos para o sítio inflamatório.



Fonte: ROBBINS *et al.*, 2005.

Os principais grupos de moléculas de adesão são as selectinas (E, P e L-selectinas) que medeiam a adesão fraca, acompanhada de rolamento e, em seguida, a adesão firme dos leucócitos, fenômeno mediado por imunoglobulinas e  $\beta$ -2-integrinas presentes na superfície dos leucócitos que podem ter sua expressão aumentada após a ativação do leucócito por mediadores inflamatórios como citocinas. Posteriormente a adesão firme, segue-se a ligação estável mediada por imunoglobulinas, principalmente molécula de adesão intercelular-1, moléculas de adesão intercelular-2 e molécula de adesão de célula endotelial e plaquetas que estão presentes no endotélio, denominadas de  $\beta$ -2-integrinas (WAGNER; ROTH, 2000).

## 2.4.2 Mediadores químicos

Os mediadores químicos responsáveis pelos eventos inflamatórios podem originar-se do plasma, em formas precursoras que devem ser ativadas, e de células, nas quais podem estar armazenados nos grânulos intracelulares ou serem sintetizados originalmente em resposta a estímulos. Além disso, podem atuar em um ou vários tipos celulares, possuir alvos difusos, ou até mesmo apresentar efeitos diversos de acordo com os tipos de células e tecidos (MURPHY; WARD, 2006). Dentre eles encontram-se as aminas vasoativas (histamina, serotonina), proteínas plasmáticas (sistemas do complemento, das cininas e da coagulação), fator de ativação das plaquetas (PAF), citocinas (TNF e IL-1), os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), bradicinina e óxido nítrico (NO) (COUTINHO *et al.*, 2009; FRANCISCHETTI *et al.*, 2010). Podem exercer os seus efeitos diretamente na microvasculatura (por exemplo, histamina, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) ou utilizando leucócitos como intermediários (citocinas) (VAJDOVICH, 2008).

A histamina e a serotonina estão entre os primeiros mediadores químicos liberados durante a inflamação. São encontrados nos mastócitos, nos basófilos e nas plaquetas do sangue. A liberação dos mastócitos é desencadeada por diferentes fatores como reações imunológicas envolvendo IgE, fragmentos do complemento C3a e C5a, citocinas (IL-1, IL-18) e fatores liberadores de histamina derivados de leucócitos. A liberação das plaquetas é estimulada após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP), complexos antígeno-anticorpo e fatores de ativação das plaquetas (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010).

Os metabólitos do ácido araquidônico também são importantes mediadores químicos da inflamação e agentes quimiotáticos. A partir do ácido araquidônico, por meio da via da lipooxigenase são formados os leucotrienos, dentre eles, o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), que se liga a receptores específicos na superfície dos leucócitos dando origem a uma série de respostas que incluem a ativação de adesão molecular das integrinas  $\alpha 2$  e aderência à célula endotelial. Os leucotrienos C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub> e o TxA<sub>2</sub> afetam o fluxo sanguíneo e a perfusão pela ação direta na microcirculação. Pela via da ciclooxigenase são liberados a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o tromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>). A PGI<sub>2</sub> causa vasodilatação e inibe a agregação plaquetária, enquanto o TxA<sub>2</sub>, sintetizado ao nível das plaquetas, causa forte vasoconstrição e induz fortemente à agregação plaquetária. O TxA<sub>2</sub> é um forte quimiotático para os neutrófilos e promove a ativação e a adesão dos mesmos ao endotélio (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010).



A síntese das prostaglandinas inicia-se com a atividade da ciclooxigenase catalisando a adição do oxigênio molecular ao ácido araquidônico, para formar, inicialmente, o endoperóxido intermediário prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>). A mesma enzima, por sua atividade peroxidase, catalisa a redução desta prostaglandina para formar a PGH<sub>2</sub>. As PGG e PGH apresentam pouca atividade e servem como substrato para a formação de diferentes prostaglandinas e tromboxanos ativos, incluindo PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxanos (TX) (CARVALHO *et al.*, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2008).

Durante as reações imunes e inflamatórias, as citocinas são liberadas de forma a regular a ação das células destes sistemas. As principais citocinas pró-inflamatórias são as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8) e o TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ), liberadas por macrófagos ativados e vários outros tipos celulares. Estas citocinas favorecem a aderência leucocitária ao endotélio, aumentam a síntese de prostaciclina e desencadeiam uma cascata de citocinas secundárias, dentre outras ações. Já as citocinas secundárias (por exemplo, as quimiocinas) atraem e ativam as células inflamatórias móveis (GRELLNER, 2002; COUTINHO *et al.*, 2009).

O óxido nítrico (NO), produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado, possui potente ação vasodilatadora - o que leva a um aumento da permeabilidade vascular. Além disso, atua como regulador do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra micro-organismos. É sintetizado pela NO sintase (NOS), enzima presente em três isoformas, sendo a forma indutível (iNOS) a envolvida nas reações inflamatórias. Esta é induzida em macrófagos e em outras células durante o processo (COUTINHO *et al.*, 2009).

## **2.5 Fármacos Anti-inflamatórios**

### ***2.5.1 Anti-inflamatórios não-esteroidais***

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, e são conhecidos por seus efeitos anti-inflamatório, analgésico e antipirético. Seu mecanismo de ação se dá pela inibição das ciclooxigenases, prejudicando assim a transformação final de ácido araquidônico a prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (SIMONS *et al.*, 2004; HILARIO *et al.*, 2006). A extensão da inibição da enzima varia entre os diferentes AINES, apesar de não existirem estudos relativos ao grau de

inibição da ciclo-oxigenase com eficácia anti-inflamatória em pacientes individuais (MELGAÇO *et al.*, 2010; RAHMAN *et al.*, 2006).

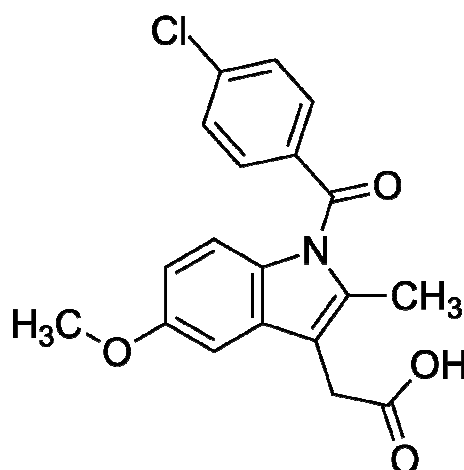
Os AINES podem ser classificados segundo sua seletividade sobre a enzima ciclooxigenase como não seletivos, inibindo a COX-1 e 2 (aspirina, indometacina, cetoprofeno) e seletivos, inibindo especificamente a COX-2 (celecoxibe, lumiracoxibe, etoricoxibe). Os AINES não seletivos são os mais antigos, designados tradicionais ou convencionais. Os AINES seletivos para a COX-2 são designados COXIBES (BATLOUNI, 2010).

Apesar da grande popularidade dos AINES, há ainda um grande número de efeitos colaterais relacionados ao seu uso. Estudos clínicos indicam que os inibidores seletivos da COX-2 exercem importantes efeitos cardiovasculares adversos, que incluem aumento do risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e hipertensão arterial (GIULIANO *et al.*, 2001; GILROY *et al.*, 2004; BATLOUNI, 2010).

O desenvolvimento de estratégias para minimizar estes efeitos adversos dos AINES, atualmente inclui a sua indicação criteriosa em função do risco individual, o uso de AINES mais seletivos na inibição da COX-2 e coxibes e também proteção gástrica (COUTO *et al.*, 2010). O uso de extratos de plantas tem ganhado grande destaque nesse campo, o que justifica o grande volume de trabalhos relacionados a essa linha de pesquisa.

A indometacina, um dos anti-inflamatórios não esteroides mais utilizados, é derivada do ácido indolacético pertencente à categoria dos anti-inflamatórios não esteroidais, que apresenta propriedades antiinflamatória, analgésicas e antipiréticas, já que inibe a enzima COX-2, necessária para a formação de prostaglandinas e outros autacóides (RAFFIN *et al.*, 2003).

Figura 5. Estrutura química da Indometacina.



Fonte: DOMINGUES *et al.*, 2008.

### 2.5.2 Anti-inflamatórios esteroidais

Glicocorticoides (GC) são potentes mediadores anti-inflamatórios comumente utilizados para tratar uma variedade de condições inflamatórias, incluindo a inflamação aguda e crônica (HEASMAN *et al.*, 2003; TISHER; REICHARDT, 2007). São agentes que simulam os esteroides hormonais endógenos produzidos no córtex adrenal: o cortisol (glicocorticoide) e a aldosterona (mineralocorticoide). São liberados em poucos minutos na resposta ao estresse e à lesão tecidual como mecanismo de controle da severidade da resposta inflamatória (GILROY *et al.*, 2004). Diferentemente dos AINEs, os glicocorticoides não inibem diretamente nenhuma enzima que sintetiza prostaglandinas, sua ação depende da interação com a biossíntese de proteínas. Modulam a sobrevivência, a diferenciação, a migração e as funções efetoras de leucócitos e vários tipos de células, causando impacto nas imunidades inata e adaptativa (TISCHNER; REICHARDT, 2007).

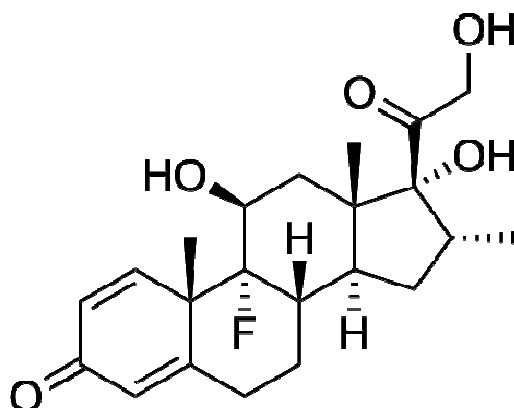
Nas células inflamatórias, os GC inibem a transcrição de várias citocinas, que são relevantes nas respostas inflamatórias, e a indução do gene codificador da COX-2 em monócitos, além de bloquearem a transcrição de uma forma de fosfolipase A2 induzida por citocinas, reduzirem a ativação, a proliferação e a sobrevivência de eosinófilos e linfócitos T e bloquearem a liberação de várias citocinas. Esse processo leva à morte celular ou apoptose (TORRES *et al.*, 2012).

A terapia anti-inflamatória com glicocorticoides é realizada, na maioria dos casos, na forma tópica, uma vez que os glicocorticoides sistêmicos apresentam efeitos adversos associados a sua aplicação prolongada, podendo levar à osteoporose, diabetes, adiposidade central, osteoporose, insônia, hipertensão arterial, dentre outros (DE BOSSCHER *et al.*, 2010; LOUNGUI, 2007), apesar do uso tópico também ser capaz de causar efeitos adversos sistêmicos, uma vez que eles são absorvidos pela corrente sanguínea (MORTIMER; TATTERSFIELD, 2005). Além de um menor efeito adverso, os glicocorticoides tópicos apresentam alta eficácia antiinflamatória, mesmo quando administrados em baixas doses.

Em tratamentos agudos, o principal critério levado em consideração é o da potência antiinflamatória e, nesse caso, dá-se preferência aos glicocorticoides que apresentam efeitos terapêuticos com pequenas doses, a exemplo da dexametasona (Figura 6) e betametasona.

Em virtude dos efeitos adversos das drogas anti-inflamatórias sobre o organismo, tem surgido a necessidade de descoberta e do desenvolvimento de novas classes de medicamentos com propriedades anti-inflamatórias, o que faz com que a pesquisa de produtos naturais esteja atualmente em grande evidência. (KAPLAN *et al.*, 2007)

Figura 6. Estrutura química da Dexametasona.



Fonte: LOUNGUI, 2007.

## 2.6 Agentes Antimicrobianos

Substâncias antimicrobianas constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que em pequenas concentrações devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, além de prevenir o desenvolvimento de microorganismos resistentes. Dentre as características desejáveis também estão as de apresentar ausência de efeitos colaterais ao hospedeiro como também estabilidade química (ACTOR, 2007).

Em razão do aumento da resistência de espécies patogênicas às múltiplas drogas antimicrobianas, surgiu a preocupação e a busca de novas substâncias de origem natural, com efeitos superiores ou similares àqueles da terapêutica habitual (OESTERHELT *et al.*, 2005). Uma bactéria é dita resistente a um determinado antibiótico quando é capaz de crescer, *in vitro*, na presença da concentração inibitória mínima que essa droga atinge no sangue (TAVARES, 2002). Embora exista a disponibilização de novos antibióticos, a resistência bacteriana ocorre em ritmo crescente nos diferentes patógenos Gram positivos e Gram negativos e representa um grande desafio terapêutico (ROSSI & ANDREAZI, 2005).

Fitomedicamentos derivados de plantas têm-se mostrado bastante promissores no tratamento de doenças infecciosas e estudos sobre as propriedades antimicrobianas de várias plantas já estão documentados (IDU *et al.*, 2007). Metabólitos secundários, produzidos por algumas espécies de plantas, são alvos de maior interesse, pois agem como substâncias de defesa contra micro-organismos patogênicos, insetos e animais herbívoros. Possuem

composição química variada com presença de flavonoides, terpenóides, alcaloides, cumarinas, taninos que apresentam, com frequência, atividade antimicrobiana (RESCHKE *et al.*, 2007). Segundo MICHELIN e colaboradores (2005), os antibióticos vegetais possuem uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos derivados de microorganismos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membrana.

Compostos antimicrobianos em materiais vegetais são comumente encontrados nas folhas (HIMESH *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2011), flores (MAK *et al.*, 2012; PARIMI; KOLLI, 2012; RUBAN *et al.*, 2012 ), cascas (OYEDEMI;AFOLAYAN, 2011; RAO *et al.*, 2012 ), frutos (BOULEKBACHE-MAKHLOUF *et al.*, 2013 ) sementes ( KIL *et al.*, 2009 ) e outras partes da planta ( DOS SANTOS *et al.*, 2008; TEKWU *et al.*, 2012 ).

As plantas medicinais representam uma rica fonte de agentes antimicrobianos (MAHESH; SATISH, 2008). Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistosomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas (ALVES *et al.*, 2000).

A atividade antimicrobiana de plantas medicinais tem sido pesquisada em diversas espécies e registrada em muitos países que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na sua utilização como África, Brasil, Cuba, Índia, México e Malásia (NASCIMENTO *et al.*, 2000; DI STASI *et al.*, 2002; SARTORATTO *et al.*, 2004). No Brasil a investigação sobre produtos naturais derivados de plantas com atividade antimicrobiana aumentou significativamente nos últimos anos. Entretanto, apesar da rica biodiversidade, somente estão disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas (DUARTE *et al.*, 2006).

Diversos constituintes já são conhecidos e estudos em modelos experimentais são empregados no sentido de entender suas atividades biológicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e dentre estes modelos encontra-se o de resistência bacteriana (MIYAKE *et al.*, 2004). Nesse contexto, os principais produtos vegetais que possuem atividade antimicrobiana são os extratos, os óleos essenciais, as frações látex e as proteínas (MATOS, 2007). Esses compostos destacam-se por controlar o crescimento dos microorganismos relacionados à pele, à cárie dental, incluindo as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SARTORATTO *et al.*, 2004).

### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana dos extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira (*Annona muricata* L.).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo fitoquímico dos extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira;
- Avaliar a capacidade antioxidante total dos extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira;
- Realizar análise microbiológica dos extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira por fungos e bactérias;
- Verificar o potencial anti-inflamatório dos extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira em edema de orelha induzido por xileno em camundongos;
- Estudar a atividade anti-inflamatória dos extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira em edema de orelha induzido por TPA em camundongos;
- Avaliar o efeito antibacteriano dos extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*.

## **4 MATERIAL**

---

### **4.1 Material Vegetal**

Foram utilizadas folhas de gravioleira (*Annona muricata* L.) colhidas no mês de agosto de 2009, no município de Trairi, Ceará, Lagoa das Flores na Frutagro Frutas Agroindustrial LTDA a 50 km de Fortaleza. A identificação botânica da folha foi realizada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, onde foi depositada, recebendo o “voucher” de número 49002.

As folhas frescas foram lavadas em água corrente e mergulhadas em solução de hipoclorito a 0,5%, lavadas novamente para retirada do excesso de hipoclorito e moídas no mesmo dia para posteriormente serem preparados os extratos etanólico e hexânico pelo Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC).

### **4.2 Animais**

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas, pesando entre 25 – 35g, provenientes de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório de Bioenergética, na Universidade Federal do Ceará, em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à ração e água. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC sob o protocolo de Nº 101/2011. Os animais foram manipulados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

### **4.3 Micro-organismos**

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira foram utilizados micro-organismos provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Esses micro-organismos são cepas-padrão do American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Listeria monocytogenes* (ATCC 33090) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028).

### **4.4 Drogas e reagentes**

Todos os reagentes listados na metodologia foram de grau analítico.

## 5 MÉTODOS

---

### 5.1 Preparo dos Extratos

Os extratos hexânico e etanólico foram preparados a partir das folhas moídas de *Annona muricata* L. seguindo metodologia de Matos (2009). As folhas, após secas expostas ao sol e moídas, foram pesadas e colocadas em um balão de vidro, de modo que todo o material ficasse submerso em hexano por dez dias, para possibilitar a extração dos princípios ativos das folhas. A solução obtida foi filtrada e evaporada em evaporador rotatório a uma temperatura de 69° C, obtendo-se o extrato hexânico (EH). O resíduo do material exposto ao hexano ficou três dias em repouso para evaporação do hexano residual e, posteriormente, foi submerso em etanol por mais dez dias com a mesma finalidade da extração anterior, para obtenção do extrato etanólico (EE). Após os dez dias, foram feitas filtração e evaporação completa do etanol em evaporador rotatório a 100° C para obtenção do referido extrato concentrado para posteriores estudos da composição fitoquímica e atividades antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana.

### 5.2 Estudo Fitoquímico dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Annona muricata*

#### 5.2.1 Preparo das amostras a partir dos extratos para determinação dos fitoquímicos

A caracterização fitoquímica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Matos (2009). Duzentos miligramas de cada extrato foram diluídos em 50 mL dos respectivos solventes, etanol e hexano. Cada solução foi dividida em porções de 3- 4 mL e transferidas para tubos de ensaio numerados de 1 a 4. Duas porções de 10 mL foram transferidas para béqueres numerados de 5 e 6 e submetidas a banho-maria até secagem.

##### 5.2.1.1 Determinação de Fenóis e Taninos

Para a avaliação da presença de fenóis e taninos, três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico 1 N foram adicionadas ao tubo 1 e o mesmo foi agitado. A mudança de coloração para azul ou vermelho indica a presença de fenóis e a formação de um precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e verde, a presença de taninos condensados. Utilizou-se como “branco” uma solução de água e cloreto férrico (MATOS, 2009).



#### *5.2.1.2 Determinação de Flavonoides*

Para verificar a presença de flavonoides, o tubo de número 2 foi alcalinizado a pH 11. O aparecimento de coloração amarela em meio alcalino indica a presença de flavonas, flavonóis e xantonas ou ainda uma coloração vermelho-laranja uma possível presença de flavanonóis. Quando a mudança de cor é para vermelho púrpuro, há possível presença de chalconas e auronas (MATOS, 2009).

#### *5.2.1.3 Determinação de Flavonóis, Flavononas, Flavonóis e Xantonas*

Para a detecção de flavonóis, flavononas, flavonóis e xantonas, foram adicionados 0,5 g de magnésio granulado e 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado ao tubo 3. Após o término da reação ou fim da efervescência, a visualização da mudança ou intensificação de cor para vermelho indicaria presença de tais compostos (MATOS, 2009).

#### *5.2.1.4 Determinação de Catequinas*

Para verificar a presença de catequinas foi utilizado um tubo de ensaio com 3-4 mL das amostras (tubo 4), de modo que este foi acidificado com HCl até atingir o pH 2 e aquecido em uma lamparina de álcool durante 3 minutos. A mudança de coloração para pardo-amarela indica a possível presença de catequinas. (MATOS, 2009).

#### *5.2.1.5 Determinação de Esteroides e Triterpenoides*

Para determinar a presença ou ausência de esteroides e triterpenoides, o resíduo seco do béquer 5 (item 5.2.1) foi extraído com 2 mL de clorofórmio (três vezes), formando uma solução clorofórmica que foi filtrada em um funil fechado com um fragmento de algodão e coberto com 100 mg de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Em seguida foi adicionado 1 mL de anidrido acético e três gotas de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado. Após agitação foi observada possível mudança de coloração. O resultado positivo foi determinado pela presença de uma coloração variando do azul ao verde para esteroides livres e uma coloração parda até vermelha para a presença de triterpenoides pentacíclicos livres (MATOS, 2009).

#### *5.2.1.6 Determinação de Saponinas*

A presença ou ausência de saponinas foi determinada a partir do resíduo insolúvel em clorofórmio obtido do teste anterior. Este foi dissolvido em 5-10 mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. O líquido obtido foi agitado por 3 minutos e foi observada a

formação ou não de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) é indicativa da presença de saponina (heterosídeos saponínicos) (MATOS, 2009).

#### *5.2.1.7 Determinação de Alcaloides*

A presença ou ausência de alcaloides foi determinada a partir do resíduo seco no béquer 6 que foi dissolvido em 5 mL de HCl a 5% e separada uma porção de 1 mL em tubo de ensaio. Em seguida foi adicionado 1 gota de reativo de Dragendorff. A visualização de precipitado floculoso vermelho tijolo indica presença de alcaloides (MATOS, 2009).

### **5.3 Atividade antioxidante total dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Annona muricata***

#### *5.3.1 Preparo do extrato*

O extrato utilizado para a determinação da atividade antioxidante total (métodos ABTS e DPPH) e polifenóis extraíveis totais foi obtido a partir de 2g de EE e EH concentrados, seguindo a metodologia de Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997). Foram pesados 2 g de EE e EH em um béquer, adicionados 40 mL de etanol 50%, homogeneizados e deixados em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Após essa etapa, foram submetidos à centrifugação a 5000 rpm durante 30 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido em um balão volumétrico de 100 mL e denominado sobrenadante 1. Ao precipitado da primeira extração foram adicionados 40 mL de acetona 70%, sendo homogeneizado e deixado em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Foi feita uma nova centrifugação a 5000 rpm durante 30 minutos, sendo o sobrenadante recolhido (sobrenadante 2) e adicionado ao balão volumétrico contendo o sobrenadante 1. O volume final (balão) foi ajustado para 100 mL com água destilada.

#### *5.3.2 Atividade antioxidante total pelo método ABTS*

Para a determinação da atividade antioxidante total (AAT) foi utilizada a metodologia descrita por Rufino e colaboradores (2007). Inicialmente, o radical ABTS $\bullet$ + (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) foi formado pela reação da solução ABTS 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura de 25°C na ausência de luz, por 16h. Uma vez formado, o radical foi diluído com álcool etílico até

a obtenção do valor de absorvância de  $0,700 \pm 0,020$  a 734 nm. A partir dos extratos obtidos no item 5.3.1 foram preparadas três diluições diferentes: 250, 500 e 1000 ppm, em triplicata. Em ambiente escuro, uma alíquota de 30  $\mu$ L de cada diluição dos extratos foi transferida para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS. Como antioxidante de referência foi utilizado o composto 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox, Sigma-2000  $\mu$ M). O decréscimo de absorvância a 734 nm foi medido depois de 6 minutos e então foi feita uma curva a partir dos valores de absorvâncias e concentrações das amostras. Os valores de AAT foram obtidos a partir da equação da reta:  $y = ax + b$ , substituindo o valor de y pela absorvância equivalente a 1000  $\mu$ M de Trolox, sendo os resultados expressos como TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox) em  $\mu$ M de Trolox/g de extrato.

### **5.3.3 Atividade antioxidante total pelo método DPPH**

O método de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH•), descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), é uma técnica simples e precisa para avaliar a atividade antioxidante. Inicialmente, foram preparadas três diferentes diluições: 250, 500 e 1.000 ppm dos extratos etanólico e hexânico. Em tubos de ensaio, em ambiente escuro, foram adicionados 0,1 mL de cada diluição do extrato e 3,9 mL do radical DPPH. O decréscimo na absorvância a 515 nm foi medida até sua estabilização. A atividade antioxidante foi calculada com base em uma curva padrão de doses decrescentes de DPPH, sendo expressa como a concentração de antioxidante requerida para reduzir a quantidade de radicais livres em 50% (EC<sub>50</sub>). Os valores de EC<sub>50</sub> foram calculados de acordo com Rufino e colaboradores (2007) e expressos como g de extrato/g DPPH.

## **5.4 Estudo dos antioxidantes não enzimáticos dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Annona muricata***

### **5.4.1 Determinação de Polifenóis Extraíveis Totais**

A quantificação dos polifenóis totais foi realizada conforme descrito por Obanda e Awuor (1997). Esse método envolve a redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade

aumenta linearmente a 700 nm. Em tubos de ensaio, foram adicionados, em ambiente escuro, 150 µL do extrato, completando para 1 mL com água destilada, 1 mL da solução Folin Ciocalteu (1:3), 2 mL da solução de carbonato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 20 %, 2 mL de água destilada e, em seguida, a mistura de reação foi homogeneizada. As concentrações de polifenóis solúveis totais foram calculadas com base em uma curva padrão de doses crescentes de ácido gálico 98% (Acros Organics). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Spectronic Genesys 2) em comprimento de onda de 700 nm, 30 minutos após a adição dos reagentes. Como padrão, foi utilizada uma solução de ácido gálico em diferentes concentrações e procedeu-se o experimento de forma semelhante ao realizado com os extratos. As concentrações de polifenóis solúveis totais foram calculadas com base nos dados obtidos a partir da curva padrão do ácido gálico 98%. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/ 100 g da amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### ***5.4.2 Determinação de Flavonoides Amarelos***

O teor de flavonoides amarelos foi determinado de acordo com o método de Francis (1982). Uma alíquota de 1 mL das amostras foi transferida para um balão volumétrico (50 mL), envolvido com papel alumínio, sendo o volume aferido com etanol-HCl (1,5 N) e deixado em repouso a 4°C por uma noite. O material foi filtrado e em seguida a absorbância foi medida a 374 nm. O branco foi composto apenas da solução de etanol-HCl (1,5 N). Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em mg/100 g de amostra através da fórmula:

Absorbância x fator de diluição/ (76,6)

#### ***5.4.3 Determinação de Antocianinas totais***

O teor de antocianinas totais foi determinado de acordo com o método de Francis (1982). Uma alíquota de 1 mL das amostras foi transferida para um balão volumétrico (50 mL), envolvido com papel alumínio, sendo o volume aferido com etanol-HCl (1,5 N) e deixado em repouso a 4°C por uma noite. Após esse tempo, o material foi então filtrado para um béquer (50 mL), sempre envolto por papel alumínio e em seguida, a absorbância foi medida a 535 nm. O branco foi composto apenas da solução de etanol-HCl (1,5 N). Todas as

análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em mg/100 g de amostra através da fórmula:

Absorbância x fator de diluição/ (98,2)

### **5.5 Análise microbiológica dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata***

A análise microbiológica para verificar possível contaminação dos extratos por bactérias ou fungos foi realizada seguindo metodologia proposta por Downes e Ito (2001). Para tanto, 0,1 mL de cada extrato e do DMSO foram inoculados em caldo nutritivo e incubados por 48 h a 35°C para crescimento de bactéria e caldo de batata dextrose por 72 h a 30°C para crescimento de fungo. Após esse período, foi observada a presença de turvação no meio e uma alíquota de cada suspensão foi semeada em placas com ágar nutritivo ou ágar batata dextrose (BDA), para verificar crescimento de bactérias e fungos, respectivamente e incubadas nas mesmas condições iniciais. Os resultados foram registrados como ausência ou presença de crescimento microbiano.

### **5.6 Efeito dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Annona muricata* L. sobre a resposta inflamatória**

#### ***5.6.1 Efeito do pré-tratamento com os extratos hexânico e etanólico de folhas de *Annona muricata* sobre a inflamação tópica induzida por xileno e TPA em camundongos***

##### ***5.6.1.1 Grupos experimentais***

Para avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos por via intragástrica (via i.g.), os animais foram distribuídos aleatoriamente em 10 grupos com dez animais cada, recebendo os tratamentos por 3 ou 7 dias consecutivos, antes da aplicação do xileno ou TPA. Descrição dos tratamentos por grupo:

- **Xileno:** animais foram tratados com 200 µL de salina fisiológica (NaCl 0,9%) por via i.g. por sete dias consecutivos;

- **TPA:** animais foram tratados com 200  $\mu$ L de salina fisiológica (NaCl 0,9%) por via i.g. por sete dias consecutivos;
- **DMSO:** animais foram tratados com 200  $\mu$ L de DMSO a 5% em salina fisiológica por via i.g. por sete dias consecutivos;
- **EH10:** animais foram tratados com 200  $\mu$ L de EH 10 mg/kg em DMSO a 5% por via i.g. por sete dias consecutivos;
- **EH100:** animais foram tratados com 200  $\mu$ L de EH 100 mg/kg em DMSO a 5% por via i.g. por sete dias consecutivos;
- **EH1000:** animais foram tratados com 200  $\mu$ L de EH 1000 mg/kg em DMSO a 5% por via i.g. por sete dias consecutivos;
- **EE10:** animais receberam 200  $\mu$ L de EE 10 mg/kg em DMSO a 5% por via i.g. durante 7 dias consecutivos;
- **EE100:** animais receberam 200  $\mu$ L de EE 100 mg/kg em DMSO a 5% por via i.g. durante 7 dias consecutivos;
- **EE1000:** animais receberam 200  $\mu$ L de EE 1000 mg/kg em DMSO a 5% por via i.g. durante 7 dias consecutivos;
- **Dexa:** animais que receberam dexametasona (2,5 mg/kg) por via i.g. durante 3 dias consecutivos;
- **Indo:** animais que receberam indometacina (5mg/kg) por via i.g. durante 3 dias consecutivos.

#### 5.6.1.2 Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de xileno

Para induzir o edema, 50  $\mu$ L de xileno foram aplicados nas faces interna (25  $\mu$ L) e externa (25  $\mu$ L) da orelha direita dos animais. A espessura da orelha direita de cada animal antes da aplicação dos agentes irritantes foi usada como controle neste ensaio. No último dia dos tratamentos, a espessura da orelha de todos os animais foi mensurada antes e 1 hora após a indução da resposta inflamatória usando um micrômetro digital (Mitutoyo Serie 293). O edema foi expresso como aumento da espessura (mm) da orelha após o desafio inflamatório, calculado pela  $\Delta$ [espessura depois - espessura antes]. Já para a atividade anti-inflamatória, os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do edema induzido pelos tratamentos com os extratos e pelos fármacos anti-inflamatórios (dexametasona e indometacina) em comparação ao grupo que não recebeu nenhum tratamento (Grupo Xileno) (DE YOUNG *et al.*, 1989).

### *5.6.1.3 Avaliação do Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Tópica de TPA*

Uma hora após o último tratamento, o edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/20µL acetona) na orelha direita de camundongos. A espessura da orelha foi avaliada antes e 6h após aplicação do agente flogístico. O edema e a atividade anti-inflamatória foram mensurados conforme descrito no subitem 5.6.1.2 (DE YOUNG *et al.*, 1989).

## *5.6.2 Efeito do tratamento tópico dos extratos etanólico e hexânico das folhas de Annona muricata sobre o edema de orelha induzido por xileno e TPA*

### *5.6.2.1 Grupos experimentais*

Para avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos por via tópica, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 10 grupos com dez animais cada e submetidos a diferentes tratamentos:

- **Xileno:** animais em que o xileno foi aplicado na orelha direita (50µL/orelha) e não receberam nenhum tratamento;
- **TPA:** animais em que o TPA foi aplicado na orelha direita (20µL/orelha) e não receberam nenhum tratamento;
- **Acet:** animais em que acetona (20 µL) foi aplicada na orelha direita;
- **EH10:** animais que receberam 20 µL de EH (10 mg/kg ou 0,37 mg/orelha), logo após aplicação de xileno na orelha direita (50µL/orelha);
- **EH100:** animais que receberam 20 µL de EH (100 mg/kg ou 3,7 mg/orelha), logo após aplicação de xileno na orelha direita (50µL/orelha);
- **EH1000:** animais que receberam 20 µL de EH (1000 mg/kg ou 37 mg/orelha), logo após aplicação de xileno na orelha direita (50µL/orelha);
- **EE10:** animais tratados com 20 µL de EE (10 mg/kg ou 0,37 mg/orelha), logo após aplicação de xileno na orelha direita (50µL/orelha);
- **EE100:** animais tratados com 20 µL de EE (100 mg/kg ou 3,7 mg/orelha), logo após aplicação de xileno na orelha direita (50µL/orelha);
- **EE1000:** animais tratados com 20 µL de EE (1000 mg/kg ou 37 mg/orelha), logo após aplicação de xileno na orelha direita (50µL/orelha);

- **Dexa:** animais que receberam dexametasona (2,5 mg/kg) via intragástrica por 3 dias consecutivos antes da aplicação de xileno na orelha direita (50µL/orelha);
- **Indo:** animais que receberam indometacina (5mg/kg) via intragástrica por 3 dias consecutivos antes da aplicação de xileno na orelha direita (50µL/orelha).

A avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de xileno e TPA foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente no item 5.6 (subitens 5.6.1.2 e 5.6.1.3).

### **5.7 Avaliação da Atividade Antibacteriana dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata***

Para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Listeria monocytogenes* (ATCC 33090) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028). Todas as bactérias estavam preservadas em ágar inclinado com uma camada de óleo mineral em temperaturas de refrigeração. Um dia antes da realização do experimento, as culturas foram reativadas, sendo transferidas com auxílio de alças estéreis e inoculadas em 15 mL de caldo de infusão de cérebro-coração (BHI) e incubadas a 37°C, seguindo protocolo previamente estabelecido e padronizado (NCCLS, 2003; SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011).

A atividade antibacteriana dos extratos foi verificada por meio da técnica de disco-difusão, de acordo com o protocolo de Kirby-Bauer padronizado pela NCCLS (2003). Com o auxílio de swab estéril, a suspensão obtida, após 24 horas de crescimento bacteriano no BHI, foi semeada na superfície de uma placa de ágar Müeller-Hinton, em duas direções, por duas vezes consecutivas, até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do inóculo, foram aplicados discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro, impregnados com DMSO ou EE ou EH. Os testes foram realizados em triplicatas. As leituras foram realizadas após 24 horas de incubação a 35°C, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em milímetros com auxílio de régua milimetrada e o valor considerado foi a média aritmética das triplicatas.



## 5.8 Análise Estatística

Para a realização da análise estatística dos dados os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. Quando os resultados mostraram-se paramétricos, para comparar os dados entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Para os resultados não paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas com um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism version 5.2, San Diego Califórnia, EUA.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização fitoquímica qualitativa dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata*

No extrato etanólico de folhas de *A. muricata*, foram detectados taninos condensados, esteroides, flavonóis, flavonas, flavanonas, xantonas e flavonoides (Tabela 1). Já no extrato hexânico das folhas de *A. muricata*, foi evidenciada a presença de esteroides. Não foram evidenciados taninos hidrolisáveis, catequinas, triterpenoides, saponinas, quinonas e alcaloides em nenhum dos extratos (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização fitoquímica *in vitro* dos extratos etanólico (EE) e hexânico (EH) de folhas de *Annona muricata* L.

Fitoquímicos	EE	EH
Fenóis	-	-
Taninos condensados	+	-
Taninos hidrolisáveis	-	-
Catequinas	-	-
Flavonóis	+	-
Flavonas	+	-
Flavononas	+	-
Flavonoides	+	-
Xantonas	+	-
Esteroides	+	+
Triterpenoides	-	-
Saponinas	-	-
Quinonas	-	-
Alcaloides	-	-

(+) Presença e (-) Ausência

## 6.2 Caracterização fitoquímica quantitativa dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata*

A Tabela 2 mostra os teores de antioxidantes presentes nos extratos etanólico e hexânico de folhas de gravioleira. Os teores de antocianinas, flavonoides amarelos e polifenóis totais para o EE foram de 1.298,40 mg; 2.121,40 mg e 9.981,15 µg por 100 g de amostra, respectivamente. Os teores de antocianinas, flavonoides amarelos e polifenóis totais para o EH foram de 142,60 mg; 159 mg e 2.916,09 µg por 100 g de amostra, respectivamente.

Tabela 2 - Conteúdo de antocianinas, flavonoides amarelos e polifenóis presentes nos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Annona muricata*.

	EE	EH
<b>Antocianinas (mg/100g)</b>	1.298,40 ± 1	142,6 ± 1,41
<b>Flavonoides amarelos (mg /100g)</b>	2.121,40 ± 2	159 ± 4,24
<b>Polifenóis totais (µg/100g)</b>	9.981,15 ± 5,33	2.916,09 ± 5,33

## 6.3 Atividade antioxidante total dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata*

A Tabela 3 apresenta a atividade antioxidante dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *A. muricata* através dos métodos ABTS e DPPH. Pelo método ABTS, EE apresentou TEAC de 822,35 µMol Trolox/g, enquanto que EH apresentou valor de 104,85 µMol Trolox/g. Esse resultado foi confirmado pelo método DPPH, em que EE apresentou 166,49 g de extrato/g DPPH e para EH foi de 4.089,65 g de extrato /g DPPH. EE apresentou, nos dois testes, maior atividade antioxidante.

Tabela 3. Atividade antioxidante total dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata*

<b>Atividade antioxidante</b>	<b>EE</b>	<b>EH</b>
<b>ABTS<sup>+</sup></b> <b>(<math>\mu</math>Mol Trolox/g)</b>	<b>822,35 <math>\pm</math> 8,67</b>	<b>104,85 <math>\pm</math> 5,43</b>
<b>DPPH<sup>·</sup></b> <b>(g/g DPPH<sup>·</sup>)</b>	<b>166,49 <math>\pm</math> 11,18</b>	<b>4.089,65 <math>\pm</math> 11,04</b>

#### 6.4 Avaliação da contaminação dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata* por bactérias e fungos

Não foi evidenciado crescimento de bactérias ou fungos em nenhum dos extratos (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da presença de bactérias ou fungos nos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata* L.

	<b>EE</b>	<b>EH</b>
<b>Crescimento de bactérias</b>	-	-
<b>Crescimento de fungos</b>	-	-

-: ausência de crescimento +: presença de crescimento

## **6.5 Efeito dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata* sobre a resposta inflamatória**

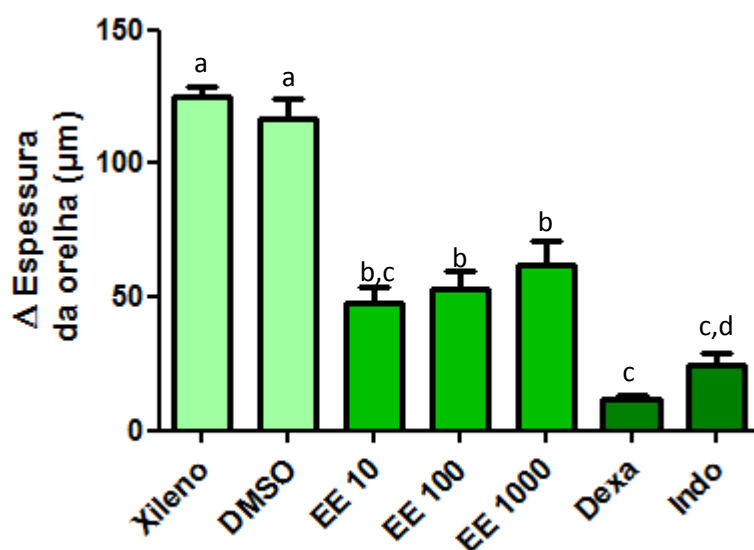
### ***6.5.1 Efeito do pré-tratamento com os extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata* sobre a inflamação tópica induzida por xileno e TPA em camundongos***

As figuras 7 e 8 e a tabela 5 apresentam o efeito anti-inflamatório da administração oral do EE nos ensaios de edema de orelha induzido por xileno e TPA em camundongos.

Na Figura 7, pode-se observar que a aplicação de xileno provocou inflamação em todos os grupos analisados, sendo a maior espessura da orelha evidenciada para os grupos Xileno ( $124,67 \pm 11,34 \mu\text{m}$ ) e DMSO ( $114,86 \pm 20,74 \mu\text{m}$ ). Os valores médios de edema, mensurados pelo aumento da espessura da orelha, para os grupos EE 10, 100 e 1000 foram de  $47,71 \pm 15,52 \mu\text{m}$ ;  $52,71 \pm 19,15 \mu\text{m}$  e  $62,28 \pm 23 \mu\text{m}$ , respectivamente. Os grupos Dexa e Indo apresentaram os menores valores de edema ( $11,43 \pm 4,47 \mu\text{m}$  e  $24,71 \pm 11,18 \mu\text{m}$ , respectivamente), diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) do grupo Xileno. Os grupos EE 10 e EE 100 não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) do grupo Indo. O grupo EE 10 apresentou neste ensaio o menor valor para o extrato etanólico.

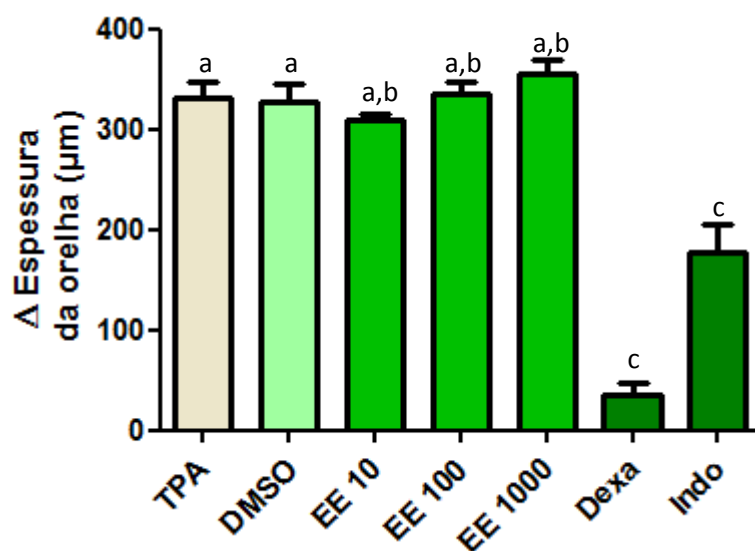
A aplicação de TPA na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo da espessura da orelha seis horas após o estímulo nos grupos TPA, DMSO, EE10, EE100 e EE1000 (Figura 8), com valores de espessura da orelha de  $332,3 \pm 48,03 \mu\text{m}$ ,  $327,71 \pm 46,96 \mu\text{m}$ ,  $312,8 \pm 18,11 \mu\text{m}$ ,  $342,6 \pm 40 \mu\text{m}$ , e  $364,4 \pm 48,43 \mu\text{m}$ , respectivamente. Dexa e Indo apresentaram valores de espessura da orelha de:  $31,38 \pm 29,42 \mu\text{m}$  e  $176,43 \pm 76 \mu\text{m}$ , respectivamente, diferindo significativamente do grupo TPA.

Figura 7. Efeito do pré-tratamento com o extrato etanólico de folhas de *Annona muricata* sobre a inflamação tópica induzida por xileno em camundongos.



Os animais foram tratados via i.g. com salina (0,9% NaCl, 200μL/ animal- Grupo Xileno), o veículo (DMSO a 5%, 200μL/ animal- Grupo DMSO) e EE nas concentrações 10, 100 e 1000 mg/kg (Grupos EE10, EE100 e EE1000) durante 7 dias antes da aplicação do xileno. Os fármacos de referência, dexametasona (2,5 mg/kg- Grupo Dexa) e indometacina (5 mg/kg- Grupo Indo), foram administrados (via i.g.) por 3 dias antes da aplicação do xileno. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Figura 8. Efeito do pré-tratamento com o extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* sobre a inflamação tópica induzida por TPA em camundongos.



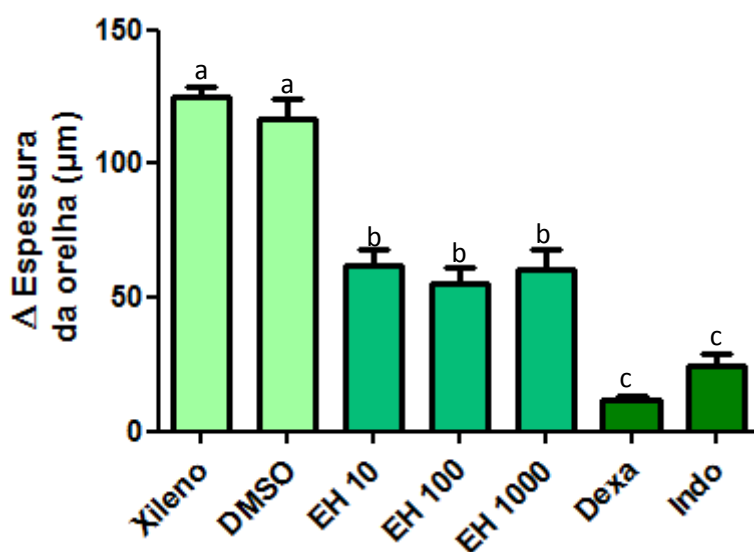
Os animais foram tratados via i.g. com salina (0,9% NaCl, 200μL/ animal- Grupo TPA), o veículo (DMSO a 5%, 200μL/ animal- Grupo DMSO) e EE nas concentrações 10, 100 e 1000 mg/kg (Grupos EE10, EE100 e EE1000) durante 7 dias antes da aplicação do TPA. Os fármacos de referência, dexametasona (2,5 mg/kg- Grupo Dexa) e indometacina (5 mg/kg- Grupo Indo), foram administrados (via i.g.) por 3 dias antes da aplicação do TPA. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

As figuras 9 e 10 e a tabela 5 apresentam o efeito anti-inflamatório da administração oral do EH nos ensaios de edema de orelha induzido por xileno e TPA em camundongos.

Na Figura 9, pode-se evidenciar que a aplicação de xileno induziu edema em todos os grupos, sendo a maior espessura da orelha evidenciada para os grupos Xileno ( $124,67 \pm 11,43 \mu\text{m}$ ) e DMSO ( $114,86 \pm 20,74 \mu\text{m}$ ). O EH foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) o edema, sendo a espessura das orelhas de  $62,28 \pm 14,37 \mu\text{m}$ ;  $55,57 \pm 14,57 \mu\text{m}$  e  $60,14 \pm 21,08 \mu\text{m}$  para EH10, EH100 e EH1000, respectivamente. Não houve diferença significativa entre esses grupos ( $p > 0,05$ ). As menores espessuras das orelhas foram mensuradas nos grupos Dexa e Indo, com valores de  $11,43 \pm 4,47 \mu\text{m}$  e  $24,71 \pm 11,18 \mu\text{m}$ , respectivamente e diferindo significativamente de todos os grupos testados (EH 10, 100 e 1000) ( $p < 0,05$ ).

A aplicação de TPA na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo da espessura da orelha seis horas após o estímulo nos grupos TPA, DMSO, EH10, EH100 e EH1000 (Figura 10), com valores de espessura da orelha de  $332,3 \pm 48,03 \mu\text{m}$ ,  $327,71 \pm 46,96 \mu\text{m}$ ,  $264,5 \pm 44,78 \mu\text{m}$ ,  $313,7 \pm 22,5 \mu\text{m}$  e  $328,5 \pm 39,70 \mu\text{m}$ , respectivamente. Dexa e Indo apresentaram valores de espessura da orelha de:  $31,38 \pm 29,42 \mu\text{m}$  e  $176,46 \pm 76 \mu\text{m}$ , respectivamente, diferindo significativamente do grupo TPA.

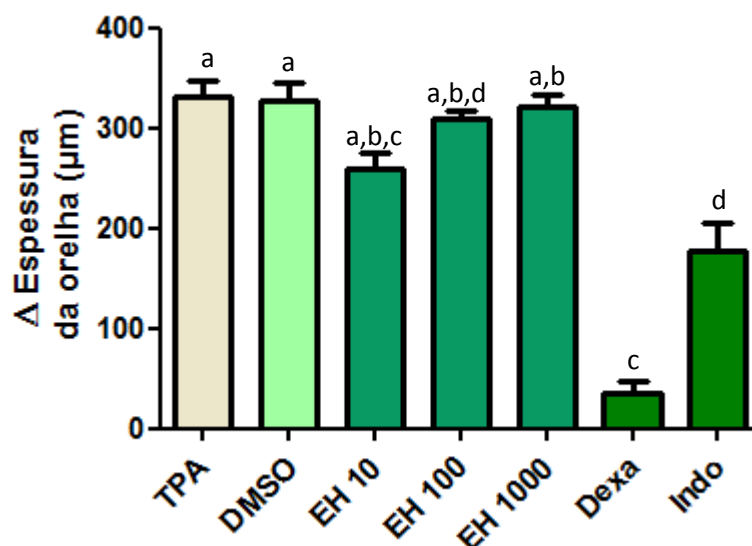
Figura 9. Efeito do pré-tratamento com o extrato hexânico de folhas de *Annona muricata* sobre a inflamação tópica induzida por xileno em camundongos.



Os animais foram tratados via i.g. com salina (0,9% NaCl, 200μL/ animal- Grupo Xileno), o veículo (DMSO a 5%, 200μL/ animal- Grupo DMSO) e EH nas concentrações 10, 100 e 1000 mg/kg (Grupos EH10, EH100 e EH1000) durante 7 dias antes da aplicação do xileno. Os fármacos de referência, dexametasona (2,5 mg/kg-

Grupo Dexa) e indometacina (5 mg/kg- Grupo Indo), foram administrados (via i.g.) por 3 dias antes da aplicação do xileno. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Figura 10. Efeito do pré-tratamento com o extrato hexânico das folhas de *Annona muricata* sobre a inflamação tópica induzida por TPA em camundongos.



Os animais foram tratados via i.g. com salina (0,9% NaCl, 200μL/ animal- Grupo TPA), o veículo (DMSO a 5%, 200μL/ animal- Grupo DMSO) e EH nas concentrações 10, 100 e 1000 mg/kg (Grupos EH10, EH100 e EH1000) durante 7 dias antes da aplicação do TPA. Os fármacos de referência, dexametasona (2,5 mg/kg- Grupo Dexa) e indometacina (5 mg/kg- Grupo Indo), foram administrados (via i.g.) por 3 dias antes da aplicação do TPA. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 5 apresenta o percentual de inibição do pré-tratamento com os extratos etanólico e hexânico, como também o percentual de inibição dos grupos DMSO, Dexa e Indo sobre a inflamação induzida por xileno ou TPA. EE nas concentrações de 10, 100 e 1000 mg/kg reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o edema induzido por xileno, correspondendo a valores de percentual de redução de 61,72%; 57,71% e 50,03%; respectivamente, quando comparados ao grupo Xileno. Os fármacos de referência, dexametasona e indometacina, reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) o edema induzido por xileno, mostrando uma redução de 90,89% e 80,17%, respectivamente. Já EH frente a esse agente flogístico apresentou percentuais de inibição de 50,04% para EH10, 57,08% para EH100 e 53,42% para EH1000. As doses de EH não diferiram significativamente das doses de EE, mas ambos os extratos diferiram significativamente das drogas padrões utilizadas. Não houve inibição do edema induzido por TPA pelo DMSO, EE e EH nas diferentes concentrações. Somente dexametasona e indometacina foram capazes de reduzir em 89,29% e 46,91%, respectivamente, o edema induzido por TPA.



Tabela 5. Efeito do pré -tratamento com EE e EH sobre a inflamação induzida por Xileno e TPA

TRATAMENTOS	INIBIÇÃO (%)	
	XILENO	TPA
<b>VEÍCULO</b>	-	-
<b>EE 10</b>	61,72	-
<b>EE 100</b>	57,71	-
<b>EE 1000</b>	53,42	-
<b>EH 10</b>	50,04	23,33
<b>EH 100</b>	57,08	-
<b>EH 1000</b>	53,42	-
<b>DEXA</b>	90,89	89,29
<b>INDO</b>	80,17	46,91

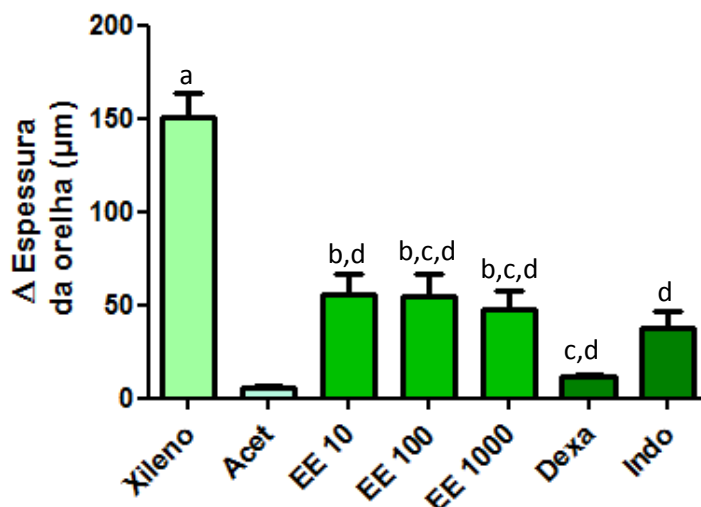
### ***6.5.2 Efeito do tratamento tópico com os extratos etanólico e hexânico das folhas de *Annona muricata* sobre o edema de orelha induzido por xileno e TPA em camundongos***

As figuras 11 e 12 e a tabela 6 apresentam o efeito anti-inflamatório da administração tópica de EE nos ensaios de edema de orelha induzido por xileno e TPA em camundongos.

Na figura 11, pode-se observar o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico por via tópica frente à indução da inflamação com xileno. A maior inflamação foi induzida no grupo xileno, com médias de espessura de orelha de  $150,22 \pm 40,08 \mu\text{m}$ . Os tratamentos com EE e EH ( $50 \mu\text{L/ orelha}$ ) foram feitos imediatamente após a indução do edema pelo xileno e a espessura da orelha foi medida antes e após 1h da aplicação do agente flogístico. O edema foi de  $55,28 \pm 29,91 \mu\text{m}$  para EE10,  $54,43 \pm 32,90 \mu\text{m}$  para EE100 e  $61,5 \pm 29,36 \mu\text{m}$  para EE1000. Já para os grupos Dexa e Indo, os edemas foram de  $14,33 \pm 12,38 \mu\text{m}$  e  $49,67 \pm 31,23 \mu\text{m}$ , respectivamente. Não foi observado edema significativo no grupo Acet em que foi aplicada apenas acetona nas orelhas dos animais.

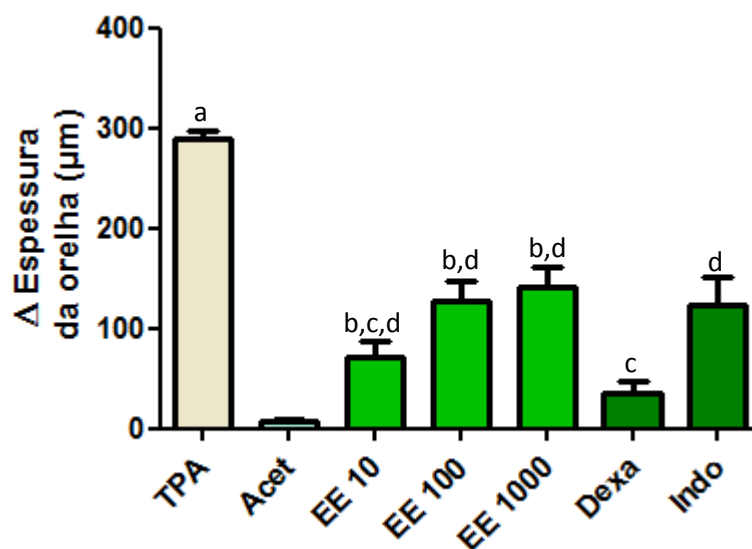
A figura 12 mostra o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico por via tópica frente ao edema induzido por TPA. A aplicação tópica de TPA foi capaz de provocar edema, sendo a maior inflamação evidenciada no grupo sem nenhum tratamento (TPA) com valor de edema de  $289,2 \pm 28,83 \mu\text{m}$ . EE foi capaz de causar uma redução no edema, apresentando valores de espessura da orelha de  $72,28 \pm 41,46 \mu\text{m}$  para EE10;  $128,14 \pm 48,23 \mu\text{m}$  para EE100 e  $140,57 \pm 69 \mu\text{m}$  para EE1000. Dexa e Indo apresentaram valores de espessura da orelha de:  $28,57 \pm 30,6 \mu\text{m}$ , e  $122,57 \pm 69,2 \mu\text{m}$ , respectivamente, diferindo significativamente do grupo TPA. Apenas EE10 não diferiu significativamente dos grupos Dexa e Indo. Não foi observado edema significativo no grupo Acet em que foi aplicada apenas acetona nas orelhas dos animais.

Figura 11. Efeito do tratamento tópico com extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* sobre o edema de orelha induzido por xileno.



Grupo Xileno- animais em que se induziu a inflamação com xileno e não receberam tratamento. Grupos EE10, EE100 e EE1000- os animais foram tratados com a aplicação tópica dos extratos, nas diferentes concentrações, imediatamente após a indução da inflamação com o xileno (50µL/ orelha). Grupo Acet- O veículo (acetona) foi aplicado por via tópica, sem ter sido induzida inflamação com xileno. Os fármacos de referência, dexametasona (2,5 mg /kg- Grupo Dexa) e indometacina (5 mg /kg- Grupo Indo), foram administradas por via i.g. por 3 dias antes da aplicação do xileno. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Figura 12. Efeito do tratamento tópico com o extrato etanólico de folhas de *Annona muricata* sobre o edema de orelha induzido por TPA.



Grupo TPA- animais em que se induziu a inflamação com TPA (2,5 µg/ orelha em 20µL acetona) e não receberam tratamento. Grupos EE10, EE100 e EE1000- os animais foram tratados com a aplicação tópica dos extratos, nas diferentes concentrações, imediatamente após a indução da inflamação com TPA. Grupo Acet- O veículo (acetona) foi aplicado por via tópica, sem ter sido induzida inflamação com TPA. Os fármacos de referência, dexametasona (2,5 mg /kg- Grupo Dexa) e indometacina (5 mg /kg- Grupo Indo), foram administrados por via i.g. por 3 dias antes da aplicação do TPA. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

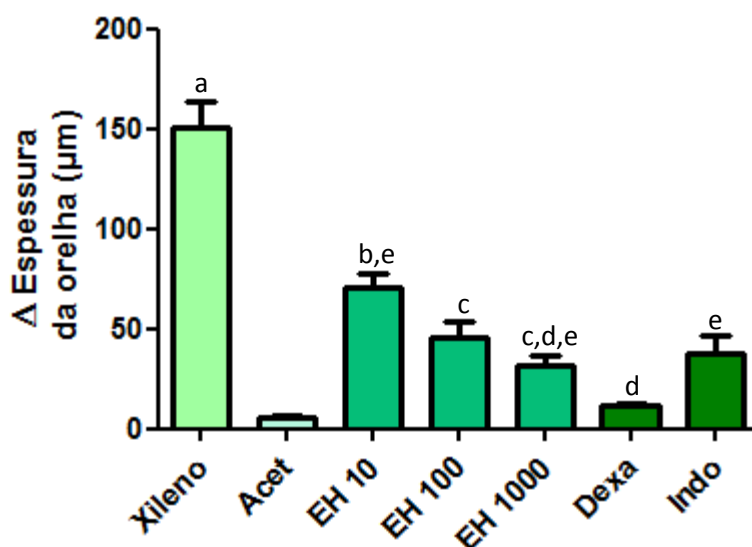
As figuras 13 e 14 e a tabela 6 apresentam o efeito anti-inflamatório da administração tópica do EH nos ensaios de edema de orelha induzido por xileno e TPA em camundongos. Na figura 13, pode-se observar o efeito anti-inflamatório do extrato hexânico por via tópica frente à indução da inflamação com xileno. A maior inflamação foi induzida no grupo xileno, com médias de espessura de orelha de  $150,22 \pm 40,08 \mu\text{m}$ . Quando aplicado topicamente (Figura 12), o EH foi capaz de reduzir significativamente o edema induzido por xileno. Como evidenciado pelos valores de edema ( $\mu\text{m}$ ) de  $71,14 \pm 16,03$  para EH10,  $45,71 \pm 21,10$  para EH100 e  $31,71 \pm 14,04$  para EH1000 sendo esse perfil de redução dose-dependente. EH100 e EH1000 não diferiram significativamente dos grupos Dexa ( $14,33 \mu\text{m} \pm 12,38$ ) e Indo ( $49,67 \mu\text{m} \pm 31,23$ ). Não foi observado edema significativo no grupo Acet em que foi aplicada apenas acetona nas orelhas dos animais.

A figura 14 apresenta o efeito anti-inflamatório do extrato hexânico por via tópica frente à indução da inflamação com TPA. A maior inflamação foi induzida no grupo TPA, com médias de espessura de orelha de  $289,2 \pm 28,83 \mu\text{m}$ . Todas as concentrações do EH foram capazes de reduzir o edema causado pelo TPA, com médias de  $45,14 \pm 29,33 \mu\text{m}$  para EH10;  $90,58 \pm 40,57 \mu\text{m}$  para EH100 e  $98,43 \pm 20,22 \mu\text{m}$  para EH 1000. Nenhuma concentração de EH diferiu significativamente do grupo Dexa ( $14,33 \pm 12,38 \mu\text{m}$ ). O grupo Indo apresentou edema de  $122,57 \pm 69,2 \mu\text{m}$ . Não foi observado edema significativo no grupo Acet em que foi aplicada apenas acetona nas orelhas dos animais.

A Tabela 6 apresenta o percentual de inibição do tratamento tópico com os extratos etanólico e hexânico, como também o percentual de inibição dos grupos Dexa e Indo sobre a inflamação induzida por xileno ou TPA. EE apresentou, em relação ao grupo xileno, percentual de inibição de 67,95 % para EE1000; 63,77% para EE100 e 63,20% para EE10, não havendo diferença entre os grupos. EH apresentou percentual de inibição dose-dependente, com valores de 78,89% para EH1000; 69,57% para EH100 e 52,64% para EH10. Dexametasona e Indometacina foram capazes de reduzir em 92,5% e 75% a inflamação induzida por xileno, respectivamente.

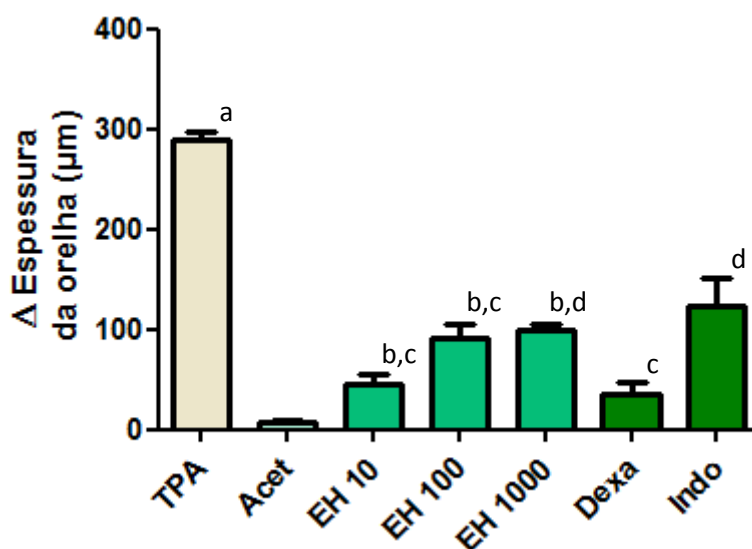
Já em relação ao TPA (Tabela 6), o tratamento tópico com EE apresentou inibição máxima para EE10 com percentual de inibição de 75%, seguido por 56% para EE100 e 51% para EE1000. EH apresentou comportamento semelhante, com um percentual de inibição de 84,39% para EH10; 68,68% para EH100 e 65,96% para EH1000. Dexametasona e Indometacina foram capazes de reduzir significativamente a inflamação em relação ao grupo TPA, com um percentual de 90,12% e 57,62%, respectivamente.

Figura 13. Efeito do tratamento tópico com extrato hexânico de folhas de *Annona muricata* sobre o edema de orelha induzido por xileno.



Grupo Xileno- animais em que se induziu a inflamação com xileno e não receberam tratamento. Grupos EH10, EH100 e EH1000- os animais foram tratados com a aplicação tópica dos extratos, nas diferentes concentrações, imediatamente após a indução da inflamação com o xileno (50µL/ orelha). Grupo Acet- O veículo (acetona) foi aplicado por via tópica, sem ter sido induzida inflamação com xileno. Os fármacos de referência, dexametasona (2,5 mg /kg- Grupo Dexa) e indometacina (5 mg /kg- Grupo Indo), foram administradas por via i.g. por 3 dias antes da aplicação do xileno. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Figura 14. Efeito do tratamento tópico com extrato hexânico de folhas de *Annona muricata* sobre o edema de orelha induzido por TPA.



Grupo TPA- animais em que se induziu a inflamação com TPA (2,5 µg/ orelha em 20µL acetona) e não receberam tratamento. Grupos EH10, EH100 e EH1000- os animais foram tratados com a aplicação tópica dos extratos, nas diferentes concentrações, imediatamente após a indução da inflamação com TPA. Grupo Acet- O veículo (acetona) foi aplicado por via tópica, sem ter sido induzida inflamação com TPA. Os fármacos de referência, dexametasona (2,5 mg /kg- Grupo Dexa) e indometacina (5 mg /kg- Grupo Indo), foram administradas por via i.g. por 3 dias antes da aplicação do TPA. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

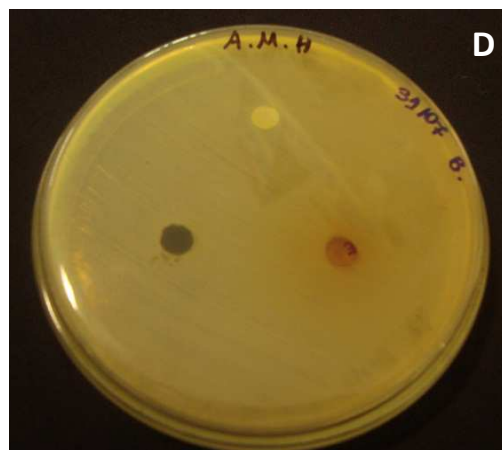
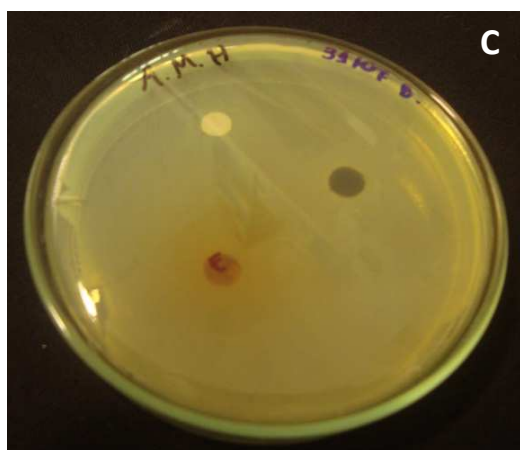
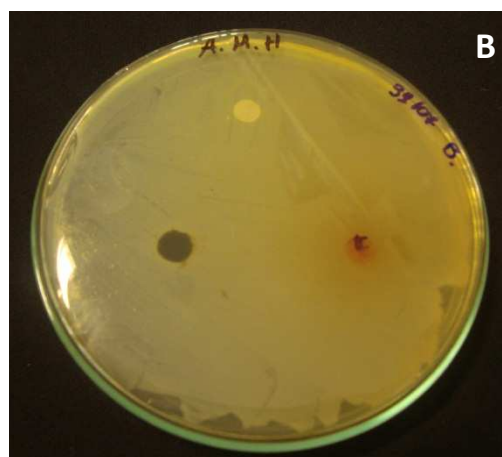
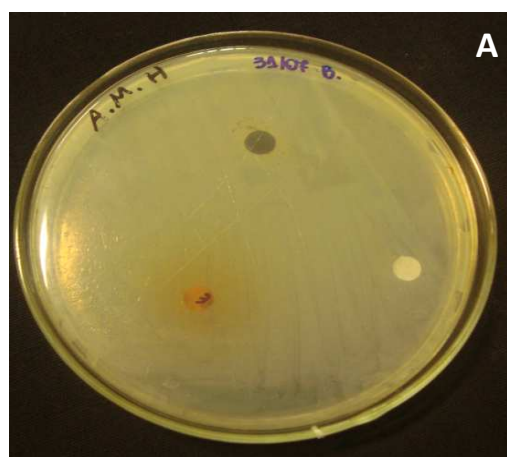
Tabela 6. Efeito do tratamento tópico com EE e EH na inflamação induzida por xileno ou TPA.

TRATAMENTOS	INIBIÇÃO (%)	
	XILENO	TPA
<b>VEÍCULO</b>	-	-
<b>EE 10</b>	63,20	75
<b>EE 100</b>	63,77	55,69
<b>EE 1000</b>	67,95	51,39
<b>EH 10</b>	52,64	84,39
<b>EH 100</b>	69,57	68,68
<b>EH 1000</b>	78,89	65,96
<b>DEXA</b>	92,5	90,12
<b>INDO</b>	75	57,62

## 6.6 Avaliação da Atividade Antibacteriana dos extratos etanólico e hexânico das folhas de gravioleira.

A Figura 15 apresenta fotos das placas de cultivo após ensaios de disco-difusão em ágar. Cada placa foi semeada com inóculo de uma das culturas microbianas estudadas: *Staphylococcus aureus* (A), *Listeria monocytogenes* (B), *Escherichia coli* (C) e *Salmonella choleraesuis* (D) e discos de filtros impregnados com DMSO, EE e EH foram adicionados à placa. Não foram observados halos de inibição de crescimento para DMSO, EE ou EH contra nenhuma das cepas bacterianas testadas.

Figura 15. Efeito dos extratos hexânico e etanólico sobre a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (A), *Listeria monocytogenes* (B), *Escherichia coli* (C) e *Salmonella choleraesuis* (D).



## 7. DISCUSSÃO

---

*Annona muricata* é utilizada popularmente no tratamento tópico de infecções cutâneas, como também em formas de chás para o tratamento de algumas doenças. Estudos realizados com algumas espécies do gênero *Annona* têm demonstrado que algumas destas espécies apresentam atividades antioxidante (BARRECA *et al.*, 2011; GUPTA-ELERA *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2011; LOIZZO *et al.*, 2012; VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2013), anti-inflamatória (De SOUSA *et al.*, 2010; ROSLIDA *et al.*, 2012), analgésica (CARBALLO *et al.*, 2010; CHAVAN *et al.*, 2010) e antimicrobiana (OSORIO *et al.*, 2007; RAHMAN *et al.*, 2005), dentre outras (CAVALCANTI *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2011; LIMA *et al.*, 2011; VIVEK *et al.*, 2012;. VILA-NOVA *et al.*, 2013). Dentre os principais constituintes químicos encontrados nas espécies da família *Annonaceae* destacam-se os alcaloides, carboidratos, lipídeos, aminoácidos, proteínas, polifenóis, terpenos, compostos aromáticos e acetogeninas (COSTA *et al.*, 2008).

A fim de verificar as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana dos extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira, foi realizada inicialmente uma investigação da composição fitoquímica desses extratos. Evidenciou-se a presença de flavonóis, flavononas, flavononóis, flavonoides e esteroides em EE e somente esteroides em EH. Esses resultados corroboram com os de OLIVEIRA (2011), que ao trabalhar com os mesmos extratos de folhas *Annona muricata*, evidenciou a presença de esteroides em ambos os extratos, além de outros compostos em EE, como taninos e saponinas. Esses constituintes foram anteriormente encontrados em plantas da família *Annonaceae*: Brito e colaboradores (2008) ao estudarem a composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* observaram positividade para alcaloides, flavonoides, flavononas, triterpenoides, esteroides, flavonas, flavonóis, dentre outros, enquanto Matsumoto e colaboradores (2010) observaram a presença de taninos, flavonoides e triterpenos em extrato metanólico de folhas de *Annona glaba*, dados estes que corroboram com os resultados encontrados nesse estudo.

No estudo em questão foram ainda determinados os teores de antocianinas, flavonoides amarelos e polifenóis totais, no qual EE apresentou teor de antocianinas 9 vezes superior ao encontrado para EH, de flavonoides amarelos cerca de 13 vezes superior ao determinado para EH e de polifenóis totais cerca de 3 vezes superior ao de EH.



Outra etapa consistiu na determinação da capacidade antioxidante de EE e EH. Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, tendo em vista a grande variedade de compostos com propriedades antioxidantes, além da complexidade quanto ao seu modo de combater os distintos radicais livres (SOARES *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2007). Esses métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução do metal (FRAP; CUPRAC), captura de radical orgânico (ABTS, DPPH), captura do radical hidroxila, entre outros. Dentre esses, ABTS, FRAP, DPPH e ORAC são os mais usados. É recomendada a utilização de pelo menos dois ensaios para que os resultados combinados possam fornecer uma resposta confiável da capacidade antioxidante total de uma substância a ser analisada (KUBO *et al.*, 2006; RUFINO *et al.*, 2009). Por isso, as capacidades antioxidantes totais de EE e EH foram determinadas pelos métodos de captura do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) e ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato).

Vale salientar que o método ABTS é baseado na habilidade dos antioxidantes de capturar o cátion ABTS<sup>+</sup>. Esta captura provoca um decréscimo na absorbância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos sendo comparada com uma quantidade padrão do antioxidante sintético Trolox (PEREZ-JIMENEZ; SAURACALIXTO, 2006; ALVES; BRITO; RUFINO, 2006). Em relação à capacidade antioxidante total pelo método do radical ABTS, a atividade determinada para o extrato etanólico foi em média 3 vezes maior que o extrato hexânico (Tabela 2).

O outro método utilizado foi o do DPPH, que é baseado em uma medida da capacidade de captura de antioxidantes para um radical estável, o DPPH, que mostra uma absorção a 515 nm e é reduzido para o correspondente hidrazina quando reage com doadores de hidrogênio, num período de tempo relativamente curto em comparação com outros métodos (NUENGCHAMNONG *et al.*, 2011; RUFINO *et al.*, 2010). Assim como para a atividade antioxidante determinada pelo método ABTS, observou-se maior atividade antioxidante para EE, quando comparado com EH. Portanto, a maior capacidade antioxidante foi observada para o extrato etanólico de folhas de gravioleira nos dois métodos. Esse resultado está de acordo com os BASKAR *et al.* (2007) que observaram no extrato etanólico de folhas de *Annona muricata* um forte potencial antioxidante ao realizarem diferentes testes *in vitro*. Também corroboram com Oliveira (2011) que trabalhou com os mesmos extratos de folhas de gravioleira e evidenciou que EE apresentava índice de varredura pelo método DPPH

duas vezes superior ao apresentado por EH. Esse autor sugeriu ainda que a maior capacidade antioxidante de EE poderia estar relacionada às quantidades mais elevadas de metabólitos secundários. No presente trabalho, EE também apresentou maior riqueza em compostos fitoquímicos, principalmente antocianinas, flavonoides amarelos e polifenóis totais. Vale salientar que Oliveira (2011) não utilizou metodologias para determinar tais compostos. Importante considerar que os metabólitos estudados representam apenas uma parcela de muitos outros existentes e que a solubilidade é um fator determinante para o acesso aos sítios de geração e/ou de propagação dos radicais livres. Oliveira (2011) destacou a importância da polaridade dos diferentes extratos estar relacionada à maior ou menor capacidade dos fitoquímicos em atingir os sítios gerados das espécies radicalares.

Podem ser citados ainda, trabalhos com outros extratos e determinação da atividade antioxidante por métodos diferentes, em que há confirmação da capacidade antioxidante pelos diferentes métodos. BASKAR e colaboradores (2007) compararam extratos etanólicos de várias espécies da família *Annonaceae* e observaram que *Annona muricata* apresentou o maior potencial antioxidante, determinado tanto pelo método ABTS, quanto pelo DPPH, sugerindo que o extrato inibe ou mesmo captura os radicais. NAWAR e colaboradores (2012), por sua vez, ao analisarem o extrato etanólico aquoso de folhas de *Annona muricata* determinaram sua atividade antioxidante por meio do método ORAC. Os autores sugeriram que a capacidade antioxidante do extrato pode ser devida à presença de flavonoides no mesmo. Além destes, Mariod e colaboradores (2012) determinaram a atividade antioxidante do extrato metanólico de folhas de *Annona squamosa* comparando os métodos DPPH e ORAC. Neste trabalho foi observado o alto potencial antioxidante da planta, em virtude da presença de compostos fenólicos encontrados. Há uma tendência a obter-se perfil de atividade antioxidante semelhante quando comparados dois ou mais métodos e considerando a diferença quantitativa existente entre eles.

Após estudar a composição fitoquímica e atividade antioxidante dos EE e EH de folhas de gravioleira e com objetivo de utilizar esses extratos em *in vivo*, partiu-se para análise microbiológica. Os ensaios de análise para verificado contaminação dos extratos por bactérias e fungos foram realizados e não foi evidenciado nenhum crescimento de fungos ou bactérias (Tabela 4). Não houve necessidade de um estudo para investigar a toxicidade dos extratos, pois Oliveira (2011) realizou ensaios de toxicidade subcrônica de acordo com a ANVISA através da RE nº 90, de 16 de março de 2004 e não evidenciou nenhum efeito tóxico

de EE e EH de folhas de *Annona muricata* L. administrados por via oral durante 30 dias consecutivos. Vale ressaltar que as concentrações utilizadas por esse autor foram as mesmas usadas no presente estudo (10, 100 e 1000 mg/Kg). No entanto, não havia sido testada anteriormente possível contaminação microbiológica dos extratos. Os extratos mostraram-se seguros para aplicação *in vivo*.

Para avaliar o efeito anti-inflamatório dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Annona muricata*, trabalhou-se com o modelo de edema de orelha em camundongos induzido por xileno ou TPA. A indução química da inflamação, em modelos animais é feita por meio da administração de agente exógeno. A indução de edema de orelha por diferentes agentes irritantes permite avaliar o potencial anti-inflamatório por diferentes vias de administração, como também é largamente utilizada para identificar o provável efeito anti-inflamatório da substância em estudo e para propor um possível mecanismo de ação (YOUNG *et al.*, 1989; GÁBOR, 2000). Isso é possível porque os agentes possuem mecanismos diferentes de indução da inflamação. Por exemplo, o xileno é um agente flogístico responsável por promover inflamação neurogênica, sendo um modelo inflamatório tópico simples para avaliar a permeabilidade vascular, causando irritação instantânea na orelha do camundongo, o que leva ao acúmulo de fluido e edema característico da resposta inflamatória aguda (LUO *et al.*, 2008; TIAN *et al.*, 2011). Esse tipo de inflamação é induzida por mecanismos moleculares e celulares envolvidos na regulação da liberação de substâncias pró-inflamatórias de neurônios sensoriais (ROTELI, 2003). Já o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato ou TPA é um constituinte ativo do óleo de cróton que induz inflamação tópica e resposta hiperproliferativa em animais de maneira similar ao que ocorre em muitas doenças de pele, como no caso da psoríase (GÁBOR, 2000). No modelo de inflamação induzida por TPA, entre os mediadores inflamatórios importantes estão os eicosanoides, como a prostaglandina E2 (PGE2) e os leucotrienos. O TPA é capaz de ativar a proteína cinase C (PKC), que por sua vez, ativa outras cascatas enzimáticas, como as das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA2), levando à liberação dos PAFs e ácido araquidônico (AA) (SARAIVA *et al.*, 2010). Tanto inibidores de ciclooxigenase (COX) como de 5-lipoxigenase (LOX), e também antagonistas de LTB<sub>4</sub> inibem o edema causado pelo TPA (BOLLER *et al.*, 2010; SIMPSON *et al.*, 2010).

Quando administrados por via i.g. durante sete dias consecutivos antes da indução da inflamação, EE e EH só foram capazes de inibir a inflamação induzida por xileno. Não houve

diferença significativa na atividade anti-inflamatória entre os diferentes extratos administrados por via i.g. e nem diferença entre as diferentes doses administradas (EE ou EH, nas doses 10, 100 ou 1000 mg/Kg). A atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de folhas de *Annona muricata* (doses 10, 30, 100 e 300 mg/Kg) também foi verificada por Foong e Hamid (2012) em modelo de edema de orelha. Esses autores encontraram percentuais de inibição que variaram de 17,52 a 72,41% e de forma dose dependente. Comparado a esse resultado EE10 no presente estudo apresentou percentual de inibição de 61,72%, valor 3,5 vezes superior ao determinado por Foong e Hamid (2012). Vale salientar que esses autores induziram a inflamação com 30 µL de xileno, volume menor que o utilizado no presente estudo (50 µL). O efeito anti-inflamatório do extrato etanólico de folhas de gravioleira foi também evidenciado em outros modelos de inflamação, como o do edema de pata. SOUSA *et al.* (2010), ao estudarem o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas de gravioleira, observaram que o extrato administrado por via oral foi capaz de inibir o edema de pata induzido por carragenana em ratos.

Quando os extratos foram utilizados para tratamento por via tópica imediatamente após indução da inflamação, EE e EH foram capazes de inibir significativamente a inflamação induzida por xileno ou TPA. Houve diferença nos resultados em relação aos extratos (EE ou EH), dose (10, 100 ou 1000 mg/Kg) e agentes flogísticos (xileno ou TPA). Em relação à inflamação induzida por xileno, EE foi efetivo em reduzir em média 64,97% (variando de 63,20% para EE10 e 67,95% para EE1000), sem diferença significativa entre as doses, quando aplicado por via tópica. Já EH foi efetivo em reduzir em média 67% (variando de 52,64% para EH10 e 78,89% para EH1000), com um perfil dose dependente, mas sem diferença significativa entre as maiores doses, quando aplicado por via tópica. Em relação à inflamação induzida por TPA, as menores doses dos extratos EE10 e EH10, com aplicação por via tópica, foram mais efetivas em inibir a ação do TPA com percentuais de inibição de 75% para EE10 e 84,39% para EH10.

Assim como no presente trabalho, extratos de diferentes espécies de plantas têm sido utilizados em modelos de inflamação tópica, tais como edema de orelha induzido por xileno e TPA, a fim de evidenciar de maneira rápida e efetiva a atividade anti-inflamatória dessas plantas. ZHOU *et al.* (2008) analisaram o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas de *Aquilaria sinensis*. Esses autores evidenciaram a capacidade anti-inflamatórias desse extrato em inibir edema de orelha induzido por xileno em camundongos, nas doses de 424 e

848 mg/kg e percentuais de inibição de 31,38 e 49,50%, respectivamente. HU *et al.* (2008) estudaram as atividades anti-inflamatórias do extrato etanólico de *Daphne retusa* e de frações desse extrato, quando administrados por via oral em diferentes doses. Esse autores observaram inibição significativa do edema induzido por xileno do extrato etanólico de *D. retusa* somente na maior dose (800 mg/kg) e diferentes porcentagens de inibição que variaram de acordo com as frações e doses administradas, indicando que devam existir vários compostos ou constituintes ativos nas frações.

Os extratos de folhas de gravioleira, EE e EH, podem conter agentes anti-inflamatórios capazes de inibir a via inflamatória do xileno, através de inibição da substância P ou antagonizando sua ação. Possivelmente os compostos fitoquímicos predominantes em EE e EH, como flavonoides amarelos, antocianinas e polifenóis, possam explicar parcialmente o efeito anti-inflamatório dos mesmos. No entanto, mais experimentos devem ser conduzidos a fim de determinar quais compostos poderiam estar implicados nessa ação.

Os resultados da capacidade dos extratos de gravioleira, EE e EH, em inibir a inflamação induzida por TPA corroboram com vários trabalhos que demonstraram os efeitos anti-inflamatórios de extratos ou compostos isolados de plantas. XIAN *et al.* (2012) evidenciaram a atividade anti-inflamatória de extrato aquoso de *Rhizoma polygonati* contra inflamação aguda induzida por TPA. Esses autores sugeriram que esse extrato é um potente agente anti-inflamatório tópico e relacionaram sua atividade anti-inflamatória com a presença de beberine (alcaloide conhecido por sua capacidade anti-inflamatória), além de sugerir que o efeito anti-inflamatório do extrato estar associado a uma regulação negativa da expressão de RNA da iNO sintase, COX-2, TNF-alfa, IL-1 e IL-6.

PASSOS *et al.* (2013) verificaram o efeito anti-inflamatório de um triterpeno isolado de *Euphorbia tirucalli* em edema de orelha induzido por TPA. Trabalhando com vários métodos, esses autores demonstraram que a administração tópica de um triterpeno tetracíclico reduziu significativamente a inflamação cutânea induzida pelo TPA em camundongos, sugerindo como mecanismo de ação a capacidade de prevenir a infiltração leucocitária, regulação de COX-2 e quimiocinas.

Medeiros *et al.* (2007) trabalharam com um triterpeno pentacíclico,  $\alpha$ -amirina, isolado de *Protium kleinii* e evidenciaram atividade anti-inflamatória contra inflamação tópica induzida por TPA. A aplicação tópica desse triterpeno nas doses de 0,1 a 1 mg/orelha inibiu

de maneira dose dependente o edema induzido por TPA, foi capaz de alterar a atividade da COX-2 *in vitro* e portanto o mecanismo de ação deve estar relacionado com a redução dos níveis de prostaglandinas (PGE-2) via inibição da COX-2.

EE e EH apresentam agentes anti-inflamatórios capazes de inibir a via inflamatória do TPA, provavelmente relacionado à riqueza em flavonoides amarelos, antocianinas e polifenóis. Aquila *et al.* (2009) evidenciaram as propriedades farmacológicas de frações ricas em flavonoides do extrato butanólico de *Cayaponia tayuya*. Esses flavonoides apresentaram capacidade de inibir o edema de orelha induzido por TPA, tanto em modelo de inflamação aguda (percentual de inibição de 66%) como crônica (percentual de inibição de 37%). Os autores sugeriram que os flavonoides foram capazes de inibir a inflamação, inibindo a COX-2. Tem sido sugerido que a atividade anti-inflamatória de diferentes flavonoides está associada à capacidade dos mesmos em inibir o metabolismo do ácido araquidônico (HAVSTEEN, 2002; AQUILA *et al.*, 2009).

A fim de determinar a atividade antibacteriana dos extratos de folha de gravioleira, realizou ensaio de disco-difusão em Agar e verificou-se ausência de atividade antibacteriana para EE e EH frente às cepas testadas. Os resultados mostraram que EE e EH não foram capazes de inibir o crescimento das cepas Gram + testadas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e nem das Gram – (*Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*). Apesar de esses extratos apresentarem compostos relacionados à atividade antimicrobiana, tais como flavonoides, estes não se mostraram eficientes frente às cepas de micro-organismos Gram + e Gram -. Os flavonoides são compostos sintetizados pela maioria das plantas e são conhecidos por exibirem uma grande quantidade de propriedades farmacológicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, dentre outras (CUSHNIE e LAMB, 2005; MOSQUERA *et al.*, 2011; ROTELLI, 2003; SHIRWAIKAR *et al.*, 2004). No entanto, essa ausência de atividade antibacteriana foi evidenciada também por Silva, Antunes e Catão (2011), trabalhando com extratos hidroalcoólico e aquoso de cascas, folhas e fruto de *Annona muricata*. Esses autores sugerem que a inatividade dos extratos testados pode estar relacionada a alguns fatores como dificuldade de difusão no meio de cultura, quando impregnados nos discos de papel filtro. Contrariamente, há autores que encontraram atividade antibacteriana de extratos de *A. muricata* para diferentes cepas bacterianas (PATHAK *et al.*, 2010, VIEIRA *et al.*, 2010). Segundo Martins *et al.* (2010), essa divergência entre os resultados de atividade antibacteriana para extratos de mesma espécie de plantas pode ocorrer devido a vários fatores como diferentes condições experimentais, tais como solvente utilizado

para extração, a temperatura e tempo de incubação e micro-organismos testados. Vale ressaltar que as técnicas e modificações empregadas nos métodos de avaliação da atividade antimicrobiana por diferentes autores podem ser fatores determinantes nestas variações de resultados (SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011).

Há uma grande dificuldade em relacionar dados de estudos com plantas medicinais, até mesmo de uma mesma espécie, pois a constituição química das espécies vegetais pode ser influenciada qualitativamente e quantitativamente por variações climáticas e localização geográfica (AURICCHIO; BACCHI, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2008). Podem ser ainda citados como fatores associados às divergências dos resultados, os estágios de desenvolvimento do vegetal no momento da coleta, a parte da planta estudada, a forma de preparar o material, bem como a diferença nos protocolos seguidos nos experimentos também podem repercutir diretamente sobre sua atividade biológica (NASCIMENTO *et al.*, 2008; SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011). Alguns desses fatores podem ter contribuído para os resultados encontrados neste estudo.

Esse estudo confirma o uso etnomedicinal da *Annona muricata* e sugere um potencial terapêutico dos extratos hexânico e etanólico de folhas pela evidência das atividades antioxidante e anti-inflamatória. O efeito anti-inflamatório depende da via de administração e apresenta possivelmente mecanismos diferentes associados, por via oral é capaz de inibir a inflamação tópica por xileno, provavelmente inibindo liberação de substância P; enquanto por via tópica, no caso da inflamação por TPA, os extratos devem ser capazes de inibir a COX-2. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos desses extratos relacionados com seu efeito anti-inflamatório.

## 8. CONCLUSÕES

---

Os extratos hexânico e etanólico das folhas de gravioleira apresentam elevada capacidade antioxidante, sendo o extrato hexânico rico em esteroides e o etanólico em taninos condensados, esteroides, flavonóis, flavonas, flavanonas, xantonas e flavonoides. Ambos, também apresentaram antocianinas, flavonoides amarelos e polifenóis totais. No entanto, o extrato etanólico das folhas de gravioleira apresentou maior capacidade antioxidante, relacionada a uma maior diversidade e concentração de compostos fitoquímicos. Os extratos hexânico e etanólico quando administrados por via oral só foram capazes de inibir a inflamação induzida pelo xileno. Já por via tópica, os extratos inibiram tanto a inflamação induzida por xileno, quanto TPA, mesmos na menor dose. Nenhum dos extratos apresentou atividade antibacteriana frente às cepas testadas.



## REFERÊNCIAS

- ACTOR, J. K. **Imunologia e Microbiologia**. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 2007.
- ADEWOLE , S.O.; OJEWOLE, A.O. Protective effects of *Annona muricata L. (Annonaceae)* leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin treated diabetic rats **African Journal of Traditional, complementary and alternative medicines** **6 (1)**: 30 – 41, (2009).
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **17**: 114-140, 2007.
- ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v.12, p. 225-234, 2006.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E. F. A.; JÚNIOR, A.S.; ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 95(3): 367-373, 2000.
- AKINDELE, A.J.; ADEYEME, O.O. Antiinflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. **Fitoterapia**, v.78, p.25-28, 2007.
- ALU'DATT, M.H.; ALLI, I.; EREIFEJ, K.; ALHAMAD, M.; RAHMAN, A., AL-TAWAHA, A.R.;RABABAH,T. Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. **Food Chemistry**,123; 117–122 (2010).
- AQUILA, S.; GINER, R.M.; RECIO, M.C.; SPEGAZZINI, E.D.; RÍOS, J.L. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, p.333-337, 2009.
- ARABSHAHI-D, S.; DEVI, V.; UR, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. **Food Chemistry**, 100; 1100–1105 (2007).
- ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69 (1), p. 4-9, 2003.
- BADRIE, N, SCHAUSS, A. Soursop (*Annona muricata L.*) Composition, nutritional values, medicinal uses and toxicology. **Bioactive Foods in Promoting Health**: 621-643.(2010).
- BAGUL, M.S.; SRINIVASA, H.; ANAKI, N.S.; RAJANI, M. Antiinflammatory activity of two Ayurvedic formulations containig guggul. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 37, 399-400, 2005.
- BARRECA D, LAGANÀ G, FICARRA S, TELLONE, E.; LEUZZI, U.; GALTIERI, A.; BELLOCCO, E. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective proprieties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). **Food Research International**. 44(7): 2302-10. 2011.

BASSO, L.A.; DA SILVA, L.H.; FETT-NETO, A.G.; DE AZEVEDO JR., W.F.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; ASTOLFI FILHO, S.; DOS SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.; SANTOS, D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases .A Review. **Memory Institut Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 475-506, 2005.

BASTOS, G. M. **Uso de preparações caseiras de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas**. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Farmácia Clínica)–Faculdade de Farmácia, Ondotologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

BATLOUNI M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascularrenal effects. **Arq. Bras. Cardiol.** Apr. 94(4). 2010.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep.* 22, 269-303, 2005.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS. V.; BERSET C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Academic Press Limited**, v.30, p. 609-615, 1997.

BOUHLEL, M. A., GBAGUIDI, G.C., STAEL, B. Glitazones in the treatment of cardiovascular risk factors. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 21 (Suppl. 2), 7–13 2007.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF,L.;SLIMANI, S.; MADANI, K. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria **Industrial Crops and Products** 41, 85– 89 (2013).

BRALLEY, E.E.; HARGROVE, J.L.; GREENSPAN, P.; HARTLE, D.K. Topical anti-inflammatory activities of *Vitis rotundifolia* (muscadine grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 636-642, 2007.

BRALLEY, E.E., GREENSPAN, P. HARGROVE, J. L., WICKER, L., HARTLE, D. K. Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation. **Journal of Inflammation**, 5:1 doi: 10.1186/1476-9255-5-1, 2008.

BRITO, H.O., NORONHA, E.P., FRANÇA, L.M., BRITO, L.M.O., PRADO, M.S. Phytochemical analysis composition from *Annona squamosa* (ATA) ethanolic extract leaves **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 89(3): 180-184, 2008.

BROWN, J., LAURENTÍN H., DÁVILA M. Genetic relationships between nine *Annona muricata* L. accessions using RAPD markers. **Fruits**, 58, pp 255-259, 2003.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R. Antiinflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **PlantaMedica**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. **Journal of Ethnopharmacology**, 100, 131–134 (2005).

CARBALLO, A. I., MARTINEZ, A.L., TRUJANO, E.G., PELLICER, F., MARTINEZ, R.V., REVAL, M.I.D., MUÑOZ, F.J.L. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 95 ,6–12, (2010).

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M. A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 131, 326–342, (2010).

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, NS. M.S.A.Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, Ano. V, n. 11, Jun. 2007.

CERQUEIRA, F.; MEDEIROS, M.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

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

CHATROU, L.W., RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae. **Flowering plants of the Neotropics** (ed. by N.Smith, S.A.Mori, A.Henderson, D.W.Stevenson and S.V.Heald), pp. 18–20. Princeton, Englewood Cliffs, NJ, USA. (2004).

CHATROU, L.W.; PIRIE, M.D.; ERKENS, R.H.J.; COUVREUR, T. L.P.; KURT M. NEUBIG, J. RICHARD ABBOTT, JOHAN B. MOLS, JAN W. MAAS, RICHARD M. K. SAUNDERS.; MARK W. CHASE. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 169, 5–40. 2012.

CHEN, Y., XU, S., CHEN, J., WANG, Y., XU, H., FAN, N., LI, X. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. **Journal of Ethnopharmacology**. Jul 13;142 (2):462-6. 2012.

COUTINHO, M.A.S., MUZITANO, M.F., COSTA, S.S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v.3, p. 2009.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P. Aspectos celulares emoleculares da inflamação. **Sinopse**, v. 10, n. 3, p. 66-81, 2008.

D'ARCHIVIO, M., FILESI, C., DI BENEDETTO, R., GARGIULO, R., GIOVANNI, C., MASELA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità** Vol. 43, No. 4: 348-361. 2007. |

DE BOSSCHER, K.; BECK, I. M.; HAEGEMAN, G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: Survival of the fittest regulator of the immune system? **Brain, Behavior, and Immunity**, San Diego, v. 24, n. 7, p. 1035-1042, 2010.

DE SOUSA, O.V.; VIEIRA, G.D.-V.; DE PINHO, J.D.J.R.; YAMAMOTO, C.H.; ALVES, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. **International Journal of Molecular Science**. v.1, 2067–2078, 2010.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLORON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, Basel, v. 26, n. 3-4, p. 335-341, mar. 1989.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H. Medicinal plants popularly used in Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R.C.R.;POHLMAN, A.R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, Vol. 31, No. 8, 1966-1972, 2008.

DORNAS, W. C., OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G. ; SANTOS, A.F. ; NAGEM, T.J., Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. Araraquara, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

DOS SANTOS, A.F. AND SANT'ANA, A.E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**. 8:115-120; 2001.

DOS SANTOS, E.B.; SLUSARZ,P.A.A.; JUNIOR, V.A.K.; JOÃO PAULO SCHWARTZ,J.P. Antimicrobial effectiveness of natural products against microorganisms related to bacterial endocarditis. **Publicatio: UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, 13 (3/4): 67-72, set./dez. 2007.

DOWNES, F.P., ITO, K. (Eds.), 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th edition. American Public Health Association, Washington, p. 676. DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 125-131, 1995.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a História dos produtos naturais. **Multiciência**. V.7. p.16. 2006.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, L.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Revista Eletrônica Multiciência**, v7, p 32, 2006.

FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS,P. (ed) Anthocyanins as food colors. **New York: Academic Press**, p. 181-207, 1982.

FRANCISCHETTI, I., MORENO, J. B., SCHOLZ, YOSHIDA, W. B. Os leucócitos ea resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**; 25(4): 575-584. 2010.

FREINKEL, R.K.; WOODLEY, D. T.The Biology of the Skin.Lancaster: **Parthenon**, 2001.

FU, L., XU, B., XU, X., GAN, R., ZHANG, Y., XIA, E., LI, H. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry** 129 345–350(2011).

FFUP, 2006. **Dexametasona**. Disponível em:  
< <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0607/dexametasona/toxicidade.html>>.  
Acesso em: 02 janeiro de 2013.

GÁBOR, M. Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications. **Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.**

GLASL H 1983. Zur photometrie in der drogenstandardisierung -3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung** 123: 1979-1987.

GRELLNER, W. Time-dependent imunohistochemical detection of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF) in human skin wounds. **Forens Sci. Int.**, v. 130, n. 2-3, p. 90-96, 2002.

GOUTHAMCHANDRA, K., MAHMOOD, R., MANJUNATHA, H. Free radical scavenging, antioxidant enzymes and wound healing activities of leaves extracts from *Clerodendrum infortunatum* L. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 30 11–18(2010).

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonóides: Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. II. **Farmaco**, v.56, p. 683–687, 2001.

HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992 **Phytochemistry** 55 481±504, (2000).

HASSIMOTO, N.M.A., GENOVESE, M.I., LAJOLO, F.M. Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. **Journal of Food Composition and Analysis** 22 394–396, (2009).

HAYES, J.E., ALLEN, P., BRUNTON, N., O'GRADY, M.N., KERRY, J.P. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry** 126 948–955, (2011).

HERBARIUM SAÚDE. **A Fitoterapia na história**, Curitiba, ano v, n 22, 6p. 2002.

HERNÁNDEZ, I. *et al.* Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from *Heliopsis longipes* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.649-52, 2009.

HILÁRIO, M.O.E., TERRERI, M.T., LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v.82, n.5, 2006.

HIMESH, S.; SARVESH, S.; SHARAN, P. S.; MISHRA, K.; SINGHAI, A.K. Preliminary phytochemical screening and HPLC analysis of flavonoid from methanolic extract of leaves of *Annona squamosa*. **International Research Journal of pharmacy**. 242-246, 2011.

HU, X.; JIN, H.; XUA, W.; ZHANG, W.; LIU, X.; YAN, S.; CHEN, M.; LI, J.; ZHANG, W. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Daphne retusa* Hemsl. **Journal of Ethnopharmacology** 120, 118–122, 2008.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.19, n.1, p.97-108, 2008.

IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. Fruticultura, 2009. Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/imprensa/0901\\_FrutasBrasileirasAscensao.asp](http://www.ibraf.org.br/imprensa/0901_FrutasBrasileirasAscensao.asp)> Acesso em: 06/07/2011.

IBRAHIMA, B.; SOWEMINO, A.; VAN ROOYENB, A.; VAN VENTERB, MARYNA. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrate* (Linn.) Blume (Amaranthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**.

IDU, M., OMONIGHO, S.E. and IGELEKE, C.L. Preliminary investigation on the phytochemistry and antimicrobial activity of *Senna alata* L. flower. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 10: 806-809. 2007.

JAVANMARDI *et al.* Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry** 83, 547–550, 2003.

JUBETE, L.A., WIJNGAARD, H., ARENDT, E.K., GALLAGHER, E. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. **Food Chemistry**.v.119, 770–778, 2010.

KÄHKÖNEN MP, HEINONEM M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51(3):628-33. 2003.

KAPLAN, M.; MUTLU, E.A.; BENSON, M.; FIELDS, J.; BANAN, A.; KESHAVARZIAN, A. Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 15, n. 3, p. 207-216, 2007.

KIL, H.Y.; EUN SOO SEONG, E.S.; GHIMIRE, B.K.; ILL-MIN CHUNG, I.; SOON SUNG KWON, S.S.; GOH, E.J.; KWEON HEO, K.; MYONG JO KIM, M.J.; JUNG DAE LIM, J.D.; LEE, D.; YU, C.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract **Food Chemistry** 115 1234–1239, 2009.

KIM, D. O., LEE, K. W., LEE, H. J., & LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713–3717, 2002.

KIM, H. P.; SON, H.S.; CHANG, H. W. C.; KANG, S. S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms **J Pharmacol Sci** 96, 229 – 245 (2004)

KOU, J., SUN, Y., Lin, Y., CHENG, Z., ZHENG, W., YU, B., XU, Q.,. Anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Radix Ophiopogon japonicas* and its two constituents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 28, 1234–1238. 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**.

Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p.1390-1393, 1997.

LEY, K. Integration of inflammatory signals by rooling neutrophils. **Immunol Rev**, v. 186, p. 8-18, 2002.

LIAW, C.C.; CHANG, F.R.; LIN, C. Y. et al. Cytotoxic. Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona Muricata*. **Journal of. Natural. Products.**, 65, 470-475, 2002.

LIMA, M. A. C. D. ALVES, RICARDO ELESBÃO; FILGUEIRAS, HELOÍSA ALMEIDA CUNHA; ENÉAS-FILHO, J. Comportamento respiratório e qualidade pós-colheita de graviola (*Annona muricata L.*) “morada” sob temperatura ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 49-52, abr 2003.

LIMA, M. A. C. D. ALVES, RICARDO ELESBÃO; FILGUEIRAS, HELOÍSA ALMEIDA CUNHA. Mudanças relacionadas ao amaciamento da graviola durante a maturação póscolheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1707-1713, dez 2006.

LIMA, L., A.R.S., PIMENTA, L.P.S., BOAVENTURA, M.A.D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry** 122 1129–1138, 2010.

LIU, Q., YAO, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food Chemistry** 102 732–737, 2007.

LIN, L., DONG, Y., ZHAO, H., WEN, L., YANG, B., ZHAO, M. Comparative evaluation of rosmarinic acid, methyl rosmarinate and pedaltin isolated from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA as inhibitors of tyrosinase and  $\alpha$ -glucosidase **Food Chemistry** 129 884–889, 2011.

LOIZZO, M.R., TUNDIS, R., BONESI, M., MENICHINI, F., MASTELLONE, V., AVALLONE, L. AND MENICHINI, F. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (Cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents, **Journal of Food Composition and Analysis**, 25,179-184, 2012.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil, Nativas e Exóticas. **Instituto Plantarum de estudos da flora Ltda. Nova Odessa-SP**, 502p. 2002.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 5 ed. Editora Nova Odessa. São Paulo: **Instituto Plantarum**, 2008.

LUNA, J. S.; BIEBER, L.W.; SANT’ANA, A.E.G. Estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas da *Annona muricata* guiado por bioensaios. **XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Anais do Congresso**, p.26, 2003.

LUNA, J.S.; DE CARVALHO, J.M.; DE LIMA, M.R.; BENTO EDE, S.; FRANCK, X.; SANT’ANA, A.E.G. Acetogenins in *Annona muricata L.* (Annonaceae) leaves are potent molluscicides. **Nat. Prod. Reserach**, v.20, p.253-257, 2006.

- LUO, P. et al. Anti-inflammatory activity of the extracts and fractions from *Erigeron multiradiatus* through bioassayguided procedures. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.232-7, 2008.
- MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences 4 (S):** 839-843, 2008.
- MAK, Y. W.; CHUAH, L.O.; AHMAD, R.; BHAT, R. Antioxidant and antibacterial activities of hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and Cassia (*Senna bicapsularis* L.) flower extracts. **Journal of King Saud University – Science** (2012)
- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition** 79:727–47. 2004.
- MANICA, I. Taxonomia, morfologia e anatomia. In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H. Anonáceas: produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB, p. 20-35. 1997.
- MANICA, I.; ICUMA, I. M.; JUNQUEIRA, K. P.; OLIVEIRA, M. A. S.; CUNHA, M. M.; OLIVEIRA JR., M. E.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ALVES, R. T. Frutas Anonáceas (ata ou pinha, atemólia, cherimólia e graviola). Tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 596 p. 2003.
- MARIOD, A. A.; ABDELWAHAB, S. I.; ELKHEIR, S.; AHMED, Y. M., FAUZI, P. N. M.; CHUEN, C. S. Antioxidant activity of different parts from *Annona squamosa*, and *Catunaregam nilotica* methanolic extract. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria.**, 11(3) 249-257, 2012.
- MASSAROTTI, E.M. Clinical and patient-reported outcomes in clinical trials of abatacept in the treatment of rheumatoid arthritis. **Clinical Therapeutics** 30, 429–442. 2008
- MATIAS, E.E.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenacea* DC. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 6, p. 1049-1052, 2010.
- MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais:** guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3.ed. Fortaleza: **Imprensa Universitária**, 394p, 2007.
- MATOS, F.J.A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3 ed. **Fortaleza: UFC**, 2009.
- MAUL, A.A.; COUTINHO, C.B.M.; BRAZZACH, M.L.; SILVA, C.M. Extração super crítica das sementes de graviola. **XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, UFPE, Recife, Anais do Congresso, p.174, 2000.
- McGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.559-574, 2008.



McGEER, P.L., McGEER, E.G. Glial reactions in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 23, 474–483. 2008.

MELO, E. A., MACIEL, M.I.S., DE LIMA, V.L.A.G., DO NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 44, n. 2, abr./jun., 2008.

MENDES, L.P.M.; MACIEL, K.M.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; SILVA, R.M.F.; ROLIM NETO, P.J. BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.M.S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa* **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 32(1):121-125, 2011.

MENDONÇA, V. RAMOS, J. ARAÚJO NETO, S. *et al.* Substratos e quebra de dormência da semente na formação do porta-enxerto de gravioleira Cv. RBR. **Revista Ceres (Brasil)**. v.49, n. 286, p. 657–668, 2002.

MESQUITA, M.L.; PAULA, J.E.; PESSOA, A. C. *et al.* Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against câncer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**., v.123, p. 439-445, 2009.

MICHELETTI, S. M. F. B. AGRA, A. G. S. D. M. BARBOSA, G. V. S.; GOMES, F. L. Controle de *Cerconota anonella* (SEPP.) (LEP.: *OEOPHORIDAE*) e de *Bephratelloides pomorum* (FAB.) (HYM.: *EURYTOMIDAE*) em frutos de graviola (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 722-725, dez 2001.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MIYAKE, M. A.; CANIELLO, M.; BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. – Inquérito sobre uso de plantas medicinais para tratamento de afecções otorrinolaringológicas entre pacientes de um hospital público terciário. São Paulo, **Caderno de Debates da RBORL**, 70: 43-55, 2004.

MOLS, J. B.; GRAVENDEEL, B.; CHATROU, L.W.; PIRIE, M. D.; BYGRAVE, P. C.; CHASE, M. W.; KLEBER, P. J. A. Identifying glades in Asia Annonaceae: Monophyletic Miliusea. **American Journal of Botany**. 91(4), 590-600. 2004.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n.2, 2008.

MORTIMER, K. J.; TATTERSFIELD, A. E. Benefit versus risk for oral, inhaled, and nasal glucocorticosteroids. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 523-539, 2005.

MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C.E.B.; DANTAS, T.M. Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 106). ISSN 1677-1915, 28p, 2006.

- MOURE, A. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**.v. 72, n. 02, p.145-171, 2001.
- SILVA, E. M.; SOUZA, J.N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLA, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, 101(3), 1012–1018. (2007).
- MUKANDIWAA, L.; MCGAWA,N.L.J.; ELOFFA,J.N.; NAIDOOB,V. Extracts of four plant species used traditionally to treat myiasis influence pupation rate, pupal mass and adult blowfly emergence of *Lucilia cuprina* and *Chrysomya marginalis* (Diptera: Calliphoridae) **Journal of Ethnopharmacology** 143 812–818,2012.
- MULLER, W. A. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** V6, p.323-44, 2011.
- MURPHY, H.S.; WARD, P.A. Inflamação.In: RUBIN, E. et al.**Patologia: bases clinicopatológicas da medicina.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.43-85, 2006.
- NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA. G.L. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.
- NAWWAR M; AYOUB N; HUSSEIN S; HASHIM A; EL-SHARAWY, R.; WENDE, K.; HARMS, M.; LINDEQUIST, U. A flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. **Archives of Pharmacol. Research.** 35: 761-767. 2012.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1- 56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 58p. 2003.
- NISSEN, N.; EVANS, S. Exploring the practice and use of Western herbal medicine: Perspectives from the social science literature. **Journal of Herbal Medicine** 2 6 –5. 2012
- OBANDA, M.; OWUOR, P.O. Flavonol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kemyan black teas. **Journal Agricultural and Food Chemistry** v. 74, p. 209-215, 1997.
- OESTERHELT, H.B. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. **Nature Medicine**, v. 11, n. 10, p. 1082-1087, 2005.
- OJEWOLE, J. A. O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, **99**:13-19, (2005).
- OYEDEMI, S.O. and AFOLAYAN, A.J.. Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 952-958. (2011)

PAN, M.; CHING-SHU LAIA, C.; HO, C. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, v.1, 15–31 | 15, 2010.

PANDURANGAN A, KHOSA RL, HEMALATHA S. Evaluation of anti-inflammatory activity of the leaf extracts of solanum trilobatum Linn. *J Pharm Sci Res* 1(1):16-21. 2009.

PARIMI, U.; KOLLI, D. Antibacterial and free radical scavenging activity of *Michelia champaca* Linn. flower extracts. **Free Radicals and Antioxidants** v.2, 2012.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A.O. GUERREIRO, E.1998. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **Farmaco** 54 421–424. (1998).

PHILLIPSON, J.D., Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry** 56, 237-243. 2001.

PIMENTA, L.P. S., PINTO, G.B., TAKAHASHI, J.A., E SILVA, L.G.F., BOAVENTURA, M.A.D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test) **Phytomedicine** 10: 209–212, 2003.

PINTO, A.C.Q. Taxonomy and Botany. In: PINTO, A.C.Q.; CORDEIRO, M.C.R>; ANDRADE, S.R.M. et al. (Org). *Annona* Species. International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, UK, P. 3-27, 2005.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M. Flora paraibana: Annonaceas Juss. **Acta Bot. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 281-293, 2004.

RAFFIN, R.P. *et al.* Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrintestinal em Ratos. **Acta. Farm.Bonaerense** 22, v.2, p.163-172, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. Rang & Dale -**Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 829p. 2007.

RAO, B.G.; RAO, P.U.; RAO, E.S.; RAO, T.M.; PRANEETH, D.V.S.; RATES, S.M.K. Evaluation of in-vitro antibacterial activity and anti-inflammatory activity for different extracts of *Rauvolfia tetraphylla* L. root bark. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 818-821,(2012).

RATHEESH, M.; HELEN, A. 2007. Anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats. **African Journal of Biotechnology**., 6(10): 1209-1211.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**; 39:603-13, 2001.

REN, W., QIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. **Inc. Medical Research. Reviews**., v.23, n. 4, p. 519-543, 2003.

- RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai.**, Botucatu, v.9, n.2, p.67-70, 2007.
- RICHARDSON, J.D.;VASKO, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation.The **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.302, p.839-45, 2002.
- ROSSI, F. & ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma**. Ed. Atheneu. São Paulo, 2005.
- ROTELLI, A.E. *et al.* Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation.**Pharmacological Research**, v.48, p.601-6, 2003.
- RUBAN, P. and GAJALAKSHMI, K. In vitro antibacterial activity of Hibiscus rosa-sinensis flower extract against human pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** 399-403,(2012).
- SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. Department of Natural Products, National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER), Sector-67, SAS Nagar 160062, Punjab, India. 2008.
- SARAIVA, R.A., ARARUNA, M.K.A., OLIVEIRA, R.C., MENEZES, K.D.P., LEITE, G.O., KERNTOPF, M.R., COSTA, J.G.M., ROCHA, J.B.T., TOMÉ,A.R. CAMPOS, A.R., MENEZES, I.R.A. Topical anti-inflammatory effect of Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents **Journal of Ethnopharmacology** 136 504– 510, (2011).
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 35, n.4, p. 275-280, 2004.
- SCHOEPE, S., SCHÄCKE, H., MAY, E., ASADULLAH, K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. **Experimental Dermatology**, 15, 406–420. 2006.
- SHERWOOD ER, TOLIVER-KINSKY T: Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anesthesiol**, 18: 385-405. 2004.
- SHUKLA A. S., MEHTA A A., JOHNA J., MEHTA A P., VYASB S. P., SHUKLAC S.; Immunomodulatory activities of the ethanolic extract of Caesalpinia bonducella seeds; **Journal of Ethnopharmacology**; 125; 252–256; 2009.
- SIGNORELLO, M.G. ; SEGANTIN, A.; LEONCINI, G.The arachidonic acid effect on platelet nitric oxide level. **Biochimica et Biophysica acta**,v. 14, 2009.
- SIMÕES,C.M.O.;SCHENKEL,E.P.;GOSMANN,G.;MELLO,J.C.;MENTZ,L.A.;PETROVIC K,P.R.: Farmacognosia – da Planta ao Medicamento 5ª ed. **Editora da UFSC: Santa Catarina**, 2004.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition, **Pharmacol. Rev.** v. 56, p. 387-437, 2004.

SIMPSON, B., CLAUDE, D. SMITH, N., WANG, J. McKINNON., SEMPLE, S. Evaluation of the anti-inflammatory properties of *Dodonaea polyandra*, a Kaanjutraditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology** 132, 340–343. 2010.

SOUSA, C.M.D.M.; E SILVA, H.R.; VIEIRA-JR.; AYRES, G.M.M.C.; DA COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.DE M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

TAGLIAZUCCHI, D., VERZELLONI, E., BERTOLINI, D., CONTE, A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry** 120 599–606, (2010).

TAYLOR, L. Technical data report on graviola (TDRG) (*Annona muricata*). **Sage Press. Austin**, 10. 1-6. (2002).

TEKWU, E.M.; PIEME, A.C.; PENLAPBENG, V. Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. **Journal of Ethnopharmacology** 142; 265–273,(2012).

TIAN You-Qing., KOU Jun-Ping., LI Lin-Zhou. , YU Bo-Yang. Anti-inflammatory Effects of Aqueous Extract from *Radix Liriope muscari* and Its Major Active Fraction and Component. **Chinese Journal of Natural Medicines**. 9(3): 0222–0226, 2011.

TISCHNER, D., REICHARDT, H. M. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.275, p.62-70, 2007.

TORRES, M.P.; RACHAGANI, S.; VINEE PUROHIT, V.; POOMY PANDEY, P.; JOSHI, S.; MOORE, E.D.; JOHANSSON, S.L.; SINGH, P.K.; APAR K. GANTI , A.K.; BATRA, S.K. 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** 323; 29–40(2012).

VALKO, M., RHOBES, C.J., MONCOL, J., MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions** 160 1–40. (2006).

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, JAN; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochemistry and. Cellular Biology**.39, 44-84. 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants; safe cure? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, set. 2005.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 52, n. 3, p. 349-374, 2000.

WANG, L.G.; MIN, B.S.; LI, Y.; NAKAMURA, N.; GIN, G. W.; LI, C. J.; HATTORI, M. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.10, n.3, p.561-5, 2002.

WOLFE, K., WU, X., LIU, R.H. Antioxidant Activity of Apple Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 609-614. 2003.

WU, L., LU, Y., ZHENG, Q., TAN, N., LI, C., ZHOU, J. Study on the spatial structure of anomuricatin A, acyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. **Journal of Molecular Structure** 827 145–148(2007).

YEPEZ B., ESPINOSA M., LÓPEZ S. & BOLARMOS G. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. **Fluid Phase Equilibria**. 194: 879; 2002.

YUAN, G.; WAHLQVIST, M.; HE, G.; YANG, M. LI, DUO. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pacific Journal of Clinic Nutrition** 15 (2): 143-152, 2006.

ZEGARSKA, B.; LELINSKA, A.; TYRAKOWSKI, T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Pharmacological Reports**. 58(1):13-21, 2006.

ZHENG, Two new monoterpenoid glycosides from *Mentha spicata* L. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.5, 2003.

ZHOU, M.; WANG, H.; KOU, J.; YU, B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. Leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology** 117 345–350 (2008).