



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**BÁRBARA REGINA DA COSTA DE OLIVEIRA**

**EFEITO DOS EXTRATOS HEXÂNICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DA  
GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L.) SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE  
CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM OVALBUMINA**

**FORTALEZA-CEARÁ**

**2011**

BÁRBARA REGINA DA COSTA DE OLIVEIRA

**EFEITO DOS EXTRATOS HEXÂNICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DA  
GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L.) SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE  
CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM OVALBUMINA**

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

**2011**

BÁRBARA REGINA DA COSTA DE OLIVEIRA

**EFEITO DOS EXTRATOS HEXÂNICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DA  
GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L.) SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE  
CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM OVALBUMINA**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

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

---

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

Universidade Estadual do Ceará-UECE

*Aos meus Pais*

*Em memória*

## *AGRADECIMENTOS*

A Deus

A Prof<sup>a</sup> Dra. Dirce Fernandes de Melo pela confiança e paciência com que me orientou.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Erika Freitas Mota por ter me auxiliado neste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, pelas sugestões e ajudas dadas e por ter aceitado o convite para participar desta banca.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Claudia Marinho da Silva, por todo o apoio, força e incentivo, sempre disposta a ajudar e que sempre que precisei me ajudou sem exaltar, presente sempre quando não tinha tempo inclusive nos finais de semana.

A todos os colegas do Laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que me ajudaram na realização deste trabalho e que estiveram ao meu lado durante todo este período, em especial Neuza, Andresiane, Camila, Carol, Carine e Beatriz.

Ao biotério central da Universidade Federal do Ceará, por conceder os animais para os experimentos.

A FUNCAP e a CAPES pelo apoio financeiro

A minha tia Marily, que considero mãe e que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando em todos os momentos de dificuldades. Agradeço a você com todo meu respeito, admiração e amor.

A meu marido, Rômulo César pela confiança em mim depositada e por ter sempre procurado estar presente com seus cuidados, carinhos e incentivo. Agradeço a você com todo meu respeito, admiração e amor.

Aos meus sogros que são como pais para mim e estão sempre dispostos a me darem apoio, principalmente, nos momentos mais difíceis.

A todas as minhas amigas por entenderem minha ausência.

As demais pessoas que não foram aqui mencionadas, mas que contribuíram para a concretização deste trabalho.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil fitoquímico, o potencial antioxidante *in vitro*, o efeito toxicológico e a atividade imunomoduladora *in vivo* dos extratos etanólico e hexânico de folhas da gravioleira (*Annona muricata* L.). Para tanto, foram utilizadas folhas de *A. muricata* L. colhidas no mês de agosto de 2009, no município de Trairi, Ceará. A identificação botânica da folha foi realizada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará - UFC (*voucher* nº 49002). Para os testes *in vivo*, foram utilizados camundongos *Swiss* e ratos albinos *Wistar*, todos oriundos de colônias do Biotério Central/UFC. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animal da UFC (Nº 16/10). Os extratos etanólico (EE) e hexânico (EH) foram avaliados quanto a composição fitoquímica e suas atividades antioxidantes *in vitro*. O EE apresentou taninos, catequinas, saponinas e esteróides, enquanto o EH apresentou apenas esteróides. Quanto à capacidade antioxidante, o EE apresentou maior índice de varredura do radical DPPH que o EH. Para avaliação do efeito toxicológico, os EE e EH foram administrados por via oral em camundongos, diariamente nas concentrações de 10, 100 e 1000 mg kg<sup>-1</sup> durante 30 dias consecutivos e parâmetros clínicos e comportamentais foram observados. Os extratos não provocaram sintomas tóxicos, nem alteraram os parâmetros bioquímicos nem o peso relativo dos órgãos. Para o estudo da atividade imunomoduladora, os animais foram imunizados com ovalbumina (OVA; 10 µg; via s.c.) nos dias 0, 14 e 28 dias antes dos tratamentos com ou sem adjuvante de Freund e tratados ou não por via oral com Levamisol® (10 mg kg<sup>-1</sup>) e os EE e EH (10 e 100 mg kg<sup>-1</sup>) por 42 dias consecutivos. Os títulos de anticorpos totais e IgE específicos anti-OVA foram quantificados por ELISA e PCA respectivamente. EE e EH revelaram uma cinética de síntese de anticorpos anti-OVA distinta. EE e EH estimularam a produção de anticorpos totais anti-OVA, contudo não modularam a síntese de IgE anti-OVA. Neste sentido, os extratos da folha da gravioleira são imunoestimulantes e não induziram toxicidade.

Palavras-chave: Annonaceae, *Annona muricata* L., perfil fitoquímico, capacidade antioxidante, imunomodulação.

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the phytochemical profile, the antioxidant potential *in vitro*, the toxicological effect and immunomodulatory activity *in vivo* from ethanolic and hexane soursop (*Annona muricata* L.) leaves extracts. To this end, we used leaves of *A. muricata* L. harvested in August 2009 in the municipality from Trairi, Ceará. The botanical identification of the leaf was held in the Herbarium Prisco Bezerra of the Universidade Federal do Ceará - UFC (voucher number 49002). For *in vivo* tests were used *Swiss* mice and *Wistar* rats all from the Central Biotery of the Federal University of Ceara - UFC. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of UFC (No. 16/10). The ethanolic (EE) and hexane (HE) extracts were evaluated for their phytochemical composition and antioxidant activities *in vitro*. The EE presented tannins, catechins, saponins and steroids, while the HE presented only steroids. As for antioxidant capacity, the EE had greater index scan free radical DPPH than the HE. To evaluate the toxicological effect, the EE and HE were administered orally to mice, daily concentrations of 10, 100 and 1000 mg kg<sup>-1</sup> for 30 consecutive days and clinical and behavioral parameters were observed. The extracts did not cause toxic symptoms, nor altered the biochemical parameters and organ weights. To study the immunomodulatory activity, the animals were immunized with ovalbumin (OVA; 10 µg; route s.c.) on days 0, 14 and 28 days before the treatments with or without Freund's adjuvant and treated or not with oral levamisole (10 mg kg<sup>-1</sup>) and EE and HE (10 and 100 mg kg<sup>-1</sup>) for 42 consecutive days. The total antibody titers and specific IgE anti-OVA were quantified by ELISA and PCA respectively. EE and HE revealed different kinetics for antibodies anti-OVA synthesis. EE and HE stimulated the production of total antibodies anti-OVA, but didn't modulate the synthesis of anti-OVA IgE. In this sense, the soursop leaves extracts are immunostimulants and didn't induce toxicity.

Keywords: Annonaceae, *Annona muricata* L., phytochemistry profile, antioxidant capacity, immunomodulation.



## LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<b>Figura 1</b>	Ativação de células B: independente (A) e dependente (B) de células T 21
<b>Figura 2</b>	Curso da resposta imune adaptativa e suas fases: primária e secundária 22
<b>Figura 3</b>	Citocinas e seus efeitos 25
<b>Figura 4</b>	Esquema de atuação de citocinas da imunidade inata. 26
<b>Figura 5</b>	Esquema de atuação de citocinas da imunidade adquirida 27
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática das vias de diferenciação das células Th0 com destaque para as citocinas indutoras da diferenciação Th1, Th2, Th17 e Treg e as principais citocinas secretadas. 28
<b>Figura 7</b>	Folhas de <i>Annona muricata</i> L. 38
<b>Figura 8</b>	Fluxograma geral de obtenção dos extratos etanólico e hexânico de folhas de <i>Annona muricata</i> L. 43
<b>Figura 9</b>	Fluxograma geral do protocolo de imunomodulação 50
<b>Figura 10</b>	Desenho esquemático: coleta de sangue, imunização e reforços. 50
<b>Figura 11</b>	Peso relativo do timo(A), baço(B) e fígado(C) de camundongos <i>Swiss</i> tratados com extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Annona muricata</i> L. 56

- Figura 12** Avaliação macroscópica dos estômagos de camundongos Swiss tratados com os EE e EH das folhas de *Annona muricata* L. (A) Controle (Salina + DMSO 5%); (B) Tratamento com os EE nas concentrações 10 (B1), 100 (B2) e 1000 (B3) mg/Kg; (C) Tratamento com os EH nas concentrações 10 (C1), 100 (C2) e 1000 (C3) mg/Kg 57
- Figura 13** Atividade da ALT em soro de camundongos Swiss tratados ou não com os extratos etanólico (EE) e hexânico (EH) de folhas de *Annona muricata* L. nas doses 10, 100 e 1000 mg/kg. 58
- Figura 14** Atividade da AST em soro de camundongos Swiss tratados ou não com os extratos etanólico (EE) e hexânico (EH) de folhas de *Annona muricata* L. nas doses 10, 100 e 1000 mg/kg. 58
- Figura 15** (A) Cinética da síntese de anticorpos específicos anti-OVA, ao longo de 42 dias, após imunização apenas com OVA por via s.c. (B) Somente EE nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA comparados com os controles e (C) Somente EH nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA comparados com os controles. Cada ponto (média  $\pm$  desvio padrão) corresponde à absorvância obtida a partir dos soros diluídos 5000 vezes analisados pelo método de ELISA. 60
- Figura 16** (A) Cinética da síntese de anticorpos específicos anti-OVA, ao longo de 42 dias, após imunização com OVA com ou sem adjuvante por via s.c. (B) Somente EE nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA + Adj. comparados com os controles e (C) Somente EH nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA + Adj. comparados com os controles. Cada ponto (média  $\pm$  desvio padrão) corresponde à absorvância obtida a partir dos soros diluídos 5000 vezes analisados pelo método de ELISA. 62

- Figura 17** (A) Cinética da síntese de IgE sérica anti-OVA em animais imunizados apenas com OVA por via s.c. (B) Somente EE nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA comparados com os controles e (C) Somente EH nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA comparados com os controles. Cada ponto (média) corresponde aos títulos de IgE sérica anti-OVA, com diluição  $\frac{1}{4}$ . 64
- Figura 18** (A) Cinética da síntese de IgE específicos anti-OVA, ao longo de 42 dias, após imunização com OVA com ou sem adjuvante de Freund por via s.c. (B) Somente EE nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA + Adj. comparados com os controles e (C) Somente EH nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA + Adj. comparados com os controles. Cada ponto (média) corresponde aos títulos de IgE sérica anti-OVA, com diluição  $\frac{1}{4}$ . 66
- Figura 19** Peso dos animais antes e depois dos tratamentos (42 dias) com os extratos etanólico e hexânico de folhas de gravioleira. 67
- Figura 20** Peso relativo dos órgãos: timo (A), baço (B) e fígado (C) de animais tratados com os extratos etanólico e hexânico de folhas de gravioleira. 68

## LISTA DE TABELAS

		<i>Página</i>
<b>Tabela 1</b>	Caracterização fitoquímica dos extratos etanólico (EE) e hexânico (EH) de folhas de <i>Annona muricata</i> L. <i>in vitro</i> . (+) Presença e (-) Ausência	53
<b>Tabela 2</b>	Determinação da atividade antioxidante dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> L. <i>in vitro</i> pelo método de varredura do radical livre DPPH.	54
<b>Tabela 3</b>	Avaliação da toxicidade subcrônica dos extratos de folhas de <i>Annona muricata</i> L.	55

## ABREVIATURAS

% - percentagem

$\mu\text{L}$  – microlitro

mL – mililitro

ALT - Alanina aminotransferase

*Annona muricata* - Gravioleira

APCs – Células apresentadoras de antígenos

AST - Aspartato aminotransferase

BHT - Butylated hydroxytoluene

CD4+ - co-receptor presente em células T restritas ao MHC de classe II

CD8+ - co-receptor presente em células T restritas ao MHC de classe I

CFA - Adjuvante completo de Freund

DL50 – 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

ELISA - “enzyme-linked immunosorbent assay” (teste imunoenzimático)

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

IFA – Adjuvante incompleto de Freund

IL - Interleucina

IV- índice de varredura de radicais livres

Kg- quilograma

LB – Linfócito B

LPS – lipopolissacarídeo

LT – Linfócito T

mg- miligrama

mg/kg - miligramas por quilograma de peso do animal

MHC – complexo de histocompatibilidade principal

mL- mililitro

OPD - ortho-phenyldiamine

OVA - ovalbumina

PBS - salina tamponada com fosfato

PCA - Anafilaxia cutânea passiva

SC – subcutânea

Swiss – Linhagem de camundongos

TC - célula T citotóxica

Th - “T help” (célula T auxiliar)

Th1 - “T help” 1 (célula T auxiliar do tipo 1)

Th2 - “T help” 2 (célula T auxiliar do tipo 2)

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

TNF- $\beta$  – fator de necrose tumoral beta

UI- unidade internacional

Wistar – Linhagem de ratos

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2.REVISAO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1.Sistema imunológico .....	18
2.2.Resposta imune.....	18
2.2.1.Resposta imune inata.....	19
2.2.2.Resposta imune adaptativa .....	20
2.3.Componentes celulares do sistema imune.....	23
2.4.Imunopotencialização por levamisol.....	29
2.5.Imunoadjuvantes.....	30
2.6.Plantas medicinais.....	32
2.6.1.Princípios ativos de plantas medicinais.....	33
2.6.2.Imunomodulação por plantas medicinais.....	35
2.7.Annona muricata L.....	37
<b>3.OBJETIVOS</b> .....	41
3.1.Objetivo Geral.....	41
3.2.Objetivos Específicos.....	41
<b>4.MATERIAL</b> .....	42
4.1.Animais.....	42
4.2.Material Vegetal.....	42
<b>5.MÉTODOS</b> .....	43
5.1.Preparo dos extratos .....	43
5.2.Estudo Fitoquímico dos Extratos de folhas de graviroleira.....	44
5.2.1. Preparo das amostras a partir dos extratos para determinação dos fitoquímicos .....	44
5.2.1.1. Determinação de fenóis .....	44
5.2.1.2. Determinação de Antocianidinas, Antocianinas e Flavonóides .....	44
5.2.1.3. Determinação de Catequinas .....	45
5.2.1.4. Determinação de Flavonóis, Flavononas, Flavonóis e Xantonas .....	45
5.2.1.5. Determinação de Esteróides e Triterpenóides .....	45
5.2.1.6. Determinação de Saponinas.....	45

5.2.1.7. Determinação de Alcalóides.....	46
5.3. Avaliação da capacidade antioxidante total.....	46
5.4. Estudo Toxicológico.....	47
5.4.1.Avaliação da toxicidade subcrônica dos extratos.....	47
5.5. Estudo do efeito imunomodulador <i>in vivo</i> .....	48
5.5.1. Antígenos e adjuvantes.....	48
5.5.2. Esquema de imunização com Ovalbumina.....	48
5.5.3. Esquema de tratamento.....	49
5.5.3.1. Para avaliação do efeito imunomodulador.....	49
5.5.4. Avaliação da Resposta Imune Humoral.....	51
5.5.4.1. Titulação de anticorpos pelo método de ELISA.....	51
5.5.4.2.. Reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA).....	51
5.5.4.2.1. Reações de anafilaxia cutânea passiva para IgE em Ratos.....	52
5.6. Análises Estatísticas.....	52
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
6.1. Caracterização fitoquímica dos extratos da folha de <i>Annona muricata</i> .....	53
6.2. Determinação da atividade antioxidante dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> L.....	54
6.3 Avaliação da toxicidade subcrônica dos extratos de folhas de <i>Annona muricata</i> L.....	54
6.4. Estudo do efeito dos EE e EH das folhas de <i>Annona muricata</i> L. na resposta imune de camundongos imunizados com ovalbumina por via s.c.....	59
6.4.1.Efeito dos EE e EH das folhas de <i>Annona muricata</i> L. na produção de anticorpos anti-OVA (Ig totais).....	59
6.4.2.Efeito dos EE e EH das folhas de <i>Annona muricata</i> L. na produção de anticorpos IgE anti-OVA.....	63
6.4.3.Avaliação dos tratamentos com os extratos etanólico e hexânico no peso dos animais e no peso relativo dos órgãos.....	67
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>77</b>



## 1. INTRODUÇÃO

---

O Brasil com sua biodiversidade vegetal é o detentor da maior floresta tropical úmida do planeta sendo, esta, ainda pouco conhecida e também pouco explorada quanto ao seu uso como matéria-prima para produção de medicamentos. Desta forma o Brasil não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais que, por muitas vezes, produzem substâncias que são responsáveis por ações farmacológicas ou terapêuticas denominadas de princípios ativos.

Muitos estudos têm considerado as plantas medicinais como recursos promissores em novos protocolos terapêuticos de doenças relacionadas ao sistema imune (ENGEL; STARUSS, 2002). Dentre estes, diversos já mostraram que as plantas utilizadas na medicina popular possuem a capacidade de estimular ou inibir as respostas imunes, isso devido à presença de substâncias ativas com efeito sobre o sistema imune (JACHAK; SAKLANI, 2007).

Dentre as plantas medicinais do Brasil destaca-se a *Annona muricata* L. que é conhecida por apresentar diversas atividades farmacológicas, como efeito antidepressivo (HASRAT et al., 1997), antiparasítico (BORIES, et al., 1991), moluscicida (DOS SANTOS et al., 2000), antiviral (PADMA et al., 1998), antimalárico (GBEASSOR et al., 1990), antibacteriano, anticâncer (SUNDARRAO, 1993) e antidiabético (ADEYEMI et al., 2009). Contudo, ainda pouco se sabe sobre seu potencial imunomodulador, o que despertou o interesse de estudar essa planta em modelos que pudessem verificar se extratos de folhas da gravioleira interferiam na resposta imunológica. No caso de haver tal interferência, torna-se de extrema importância identificar se os extratos obtidos dessa planta possuem atividade imunoestimulante ou imunossupressora, para que se possa indicar o uso correto desse extrato.

## **2. REVISAO DE LITERATURA**

---

### **2.1. Sistema Imunológico**

O sistema imune é uma entidade biológica altamente dinâmica composta por redes complexas e reguladas por várias células linfóides e outros tipos celulares que interagem por contato direto célula-célula e que se comunicam através de mediadores solúveis como citocinas (HERZYK; GORE, 2004).

Por sua vez, o sistema imune, apresenta elevada complexidade e é constituído por diversos componentes articulados que convergem para a elaboração de uma resposta imune mais específica.

Sendo assim, algumas etapas podem ser destacadas tais como: reconhecimento molecular dos agentes agressores; ativação de vias bioquímicas intracelulares que resultam em modificações vasculares e teciduais; produção de uma miríade de mediadores com efeitos locais e sistêmicos no âmbito da ativação e proliferação celulares; síntese de novos produtos envolvidos na quimioatração e migração de células especializadas na destruição e remoção do agente agressor; e finalmente a recuperação tecidual com o restabelecimento funcional do tecido ou órgão (SOUZA, et al., 2010).

Para proteger o organismo contra agentes estranhos, o sistema imune forma interações complexas entre os órgãos, tecidos, células e moléculas que o compõem podendo, assim, ser considerado como um sistema de múltiplas camadas, composto por mecanismos de defesa tais como as barreiras físicas (como a pele, epitélios, mucosas) e químicas (como enzimas e os ácidos do estômago) da resposta imune inata e adaptativa (MOSER; LEO, 2010).

### **2.2. Resposta imune**

A resposta imune é um dos mais importantes mecanismos adaptativos, pois permite a sobrevivência em ambientes potencialmente lesivos onde a mesma envolve, principalmente, o reconhecimento de um agente agressor estranho e, em segundo lugar a elaboração de uma reação com a finalidade de eliminá-lo do organismo que, por sua vez, responde à invasão por um agente estranho de duas maneiras diferentes, porém

correlacionadas, a resposta imune inata e resposta imune adaptativa (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

Tanto a imunidade inata como a adaptativa depende da atividade de células brancas do sangue, ou seja, os leucócitos sendo que a imunidade inata é mediada, principalmente, por granulócitos, macrófagos e células dendríticas. Estes, por sua vez, atuam como células apresentadoras de antígeno, muitas vezes utilizando-se de receptores presentes na superfície de sua membrana, para interagir com antígenos, microrganismos ou outras células. Já as respostas adaptativas são mediadas por linfócitos B e T, que proporcionam a imunidade duradoura (JANEWAY, TRAVERS, SHLOMCHIK, 2002; MANZ et al., 2005).

A resposta imune inata é rápida, porém dotada de baixa especificidade, a resposta imune adaptativa é precisa, embora necessite de alguns dias ou semanas para se desenvolver, mesmo no caso de exposições subsequentes, que culminam numa resposta adquirida mais rápida e vigorosa, sem, contudo ser imediata (PARKIN, COHEN, 2001) servindo como o sinal de alerta para o sistema imune adaptativo que monta uma resposta protetora, sendo que os diferentes componentes da imunidade inata respondem de maneira distinta a diversos patógenos (ex: microrganismo intracelular vs. Extracelular), conseqüentemente influenciando o tipo de resposta adaptativa (ex: celular ou humoral, respectivamente) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

### **2.2.1. Resposta imune inata**

A imunidade inata é uma forma de resposta imune evolutivamente conservada que representa a primeira linha de defesa contra patógenos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os componentes da imunidade inata são representados pelas barreiras físicas e químicas como a pele e as mucosas respiratória e digestiva; por células efectoras como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos e células “natural killer”, por proteínas efectoras circulantes, como as proteínas do sistema complemento, proteína C reativa e fatores de coagulação e várias citocinas, tais como IL-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-12. (TURVEY & BROIDE, 2010), citocinas, que

recrutam e ativam leucócitos e produzem alterações sistêmicas que potencializam a resposta antimicrobiana.

Os mastócitos, grupo de células essenciais principalmente frente a processos alérgicos são quem estão estrategicamente localizados nas vizinhanças de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo, onde combatem antígenos que porventura penetrem na circulação através de líquido tecidual ou de descontinuidades epiteliais (KINET, 2007). Possuem citoplasma rico em grânulos basófilos (coram-se por corantes básicos), funcionam como "sentinelas", uma vez que possuem alta sensibilidade, com IgE de antígenos específicos que já apareceram no corpo. (NORRBY, 2002; METZ et. al.; 2007). O processo alérgico inicia-se com a apresentação do antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). Após a apresentação do antígeno para os linfócitos T específicos ocorre a proliferação e diferenciação, assim como cooperação com plasmócitos IgE específicos. Os anticorpos IgEs, por sua vez, fixam-se na membrana de mastócitos através dos receptores de alta afinidade para a porção Fc da IgE (FcεRI). Em um próximo contato com o alérgeno, os anticorpos específicos que ocupam estes receptores em uma mesma célula ligam-se ao alérgeno iniciando a degranulação celular (COOMBS; GELL, 1975) atraindo os leucócitos até o local e proporcionando uma vasodilatação (OKRUHLICOVA et. al; 2007). Este processo por sua vez é chamado de Hipersensibilidade do Tipo I, mediados por anticorpos da classe IgE, caracterizada pelo desequilíbrio da resposta imune humoral.

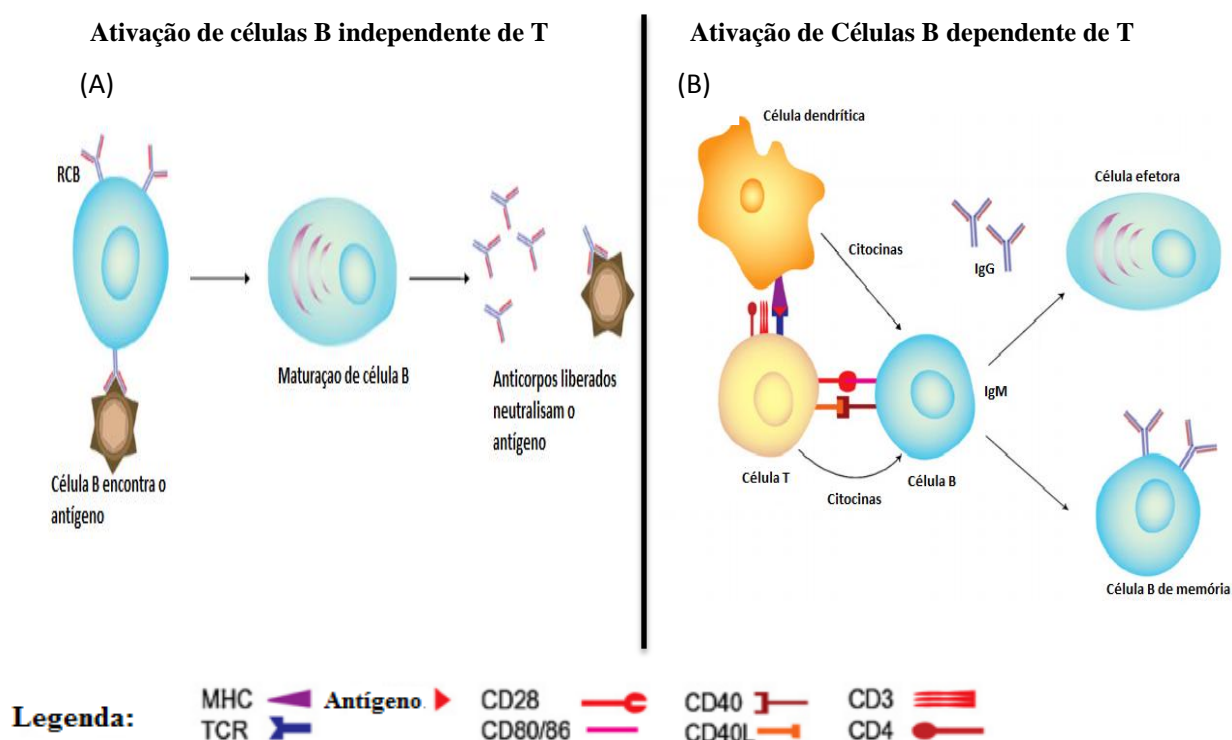
### **2.2.2. Resposta imune adaptativa**

A resposta imune adaptativa, ou específica, é mais especializada do que a resposta inata. Tem como característica principal a especificidade extraordinária para distinguir as diferentes moléculas e uma habilidade de se “lembrar” e responder com maior intensidade a exposição subsequente ao mesmo microrganismo. Assim, o mesmo é capaz de reconhecer e reagir a um grande número de substâncias, microbianas ou não.

A imunidade adaptativa pode ser dividida em imunidade humoral e celular, Os componentes da imunidade humoral incluem os linfócitos B (LB) que secretam anticorpos antígeno-específicos, com a função de neutralizar e opsonizar patógenos extracelulares e suas toxinas (ESSER et al., 2003). Já a imunidade celular é mediada

por linfócitos T (LT) e seus produtos (JANEWAY, TRAVERS, SHLOMCHIK, 2002; MANZ et al., 2005). Estas células (LB e LT) são produzidas na medula óssea a partir da célula progenitora *stem cell*. A diferenciação dos linfócitos B ocorre na própria medula óssea enquanto que os linfócitos T amadurecem no timo, diferenciando-se em linfócitos T auxiliares, que expressam a proteína CD4, que modulam a intensidade, duração, eficácia e da reação imunológica na membrana celular, ou em linfócitos T citotóxicos, que expressam CD8, consideradas T citotóxicos (Tc) (PARHAM, 2001; MOSER; LEO, 2010).

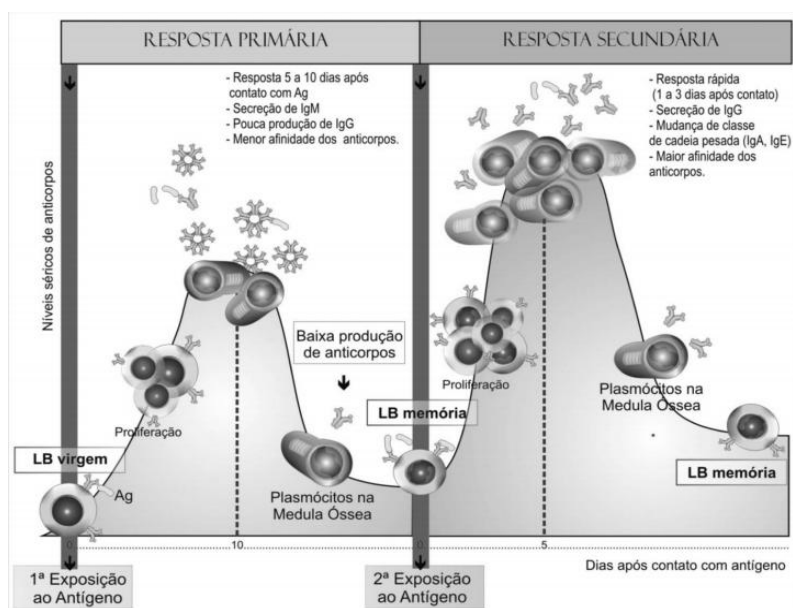
Para tal resposta, a maioria dos antígenos protéicos, por exemplo, requer o auxílio das células T antígeno-específicas para produzir uma resposta humoral (antígenos T-dependentes), como a ovalbumina. Porém alguns antígenos, como o LPS, não necessitam da presença de células T auxiliares, sendo denominados T-independentes, como mostrados na figura 1, normalmente de origem bacteriana, que se caracterizam por constituírem grandes moléculas poliméricas, altamente resistentes à degradação, provocando respostas mais fracas que os antígenos T-dependentes. Estes antígenos, por sua vez, geram, principalmente, resposta IgM, no entanto não induzem a diferenciação de células B de memória (JANEWAY et al., 2002).



**Figura 1** - Ativação de células B: independente (A) e dependente (B) de células T (MOSER; LEO, 2010).

Já a resposta humoral frente a antígenos protéicos requer o reconhecimento deste antígeno pelos LT auxiliares e sua cooperação com os LB antígeno-específicos, estimulando a expansão clonal dos LB, a mudança de classe, a maturação de afinidade e a diferenciação em LB de memória (MESQUITA et. al.; 2010). O primeiro contato com um antígeno, leva à ativação de LB virgens, que se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos e em células de memória, resultando na produção de anticorpos específicos contra o antígeno indutor. Após o início da resposta, observa-se uma fase de aumento exponencial dos níveis de anticorpos, seguida por uma fase denominada platô, na qual os níveis não se alteram. Por fim, na resposta primária, vem a fase de declínio, na qual ocorre uma diminuição progressiva dos anticorpos específicos circulantes (MESQUITA et. al.; 2010).

Ao entrar em contato com o antígeno pela segunda vez, já existe uma população de LB capazes de reconhecer esse antígeno devido à expansão clonal e células de memória geradas anteriormente, na resposta primária. Desta maneira, a resposta secundária difere da primária nos seguintes aspectos: a fase de latência é mais curta e a fase exponencial é mais acentuada; a produção de anticorpos é mais rápida e são atingidos níveis mais elevados; a fase de platô é alcançada mais rapidamente e é mais duradoura e a fase de declínio é mais lenta e persistente (Figura 2) (MESQUITA et. al.; 2010).



**Figura 2** - Curso da resposta imune adaptativa e suas fases: primária e secundária (MESQUITA et al., 2010).

A resposta secundária depende também do intervalo de tempo desde o contato inicial com o antígeno. Considera-se menor a resposta se o intervalo for tanto muito curto quanto muito longo. Se for muito curto, os anticorpos que estão ainda presentes formam complexos imunes que por sua vez são rapidamente eliminados; se for muito longo, é possível que as células de memória tenham diminuído gradualmente com o tempo, embora a capacidade para deflagrar uma resposta secundária possa persistir por meses ou anos. Sendo assim, o período ótimo para a indução de resposta secundária é logo após a queda do nível de anticorpos da resposta primária abaixo dos limites de detecção (MESQUITA et al.; 2010).

Nos dois tipos de resposta, primária e secundária, ocorre a produção de isótipos IgM e IgG, porém, na resposta primária IgM é a principal Ig e a produção de IgG é menor e mais tardia. Na resposta secundária, a IgG é a imunoglobulina predominante. Nas duas respostas, a concentração de IgM sérica diminui rapidamente e após uma ou duas semanas, observa-se queda acentuada enquanto que a produção de IgG continua persistindo (MESQUITA et al.; 2010).

### **2.3. Componentes celulares do sistema imune**

O reconhecimento do antígeno de forma adequada, ou seja, em associação com os sinais de co-estimulação na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs), leva à proliferação e diferenciação de células T em células efetoras (SPRENT & KISHIMOTO, 2002).

As células apresentadoras de antígenos são especializadas em capturar microrganismos e outros antígenos, apresentá-los aos linfócitos e fornecer sinais que estimulam a proliferação e diferenciação dos linfócitos. O principal tipo de APC é a célula dendrítica, que é encontrada sob o epitélio da maioria dos órgãos, onde sua função é a captura de antígenos estranhos e seu transporte para os órgãos linfóides periféricos (SPRENT; KISHIMOTO, 2002).

As células dendríticas (DCs) são células do sistema imune que têm como principal função processar e apresentar antígenos para outras células, sendo

consideradas as mais importantes células apresentadoras de antígeno do organismo. As DCs têm um papel fundamental na manutenção tanto da tolerância central como periférica (USLUOGLU et al., 2007). Por sua vez, estas células são encontradas nos mais diversos sítios anatômicos e, uma vez ativadas, migram para órgãos linfoides secundários onde irão interagir intensamente com LT e LB. As DCs têm um papel central no direcionamento das respostas imunes, regulando a ativação e progressão delas (GRANUCCI et.al, 2008).

Os linfócitos reconhecem o antígeno através de proteínas presentes na membrana celular que no linfócito B são as imunoglobulinas e no linfócito T são os receptores de células T. Os LB podem reconhecer qualquer tipo de antígeno, mesmo em sua forma nativa, sofrendo mitoses sucessivas e que posteriormente se diferenciam em plasmócitos, células secretoras de anticorpos da resposta imune humoral. (ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007).

Os LT, contrariamente aos LB que possuem interações químicas altamente específicas entre os anticorpos e o agente estranho neutralizando a atividade do agente agressor, reconhecem apenas a sequência primária de pequenos peptídeos derivados de antígenos proteicos. Para tal reconhecimento é necessário que estes peptídeos estejam ligados a determinadas moléculas expressas na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs), as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (VICTOR, 2008). Os antígenos proteicos extracelulares são fagocitados pelas (APCs), processados até pequenos peptídeos pela ação de proteases, e ligados às moléculas de MHC de classe II e expressos na membrana celular para que possam ser reconhecidos pelo LT CD4+. Já os antígenos proteicos intracelulares sintetizados no citosol são processados em pequenos peptídeos pelo proteossoma, transportados para o retículo endoplasmático e então ligados às moléculas do MHC de classe I e expressos na superfície da célula para posteriormente serem reconhecidos pelo LT CD8+ (ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007).

A síntese de anticorpos IgE é dependente da ação de LT auxiliares (Th) CD4+ e especialmente de seus produtos secretados, as citocinas (MOSSMAN; COFFMAN, 1989). São uma classe de células conhecidas como mediadores solúveis essenciais na indução da resposta imune, moléculas proteicas, glicosiladas ou não, que enviam sinais estimulatórios, regulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema



imunológico. Tem função autócrina, agindo na própria célula produtora; parácrina, atuando em células próximas; ou endócrina, quando sua ação é a distância (VARELLA; FORTE, 2001). Consideradas mediadores solúveis das respostas de defesa do hospedeiro, tanto específicas quanto inespecíficas. Como tais, desempenham um papel extremamente importante nos mecanismos efetores envolvidos na eliminação de antígenos estranhos, como os microrganismos.

A figura 3 mostra como atuam as citocinas produzidas frente à resposta imune, como são secretadas e seus efeitos diante de diversas situações.

CITOCINA	SECREÇÃO	EFEITO
<b>IMUNIDADE INATA</b>		
Interleucina 1 ( IL - 1)	células Mielóides *(a); células endoteliais, inflamação das células epiteliais	Febre Ativação celular
Fator de necrose tumoral	Células mielóides	Inflamação
interleucina 12 ( IL -12)	Macrófagos, células dendríticas	Promoção do subconjunto Th1
Interleucina 6 (IL-6)	Células mielóides e estromais*(b)	Secreção e proliferação de anticorpos por células B; inflamação
Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	Células dendríticas ; fibroblastos	Promove a expressão de MHC de classe 1; ativação de células NK; promove a resposta de células T CD8+
<b>IMUNIDADE ADAPTATIVA</b>		
Interleucina 2 (IL-2)	células T	Proliferação de células T; ativação e proliferação de células NK; proliferação de células B
Interleucina 4 (IL-4)	Células Th2; mastócitos	Promoção do subgrupo Th2; mudança de isotipo para IgE
Interleucina 5 (IL-5)	Células Th2	Ativação e geração de eosinófilos
Interferon - $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	Células Th1; células CD8+; células NK	Ativação de macrófagos; promove a expressão de MHC; promove a expressão de antígeno

**Figura 3** - Citocinas e seus efeitos (MOSER; LEO, 2010)

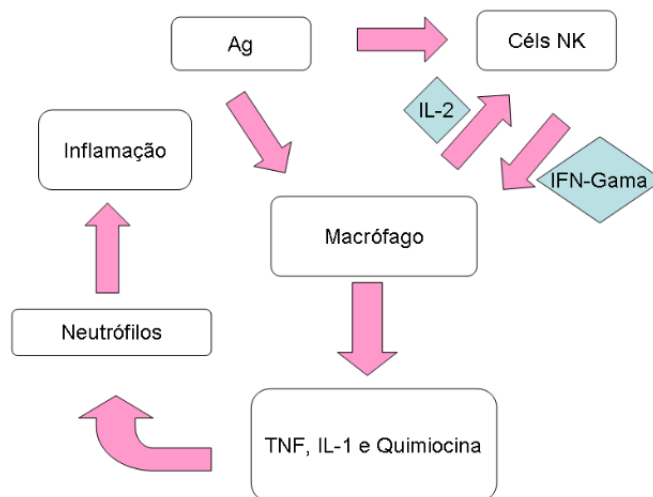
\*(a) Células mielóides incluem macrófagos, monócitos e células dendríticas.

\*(b) Células estromais incluem células epiteliais endoteliais e fibroblastos.

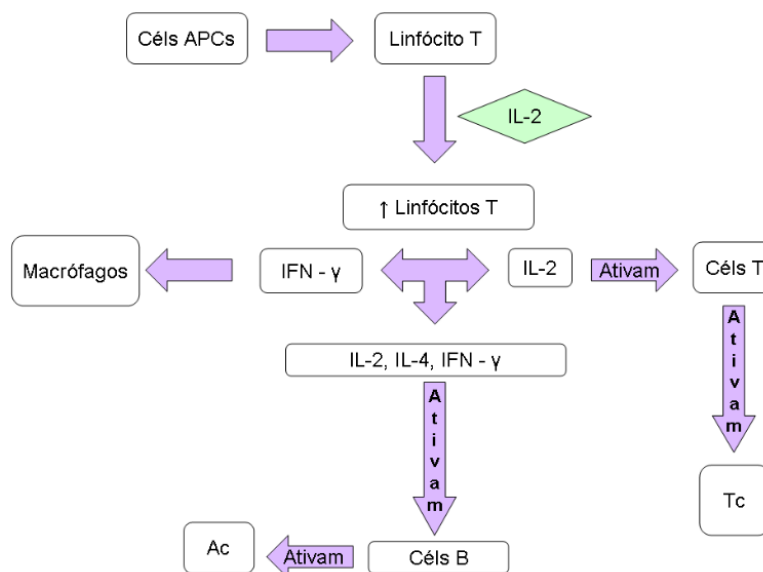
Há cerca de 20 anos, os LT efetores CD4+ começaram a ser categorizados em dois subtipos distintos, T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), tomando por base o padrão de citocinas produzido. Alguns autores valorizavam ainda a existência de uma terceira população celular, as células Th0, representadas por linfócitos indiferenciados capazes de produzir citocinas do perfil Th1 e Th2 (SOUZA et al., 2010).

Estas células Th0 evoluem para diferenciação Th1 ou Th2 ainda em um estágio inicial da ativação celular e atualmente está claro que, após a estimulação antigênica, conforme o ambiente local de citocinas, os LT CD4+ naive, ou células virgens, se proliferam e se diferenciam em diferentes subtipos efetores com características próprias (Th1, Th2, Th3, TREG, Th17), determinadas pelo perfil de citocinas produzidas e pelas propriedades funcionais (SOUZA, et al., 2010).

Existe um “feedback” positivo que se refere ao fato do IFN- $\gamma$  estimular as células Th0 a diferenciarem em células Th1 e, ao mesmo tempo, inibindo a diferenciação de células Th2. A resposta Th1 é essencial no controle da replicação de patógenos intracelulares, mas possivelmente contribui na patogênese de doenças autoimunes como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla. As células Th2, por sua vez, produzem IL-4, IL-5 e IL-10, que favorecem a produção de anticorpos da subclasse IgG1 e da classe IgE. A IL-4 também promove um “feedback” positivo ao favorecer a indução da resposta Th2 e suprimir a diferenciação de células Th1 (PARKIN, COHEN, 2001).



**Figura 4** - Esquema de atuação de citocinas na imunidade inata. Fonte: <http://metodoslaboratoriaiscomac.blogspot.com/2010/09/resumo-aula-24092010-citocinas.html>



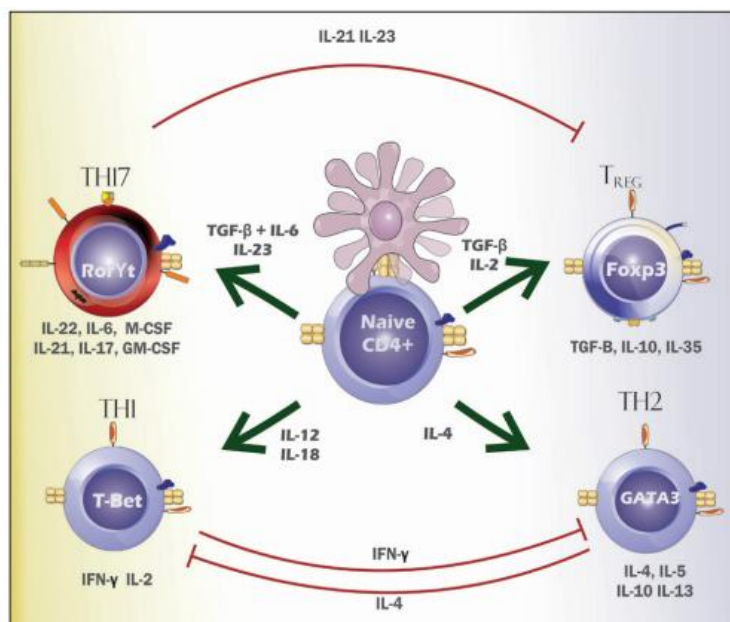
**Figura 5** - Esquema de atuação de citocinas na imunidade adquirida. Fonte: <http://metodoslaboratoriaiscomac.blogspot.com/2010/09/resumo-aula-24092010-citocinas.html>

As células Th1 produzem a interleucina (IL)-2, que induz a proliferação das células T, incluindo aquelas células CD4<sup>+</sup> de resposta autócrina. A IL-2 também estimula a divisão das células T CD8<sup>+</sup> e sua citotoxicidade. Outra citocina produzida pelas células Th1, citada anteriormente, é o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), responsável pela imunidade mediada por células, tais como a hipersensibilidade do tipo tardia, ativação de macrófagos e células inflamatórias que eliminam patógenos intracelulares, como as micobactérias, fungos, protozoários e ainda, induzem a citotoxicidade das células “natural killer”. Portanto, as citocinas produzidas pelas células Th1, são as principais responsáveis pela indução da resposta inflamatória (PARKIN; COHEN, 2001).

Conforme esquematizado na Figura 6, as células Th1 caracterizam-se principalmente pela produção de grandes quantidades de INF- $\gamma$ , enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13. As respostas Th1 desencadeiam os mecanismos de hipersensibilidade tardia, ativam macrófagos e são muito eficientes na eliminação de patógenos intracelulares. As células Th2 são mais eficientes em auxiliar a resposta imune humoral, desencadeando produção de imunoglobulinas e inflamação eosinofílica, respostas estas mais importantes no combate aos patógenos extracelulares. Os linfócitos. Caracteristicamente, as citocinas do perfil Th1 ou Th2 direcionam para o

desenvolvimento de sua respectiva via, inibindo a expressão do padrão oposto. Deste modo, uma vez polarizada a resposta imune para o padrão Th1, a via Th2 será inibida, e vice-versa. Isso ocorre devido à regulação do nível de receptores de membrana, da expressão diferencial de fatores de transcrição e de mudanças epigenéticas (SOUZA, et al., 2010).

Outros dois tipos de células T descritos na resposta imune principalmente relacionados a transplantes são as células Treg (papel protetor) e Th17 (papel efetor). No microambiente do enxerto apesar da característica supressora do fator transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e de sua importância na na geração de células T reguladoras, este, em conjunto com IL-6, induz a diferenciação de células T CD4+ numa subpopulação de LT produtores de IL-17 que apresenta um importante papel no processo inflamatório (KIMURA et al., 2007). Estas células, denominadas de Th17 expressão o fator de transcrição ROR $\gamma$ T (do inglês, *Related Orphan Receptor  $\gamma$* ) e inibem a indução do fator de transcrição Foxp3 (do inglês, *Forkhead Box P3*) nas células reguladoras induzidas por TGF- $\beta$  na presença de IL-6 (STEINMAN, 2007).



**Figura 6** - Representação esquemática das vias de diferenciação das células Th0 com destaque para as citocinas indutoras da diferenciação Th1, Th2, Th17 e Treg e as principais citocinas secretadas (SOUZA et al., 2010).

Alguns estudos iniciais com camundongos deficientes de células B indicaram que a ausência de células B prejudica tanto a resposta das células T CD4+ quanto a de células T CD8+ (HOMANN et. al., 1998; SHEN et. al., 2003).

Mais tarde, mostraram e relataram sobre a ativação e manutenção das células T CD4+ mediadas por células B (CHRISTENSEN et al., 2003; LIU et al., 2007) mostrando que estas últimas podem modular a resposta de células T frente ao antígeno, regulando a proliferação inicial de células T CD4+ após o encontro com o antígeno e tendo papéis em T CD4+ de respostas celulares de memória (LUND et. al., 2006; WOJCIECHOWSKI et. al., 2009).

Esses dados mostram que as células B não são simplesmente receptores passivos de auxílio de células T, mas que podem participar ativamente na resposta imune celular, orientando a magnitude e a qualidade da resposta de células T frente a antígenos estranhos e independentes (LUND et. al., 2010).

#### **2.4. Imunopotencialização por Levamisol®**

A imunopotencialização ou imunoestimulação resulta no aumento das respostas imunes, implicando na estimulação do sistema imune inato e do sistema imune adquirido.

Uma droga imunoestimulante estimula primariamente o sistema imune não específico através da imunidade inata, o qual é constituído por células tais como macrófagos, granulócitos, células NK e por diferentes substâncias efetoras tais como quimiocinas, citocinas. Além da ativação do sistema complemento através das vias alternativa e clássica de maneira dose-dependente. Ao contrário de imunossuppressores que agem seletivamente sobre o sistema imune específico através da imunidade adquirida, principalmente, reduzindo a resistência contra infecções, estresse e outros fatores (MAKARE et al., 2001).

Como potente imunoestimulador podemos citar o Levamisol®, um fármaco pertencente ao grupo dos imidazotiazóis, que apresenta propriedades imunomoduladoras e que vem sendo utilizado no tratamento de doenças imunológicas (PURZYC; CALKOSINSKI, 1998). Possui a capacidade de aumentar a atividade

imunológica mediada por células, em que se incluem a diferenciação e a proliferação dos LT, e da atividade dos LT efetores (ANDRADE & SANTARÉM, 2002; BRAGA et. al., 2007). Embora seja utilizado amplamente como um antihelmíntico, o levamisol® pode potencializar o efeito de vacinas e induzir a remissão de tumores, sendo utilizado em humanos nos estados de imunodeficiência primária e secundária (BARTA, 1992).

Considerado um fármaco anti-helmíntico de amplo espectro, o Levamisol® é utilizado no tratamento de parasitose intestinal, por ser antihelmíntico, referido anteriormente. Concomitantemente à ação anti-helmíntica, esse fármaco atua no sistema imunológico de maneira semelhante ao hormônio timopoiética, produzido no timo (TIZARD, 2002), estimulando a ação de células T, a resposta aos antígenos, a produção de interferons, aumentando a atividade fagocitária de macrófagos e neutrófilos, estimulando a citotoxicidade mediada por células, a produção de linfocinas e a função das células supressoras (TIZARD, 2002).

Os efeitos do Levamisol® são mais efetivos em animais com redução no número de células T, sendo que possui pouco ou nenhum efeito em animais com função normal destas células (JANEWAY et al., 2002; TIZARD, 2002).

No entanto a imunopotencialização ainda pode incluir compostos que modificam a resposta imune, ajudando a potencializá-la. Estes agentes acabam incluindo compostos como moléculas fisiologicamente ativas, como verdadeiros adjuvantes que são utilizados juntamente com o antígeno.

## **2.5. Imunoadjuvantes**

O termo adjuvante originou-se da palavra latina *adjuvare* que significa ajudar. Teoricamente, cada molécula ou substância capaz de amplificar ou intensificar a cascata de eventos imunológicos que compõem a resposta imune pode ser classificada como adjuvante (SCHIJNS, 2000).

Adjuvantes imunológicos são substâncias capazes de aumentar a resposta imune específica e auxiliar o antígeno a desencadear uma resposta imune precoce, elevada e duradoura. Nos últimos anos, os adjuvantes receberam muita atenção, devido ao desenvolvimento de vacinas sintéticas e purificadas, usando subunidades de antígenos,

os quais são fracos imunógenos e requerem adjuvantes para desencadear uma resposta imunológica. Os adjuvantes apresentam diversos mecanismos de ação e devem ser selecionados baseados na rota de administração e na imunidade requerida pelo tipo de vacina particular (imunidade humoral, celular ou mucosa) (MOTA, 2006).

MARCIANI (2003) propôs uma classificação dos adjuvantes de acordo com sua capacidade de estimular imunidade do tipo Th1 ou do tipo Th2 e então subdividi-los pela estrutura química, ajudando a estabelecer a relação estrutura-função. Esse sistema de classificação permite uma alternativa de dividir os adjuvantes por sua capacidade em estimular a resposta imune inata e a adquirida (MARCIANI, 2003) e também tenta superar as classificações dúbias geradas com base na origem, natureza química ou nas propriedades físico-químicas, já que substâncias de mesma natureza química podem divergir em suas propriedades imunomoduladoras, como é o caso das saponinas (PRESS et al., 2000).

Saponinas isoladas de *Quillaja saponaria*, têm sido extensivamente estudada e mostrado um forte potencial adjuvante que parece estar associado a sua capacidade de induzir produção de citocinas (SINGH; O'HAGAN, 2003).

Uma vez que os adjuvantes podem estimular a produção de citocinas e quimiocinas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), recrutar células dos tecidos e gânglios locais e direcionar para o desenvolvimento de uma resposta humoral ou mediada por células, estes permitem que menores quantidades de antígeno sejam usadas e a resposta à produção do anticorpo seja mais persistente (COX; COULTER 1997)

Em 1956, com a descoberta dos adjuvantes de Freund, o uso das emulsões em procedimentos de imunização tornou-se freqüente. O adjuvante completo de Freund (CFA), é composto de óleo mineral e micobactérias mortas, considerado um dos mais potentes adjuvantes descritos para diversos antígenos (MALAGA et al., 2004).

O CFA é usado extensivamente em procedimentos experimentais em animais de laboratório. Um dos maiores problemas encontrados para vacinas com adjuvantes à base de óleo mineral é que o uso freqüente pode resultar em reações adversas indesejáveis, tais como a formação de granulomas e cistos. Também pode ser usado o adjuvante incompleto de Freund (IFA), assim denominado por não conter a

micobactéria morta. Tanto CFA, quanto IFA apresentam efeitos adversos que são creditados ao óleo mineral, pelo fato deste não ser biodegradável, formando lesões ulcerativas no local da injeção (GUPTA et al., 1993; MALAGA et al., 2004).

## **2.6. Plantas medicinais**

Entende-se por plantas medicinais aquelas que, nativas ou cultivadas, são utilizadas para fins medicinais (OMS, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80% da população nos países em desenvolvimento em uso de plantas medicinais no tratamento de doenças primárias (CARVALHO et al., 2008).

O Brasil possui uma flora riquíssima em exemplares que são utilizados como plantas medicinais pela população, tendo seu uso especialmente difundido em áreas rurais para o tratamento de muitas doenças. Estas, por sua vez, vêm ganhando cada vez mais, importância na medicina popular por apresentarem propriedades consideradas terapêuticas (OTTO; KAPLAN; BORIN, 1996).

Os estudos são focalizados em anti-inflamatórios, antimicrobianos e na atividade tumoral/ citotóxica de algumas espécies de plantas (HOLETZ et al., 2002; SUYENAGA et al., 2002). As atividades farmacológicas destas plantas, em particular suas ações imunológicas, têm sido foco de pesquisas no intuito de prevenir e curar doenças.

A capacidade de substâncias naturais de plantas induzirem efeito sobre as funções imunes específicas e inespecíficas em animais experimentais despertou o interesse para a identificação dos constituintes fitoquímicos imunoativos (KUMAR et al.; 2000), sendo que o uso de plantas como fonte de substâncias imunomoduladoras ainda é incipiente nos tratamentos da medicina moderna. Porém, os estudos para a avaliação sobre o sistema imune são crescentes (DAVIS; KUTTAN, 2000).

Um aspecto importante da Tradicional Medicina Chinesa é a preferência pelas combinações (extratos) no lugar de compostos puros. Assim, do ponto de vista



farmacológico, a medicina tradicional possui ações múltiplas e moderadas porque consiste de vários grupos de componentes ativos e com vários efeitos farmacológicos (MIYATA, 2007).

Drogas botânicas, como definidas pelo “*Food and Drug Administration* (FDA)”, contêm ingredientes de plantas verdes ou secas, partes de planta, componentes isolados ou combinados, algas, fungos macroscópicos ou combinações destes, e podem ser usados em cura, mitigação, tratamento e prevenção de doenças em seres humanos (LIU; WANG, 2008).

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente (CARLOS et.al., 2005). Dentre estas substâncias algumas possuem atividades biológicas, como a capacidade de possuírem propriedades imunomoduladoras e antioxidantes, sendo observado que, quando utilizadas na medicina popular possuem a capacidade de estimular ou inibir as respostas imunes, isso devido a presença de substâncias ativas com efeito sobre o sistema imune.

### **2.6.1. Princípios Ativos de Plantas Medicinais**

De acordo com a Resolução Nº 48, de 16 de março de 2004, os princípios ativos das plantas medicinais são substâncias que a planta sintetiza e armazena durante o seu crescimento. No entanto, nem todos os produtos metabólicos sintetizados possuem valor medicinal. Todas as espécies de plantas contêm princípios ativos e substâncias inertes. Estas últimas determinam a eficácia da planta medicinal acelerando ou retardando a absorção dos princípios ativos pelo organismo.

Geralmente, em uma mesma planta, encontram-se vários componentes ativos, dos quais um ou um grupo deles determina a ação principal. Este princípio ativo, quando isolado, normalmente apresenta ação diferente daquela apresentada pelo vegetal inteiro, ou seja, aquela apresentada pelo seu fitocomplexo.

Porém, os vegetais não apresentam uma concentração uniforme de princípios ativos durante o seu ciclo de vida podendo concentrar-se, preferencialmente,

nas flores, folhas e raízes, e, às vezes nas sementes, nos frutos e na casca  
RESOLUÇÃO-RDC Nº. 48, DE 16 DE MARÇO DE 2004.

Assim, os princípios ativos das plantas medicinais podem variar de acordo com a idade da planta, a época da colheita, o habitat, condições do solo, condições do tempo, preparação do material vegetal e parte da planta em estudo.

As condições de extração também diferem muito para os diferentes tipos de compostos. Por exemplo, para extração de metabólitos polares são usados o etanol, metanol ou água, enquanto que para os mais lipofílicos os solvente mais comum são o clorofórmio e hexano. A escolha dos reagentes envolve um compromisso entre maximizar a eficiência da extração e garantir o maior ou menor número de metabólitos dependendo do caso a ser analisado (DUNN; ELLIS, 2005).

O estudo fitoquímico tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou determinar a sua presença, quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse. A análise fitoquímica preliminar, por sua vez, pode indicar os grupos de metabólitos secundários (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001).

Para caracterizar os principais grupos de substância vegetais de interesse, os mesmos, têm sido determinados através de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001).

Os metabólitos secundários são considerados como produtos de excreção vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas. Por serem fatores de interação entre organismos, frequentemente, possuem atividades biológicas importantes. Do ponto de vista farmacêutico, o maior interesse deriva essencialmente do número elevado de substâncias farmacologicamente importantes (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001), como é o caso de saponinas, taninos, esteróides, entre outros de similar importância.

Os produtos naturais exercem importante papel na medicina moderna, já que são fontes destes princípios ativos, dentre outros, que muitas vezes são de difícil produção sintética; também são fontes de compostos básicos que, com pequenas modificações, tornam-se de grande interesse comercial; compostos naturais também

podem servir de modelos para medicamentos sintéticos que tenham atividade biológica similar à do composto natural.

Observa-se assim, crescimento do número de adeptos do uso de produtos naturais para tratar suas enfermidades. A pesquisa de propriedades farmacológicas de produtos naturais tem proporcionado à descoberta de substâncias farmacologicamente ativas, com importantes aplicações tanto na área experimental como na identificação de princípios ativos de interesse terapêutico.

Reconhece-se dessa forma a importância do desenvolvimento de novos estudos com plantas medicinais, visando evidenciar sua propriedade terapêutica, podendo levar à produção de fármacos para uma melhor assistência a saúde e a preços mais acessíveis. Portanto, aliam-se as questões culturais, sociais e ecológicas à esfera econômica, visto que abre caminho para a descoberta de fármacos de origem vegetal (DI STASSI e HIRUMA-LIMA, 2002).

### **2.6.2. Imunomodulação por plantas medicinais**

Recentemente, foi demonstrado que algumas das plantas utilizadas como medicamentos tradicionais possuem várias atividades biológicas, incluindo atividade imunomoduladora (KIM et al., 2007).

Deste modo, uma variedade de substâncias, como polissacarídeos, lectinas, peptídeos, saponinas, esteróides, óleos e outras, oriundas de plantas são capazes de estimular o sistema imune, apresentando atividade imunomoduladora.

O efeito de produtos naturais sobre as citocinas e seus mecanismos de ação torna-se uma ferramenta importante como um potencial de teor terapêutico para o tratamento de doenças em diferentes condições (SPELMAN et al., 2006).

Desta forma investigações sobre diversas ervas e produtos naturais que possuem propriedades imunomoduladoras podem ser úteis na redução do risco de várias doenças e cânceres (HUANG et al., 2008).

SHUKLA e colaboradores (2009) mostraram que o extrato etanólico de sementes de *Caesalpinia bonducella* estimulou a resposta imune humoral e celular de

ratos albinos imunizados com hemácias de carneiro, também impediu mielossupressão em ratos tratados com ciclofosfamida, mostrando possuir atividade imunomoduladora e um promissor potencial terapêutico para a prevenção de doenças auto-imunes.

Estudo realizado com extrato aquoso de *Uncaria perrotteti* mostrou que este estimulou a ativação de fagócitos peritoneais, produziu um significativo aumento na atividade de células fagocitárias do baço de camundongos *Balb/C* e promoveu a proliferação celular esplênica com ou sem lipopolissacarídeo (LPS), quando comparadas com células tratadas com PBS (controle negativo) (NUDO; CATAP, 2011).

O estudo do efeito com extrato aquoso de raiz de *Asparagus racemosus* em animais sensibilizados com hemácias de carneiro mostrou que o tratamento resultou em aumento significativo nas percentagens das células CD4/CD8 sugerindo seu efeito sobre a ativação de células T. Os animais tratados apresentaram aumento significativo da regulação de Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4), apresentando atividade adjuvante (GAUTAMA et al.; 2009).

O extrato etanólico de *Houttuynia cordata* modulou negativamente a resposta imune de Th2, induzindo imunossupressão da produção de citocinas (IL-4 e IL-5), bem como inibiu a migração induzida pelo quimiocina regulatória da ativação do timo (TARC), constituindo-se um efetivo imunossupressor (LEE et al., 2008).

Já o extrato metanólico da raiz de *Curculigo orchoides* teve efeito imunoestimulante, com aumento da resposta imune humoral e celular induzidos por hemácias de carneiro, em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida. O estudo fitoquímico do extrato relevou a presença de alcalóides, fenóis, taninos, saponinas e esteróides (BAFNA; MISHRA, 2006).

A própolis mostrou possuir propriedades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica, antitumoral, anti-inflamatória e imunomoduladora (FREITAS et al., 2006; GIRGIN et al., 2009; HU et al., 2005; MURAD et al., 2002; ORSI et al., 2005; SFORCIN, 2007).

Verifica-se, portanto, uma ampla atuação das plantas medicinais nos diferentes protocolos empregados para avaliação de suas ações sobre o sistema imunológico. Muitos desses trabalhos foram responsáveis por validar sua utilização na medicina popular.

## 2.7. *Annona muricata* L.

O gênero *Annona* compreende mais de 60 espécies, divididas em cinco grupos e 14 seções. São representantes deste grupo, além da gravioleira (*Annona muricata* L.), outras espécies cultivadas, como a condessa (*Annona reticulata* L.), a pinha (*Annona squamosa* L.), acherimóia (*Annona cherimola* Mill.) e a atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.), e outras como a *Annona glabra* L., conhecida como *annona* do brejo (SACRAMENTO et al., 2009).

A *Annona muricata* L. é encontrada da América Central a América do Sul incluindo as regiões Norte, Nordeste e Sudoeste do Brasil (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Típica das regiões tropicais das Américas, tem todas as suas partes utilizadas na medicina natural. Com sua extraordinária dispersão mundial a gravioleira é, naturalmente uma decorrência do excelente sabor e aroma de seus frutos, assim como das propriedades medicinais de diferentes partes da planta.

Dentre as anonáceas, o cultivo da gravioleira é bastante recente. As frutas tropicais Anonáceas, no passado não apresentavam importância, porém, atualmente, se transformaram em cultivos rentáveis e geradores de empregos, devido a descoberta com conseqüente evolução de seu uso pela população na medicina natural e com a evolução do mercado muitas áreas comerciais têm surgido em diversos Estados brasileiros, destacando a Bahia, Ceará, Pernambuco, Alagoas e Minas Gerais.

Plantas *Annona* são usadas na medicina tradicional e são mencionadas como uma das plantas medicinais no Brasil (WANG et al., 2002). Essa família é constituída por árvores e arbustos, caracteriza-se por apresentar flores andróginas, solitárias ou em inflorescências, axilares ou terminais, cálice de três sépalas, corola de seis pétalas bisseriadas, geralmente carnosas ou crassas, estames numerosos, gineceu dialicarpelar; fruto sincárpico ou apocárpico, muricado ou não; carpódios sésseis ou estipitados, secos ou carnosos, deiscentes ou indeiscentes; sementes com endosperma ruminado (PONTES et al., 2004). A Figura 7 apresenta as folhas da *Annona muricata* (Annonaceae).



**Figura 7** - Folhas de *Annona muricata* L.

Fonte: <http://ervasearomas.blogspot.com/2009/11/graviola-folhas.html>

Na medicina popular, todas as partes da árvore de *A. muricata* podem ser utilizadas, conferindo diferentes propriedades e usos, como no tratamento da gripe, tosse, doenças parasitárias e problemas digestivos (DE FEO, 1992).

A *Annona muricata* L. é rica em compostos bioativos que apresentam atividades antitumoral, antifúngica, antiviral e de inibição de enzimas, cujas funções estão intimamente relacionadas com a conformação molecular destes ciclopeptídeos (WU et al., 2007); além de outras atividades como antibacteriana, antiparasitária, antiespasmódica, citotóxica, hipotensiva, vasodilatadora (DE CARVALHO et al., 2000) e pesticida (KIM et al., 1998; ABDULLAH; SINA, 2003).

No fruto da *A. muricata* são encontrados açúcares, taninos, ácido ascórbico (vitamina C), pectinas e vitaminas A (beta-caroteno) e do complexo B. O óleo obtido do fruto contém ésteres e compostos nitrogenados como as substâncias responsáveis pelo aroma. Estudos fitoquímicos revelam que as folhas contêm até 1,8% de óleo essencial rico em gama-cadineno e alfa-elemeno (LORENZI; MATOS, 2002). Foram identificados como componentes voláteis liberados pelos frutos da graviola três ésteres: hexanoato de metila, 2-hexenoato de metila e 2-hexenoato de etila (SILVA et al., 1997). Nas folhas, casca e raiz, estudos demonstraram a presença de diversos alcalóides como reticulinas, coreximina, coclarina e anomurina. Nas sementes são encontrados ciclopeptídeos como anomuricatina B (LI et al., 1998), hexapeptídeos cíclicos como anomuricatina A (WU et al., 2007) e C (WÉLÉ et al., 2004) e diversas acetogeninas que também são encontradas nas folhas, casca e raízes (LORENZI; MATOS, 2002).

Suas sementes são usadas com função emética e adstringente, e suas cascas como antidiabéticas e espasmo-líticas (LORENZI; MATOS, 2002). A lectina, uma glicoproteína isolada das sementes da *A. muricata*, é capaz de aglutinar eritrócitos humanos e inibir o crescimento de alguns fungos, como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum musae* (DAMICO et al., 2003). As flores e também as folhas são utilizadas para tosse e problemas no trato respiratório inferior (MORS et al., 2000).

As folhas de *A. muricata* são utilizadas na medicina popular por possuírem ações parasiticida, anti-reumática, antinevrálgica, adstringente e emética (DE CARVALHO et al., 2000). O chá das folhas de graviola é utilizado como sedativo, expectorante e broncodilatador. Emprega-se a fruta na indústria alimentícia para a elaboração de sucos, sorvetes e doces (MAUL et al., 2000).

Um estudo com extrato etanólico de folhas de *Annona muricata* mostrou possuir uma potente atividade antioxidante *in vitro*, conferindo um importante papel na captação de radicais livres, aumentando o seu efeito terapêutico (BASKAR et al., 2007).

O extrato da *A. muricata* foi capaz de produzir supressão dose-dependente no crescimento de colônias de precursores hematopoéticos para granulócitos/macrófagos, o que permite sugerir que a *A. muricata* possui potencial mielotóxico *in vitro* (MINAMI et al., 2004). São principalmente as acetogeninas que possuem este potencial antineoplásico (LI et al., 2001). As acetogeninas, muricoreacina e murihexocina C, ambas isoladas das folhas, mostraram-se citotóxicas contra adenocarcinoma de próstata. A murihexocina C também revelou citotoxicidade contra o carcinoma pancreático (KIM et al., 1998). Já as acetogeninas anocatacina A, anocatacina B (CHANG et al., 2003), anocatalina, muricina I (LIAW et al., 2002), muricinas (A-G), longifolicina, corossolina, corosso-na e uma mistura de muricatetrocina A e B (CHANG; WU, 2001) apresentaram citotoxicidade seletiva *in vitro* frente ao hepatoma celular humano (CHANG et al., 2003; LIAW et al., 2002; CHANG; WU, 2001).

Extratos etanólicos das folhas de *Annona muricata* foram testados com o caramujo *Biomphalaria glabrata* adulto e sua desova. A atividade moluscicida apresentada pelo extrato foi bastante significativa, com DL50 11,86 (DE CARVALHO et al., 2000; DOS SANTOS et al., 1998) e de DL90 inferior a 20 ppm para o molusco

adulto, indicando a faixa de atividade dentro do preconizado pelas normas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995) (DOS SANTOS et al., 2000). Esta atividade foi devida as acetogeninas: anonacina (90 %), isoanonacina (6%) e goniotalamicina (4%) encontradas no extrato (LUNA et al., 2006). O extrato etanólico bruto das folhas de *Annona muricata* também se revelou tóxico para larvas do mosquito *Aedes aegypti* (LUNA et al., 2003) e efetiva nos bioensaios com larvas de *Artemia salina* (LUNA et al., 2006; LUNA et al., 2003).

Porém, na cidade de Guadalupe (México), dados epidemiológicos e pesquisas experimentais têm associado um tipo de Parkinsonismo com o fruto e chás das folhas de *A. muricata*, o que sugeriu perda neuronal (CHAMPY et al., 2004; CAPARROS-LEFEBVRE e STEELE, 2005).

O amplo emprego desta planta nas práticas caseiras da medicina popular assim como seus resultados positivos, além de grande disponibilidade de material no Brasil, são motivos suficientes para a escolha desta, como tema de estudos químicos, farmacológicos e clínicos mais aprofundados, visando sua validação como possível imunomodulador.



### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil fitoquímico, o potencial antioxidante *in vitro*, o efeito toxicológico e a atividade imunomoduladora *in vivo* dos extratos de folha de gravioleira (*Annona muricata* L.).

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil fitoquímico dos extratos etanólico e hexânico da folha de gravioleira;
- Determinar o potencial antioxidante total *in vitro* dos extratos etanólico e hexânico da folha de *A. muricata*;
- Avaliar o efeito toxicológico *in vivo* dos extratos etanólico e hexânico da folha de gravioleira;
- Estudar a atividade imunomoduladora *in vivo* dos extratos etanólico e hexânico da folha de gravioleira em animais imunizados com ovalbumina;

## **4. MATERIAL**

---

### **4.1. ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas com idade entre 7 e 8 semanas e ratos albinos *Wistar* machos com idade entre 6 e 8 meses, todos oriundos 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 caixas plásticas sob condições adequadas de luz e temperatura, recebendo ração e água à vontade.

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA) da UFC sob o protocolo de Nº 16/10. Os animais foram manipulados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro e Experimentação Animal (COBEA).

### **4.2. MATERIAL VEGETAL**

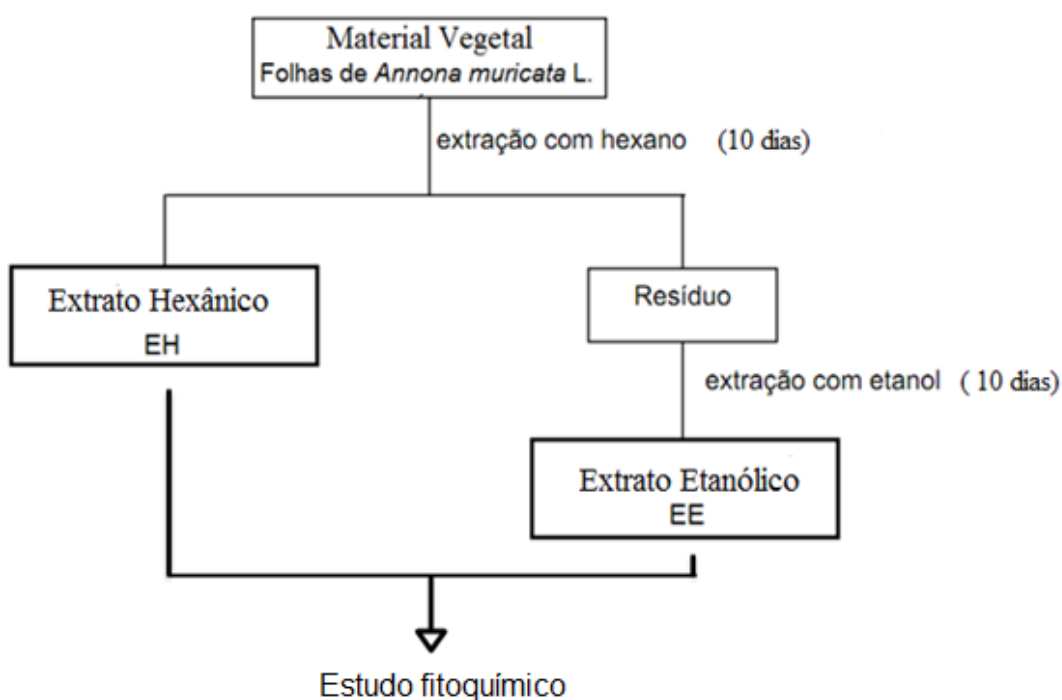
Foram utilizadas folhas de gravioleira (*Annona muricata* L.) colhidas no mês de agosto de 2009, no município de Trairi, Ceará, Lagoa das Flores na Frutagro Frutas Agroindustrial LTDA a 50 km de Fortaleza, Ceará. A identificação botânica da folha foi realizada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento 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 hexânico e etanólico pelo Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC).

## 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 (1997). 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 que 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 posterior estudo fitoquímico também de acordo com a metodologia descrita por Matos (1997).



**Figura 8** - Fluxograma geral de obtenção dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata* L.

## **5.2. ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE GRAVIOLEIRA**

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

Um grama de cada extrato foi diluído em 200 mL de solução hidroalcoólica a 70%. Cada solução foi dividida em porções de 4 mL colocadas em 6 tubos de ensaio numerados de 1 a 6 e duas porções de 10 mL colocados em béqueres rotulados previamente. Os béqueres foram submetidos a banho-maria até a secagem e mantidos em dessecador até o seu uso. O restante dos extratos foi concentrado em banho-maria até a obtenção de metade do volume, o pH foi ajustado para 4 e o líquido obtido filtrado e reservado para a detecção de alcalóides.

#### **5.2.1.1. Determinação de Fenóis**

Para a avaliação da presença de fenóis, foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico 1 N ao tubo 1 e o mesmo foi agitado. A mudança de coloração para azul ou vermelho indicaria a presença de fenóis.

#### **5.2.1.2. Determinação de Antocianidinas, Antocianinas e Flavonóides**

Para verificar a presença de antocianidinas, antocianinas e flavonóides, o tubo 2 foi acidulado a pH 3 e os tubos 3 e 4 alcalinizados a pH 8,5 e 11, respectivamente. A observação de mudança de coloração, no meio alcalino (pH 11- tubo 4) para vermelho-laranja, indicaria possível presença de flavononóides, enquanto a presença de antocianidinas e antocianinas foram indicadas pela mudança de coloração para vermelho em meio ácido (tubo 2), lilás no meio alcalino (pH 8,5- tubo 3) e azul em pH 11 (tubo 4).

### **5.2.1.3. Determinação de Catequinas**

Para verificar a presença de catequinas o tubo 5 foi acidulado pela adição de ácido clorídrico a pH 2 e aquecido em uma lâmpada de álcool por 3 minutos. A mudança de coloração para pardo-amarelado determinaria a presença de catequinas.

### **5.2.1.4. Determinação de Flavonóis, Flavononas, Flavonóis e Xantonas**

Para a detecção de flavonóis, flavononas, flavonóis e xantonas, adicionou-se 0,5 g de magnésio granulado e 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado ao tubo 6, após o término da reação, a visualização da mudança de coloração para vermelho indicaria presença de tais compostos.

### **5.2.1.5. Determinação de Esteróides e Triterpenóides**

A presença ou ausência de esteróides e triterpenóides foi determinada da seguinte forma: o resíduo seco oriundo do tubo 6 foi extraído com 2 mL de clorofórmio, formando uma solução que, em seguida, foi filtrada em um funil fechado com um fragmento de algodão, coberto com 100 mg de sulfato de sódio anidro. O algodão embebido em sulfato de sódio foi colocado em um tubo de ensaio e a este, adicionado 1 mL de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A mudança de coloração da solução de azul evanescente para verde permanente indicaria presença de esteróides livres, enquanto a mudança de coloração para parda indicaria presença de triterpenóides.

### **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 água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. O líquido obtido em seguida foi agitado por 3 minutos e a formação de espuma indicaria a presença ou não de saponinas.

### 5.2.1.7. Determinação de Alcalóides

A presença ou ausência de alcalóides foi determinada adicionando hidróxido de amônio a 26 mL do extrato concentrado e com pH 4, elevando-se o pH para 11 e as bases orgânicas extraídas através de três lavagens sucessivas de 30, 20 e 10 mL de uma solução éter-clorofórmio (3:1). A solução, posteriormente, foi filtrada em funil de separação, obtendo-se a fração orgânica e aquosa (esta última foi desprezada). A fração orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e filtrada. As frações orgânicas foram novamente extraídas com 10, 5 e 3 mL de ácido clorídrico diluído (0,01 M), obtendo-se uma fração orgânica que, posteriormente, foi desprezada e a solução aquosa ácida obtida dividida em três tubos de ensaios. A cada tubo foram adicionadas 3 gotas de reagentes de precipitação de alcalóides Mayer, Hager e Dragendorff, respectivamente, e a visualização de precipitado floculoso em pelo menos dois tubos indicaria a presença de alcalóides.

### 5.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A análise de atividade antioxidante total foi realizada por ensaio com 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Para cada amostra de extrato, foi testada uma concentração de 10 mg/mL. O método varredor de radical livre DPPH, uma das técnicas propostas por Bonted et al. (1987), é uma técnica simples e precisa para avaliar a atividade antioxidante. Neste método a eficiência antioxidante é mensurada à temperatura ambiente, eliminando o risco de degeneração térmica das moléculas testadas.

Nesta técnica, uma solução fortemente corada de um radical livre foi tratada com uma solução do composto químico. Em um tubo de ensaio, colocou-se 3,9 mL de uma solução do radical livre DPPH a  $6,5 \times 10^{-5}$  M em metanol. Em seguida foi adicionado ao tubo 0,1 mL da solução metanólica do extrato (5, 10, 100, 1000 ou 10.000 ppm) e a absorbância medida a 515 nm, que é o comprimento de onda ao qual o DPPH apresenta absorbância máxima, foi determinada por espectrofotometria no intervalo de 0 a 60 minutos.

O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como índice de varredura de radicais livres (IV%) e comparados ao antioxidante padrão BHT. Os

resultados foram considerados positivos quando houve decréscimo da absorbância ao longo do tempo (YEPÉZ et al., 2002).

## 5.4. ESTUDO TOXICOLÓGICO

### 5.4.1. Avaliação da toxicidade subcrônica dos extratos.

Para avaliação de possíveis efeitos tóxicos dos EH e EE das folhas de gravioleira, foram utilizados 49 animais divididos em sete grupos experimentais (n=7). Os animais receberam 0,2 mL dos extratos hexânico (EH) e etanólico (EE), nas doses de 10, 100 e 1000 mg.Kg<sup>-1</sup> em dose única diária, através de sonda orogástrica, durante 30 dias consecutivos de acordo com o seguinte protocolo:

Grupo 1: animais que receberam DMSO a 5% e salina fisiológica; Grupo 2: animais que receberam EE 10 mg.Kg<sup>-1</sup> diluídos em DMSO a 5% e salina fisiológica (dose 1); Grupo 3: animais que receberam EE 100 mg.Kg<sup>-1</sup> diluídos em DMSO a 5% em salina fisiológica (dose 2); Grupo 4: animais que receberam EE 1000 mg.Kg<sup>-1</sup> diluídos em DMSO a 5% em salina fisiológica (dose 3); Grupo 5: animais que receberam EH 10 mg.Kg<sup>-1</sup> diluídos em DMSO a 5% em salina fisiológica (dose 1); Grupo 6: animais que receberam EH 100 mg.Kg<sup>-1</sup> diluídos em DMSO a 5% em salina fisiológica (dose 2); Grupo 7: animais que receberam EH 1000 mg.Kg<sup>-1</sup> diluídos em DMSO a 5% em salina fisiológica (dose 3)

Os animais foram observados diariamente após a administração dos extratos. Durante o tratamento, a massa corporal dos animais foi registrada semanalmente e os animais avaliados quanto a sinais clínicos de toxicidade. O exame clínico destes animais foi baseado na observação das frequências respiratória e cardíaca; mudanças comportamentais e parâmetros como: diarreia, analgesia, contorções, sialorréia, apatia, lacrimejamento, pêlo eriçado, entre outros. No último dia (30º dia), os animais foram pesados, amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro orbital e, em seguida, os animais foram eutanasiados com halotano e necropsiados para observação macroscópica, e retirada do timo, do baço e do fígado, para serem pesados. O peso relativo de cada órgão foi calculado pela razão entre o peso do órgão (g) e o peso do

animal (g) e comparado ao grupo controle (salina + 5%DMSO). O estômago dos animais também foi removido para avaliação macroscópica da possível presença de úlceras (SANTUCCI et al., 1994).

Foram realizadas dosagens de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) através de ensaios bioquímicos. Para tanto, foram utilizados os soros dos animais de cada grupo teste e de cada grupo controle. Os resultados foram expressos em unidades internacionais (UI). Todas as dosagens foram realizadas utilizando-se “Kits” comerciais e metodologias específicas conforme fabricante, avaliados em espectrofotômetro.

## **5.5. ESTUDO DO EFEITO IMUNOMODULADOR *IN VIVO***

### **5.5.1. Antígenos e adjuvantes**

Foi utilizado como antígeno padrão a ovalbumina (OVA, grau V, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA); e como adjuvantes: o adjuvante completo (CFA, Sigma®) e incompleto (IFA, Sigma®) de Freund.

### **5.5.2. Esquema de imunização com Ovalbumina**

Camundongos *Swiss* fêmeas foram divididos em 12 grupos (n=8) e imunizados por via subcutânea (via sc) com o antígeno OVA (10 µg). O sangue foi coletado através do plexo retro orbital com o auxílio de pipetas Pauster, nos dias 0 antes da imunização e durante o tratamento nos dias 07, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a imunização e centrifugados para obtenção de soro.

O sangue coletado foi colocado em tubos sem anticoagulante permanecendo em repouso por 2 h à temperatura ambiente para retração do coágulo. Após esse tempo, o soro foi separado do coágulo por centrifugação a 5.000 r.p.m por 10 minutos, obtendo-se o soro límpido livre de hemácias, sendo esse devidamente identificado e armazenado a -20°C para posterior análise da presença de anticorpos específicos para OVA. Após a



coleta de sangue nos dias 14 e 28, foi feito um reforço em todos os camundongos com 10 µg de OVA por via subcutânea nas mesmas condições da imunização inicial.

### **5.5.3. Esquema de tratamento**

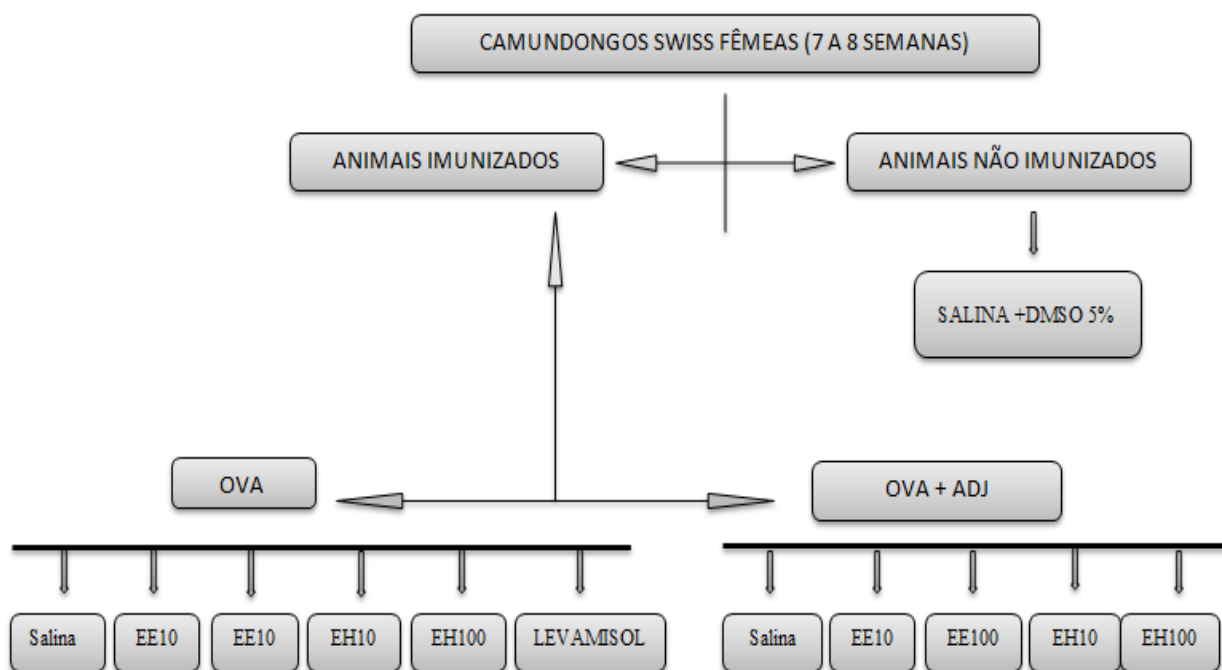
#### **5.5.3.1. Para avaliação do efeito imunomodulador**

Os animais foram divididos em 12 grupos (n=8) recebendo os seguintes tratamentos:

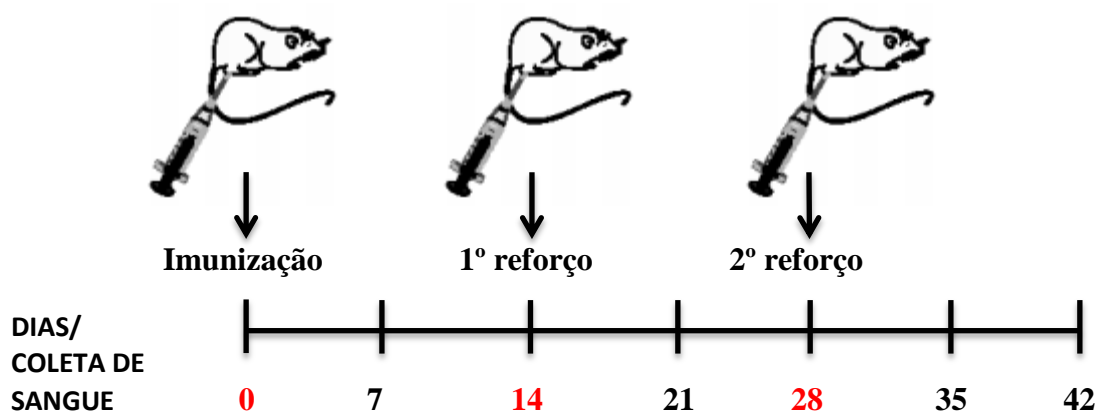
Grupo 1: Animais que receberam o veículo (salina em DMSO 5%) via oral + solução salina 0,9% via s.c (controle negativo); Grupo 2: Animais que foram imunizados com OVA 10 µg por via s.c (controle positivo); Grupo 3: Animais tratados com Levamisol<sup>®</sup> por via oral + OVA 10 µg por via s.c ; Grupo 4: Animais que receberam o EE 10 mg/Kg por via oral durante 42 dias + OVA 10 µg por via sc; Grupo 5: Animais que receberam EE 100 mg/Kg por via oral durante 42 dias + OVA 10 µg por via sc; Grupo 6: Animais que receberam EH 10 mg/Kg por via oral durante 42 dias + OVA 10 µg por via sc; Grupo 7: Animais que receberam EH 100 mg/Kg por via oral durante 42 dias + OVA 10 µg por via sc; Grupo 8: Animais que receberam OVA em adjuvante; Grupo 9: Animais que receberam EE 10 mg/Kg por via oral durante 42 dias + OVA 10 µg + Adjuvante por via sc; Grupo 10: Animais que receberam EE 100 mg/Kg por via oral durante 42 dias + OVA 10 µg + Adjuvante por via sc; Grupo 11: Animais que receberam EH 10 mg/Kg por via oral durante 42 dias + OVA 10 µg + Adjuvante por via sc; Grupo 12: Animais que receberam EH 100 mg/Kg por via oral durante 42 dias + OVA 10 µg + Adjuvante por via sc.

Os tratamentos à base dos extratos hexânico (EH) e etanólico (EE) foram realizados diariamente durante 42 dias por via oral em volume de 0,2 mL de solução com salina e DMSO a 5%. Os animais dos grupos que foram imunizados com OVA receberam injeção subcutânea da mesma na dose de 10 µg nos dia 0 antes do tratamento e dois reforços com 14 e 28 dias.

Já o Levamisol<sup>®</sup> na dose de 10 mg/ Kg de animal foi usado como droga imunoestimulante de referência, sendo este, administrado todos os dias durante os 42 dias por via oral. O adjuvante completo de Freund foi utilizado apenas na primeira imunização e o incompleto administrado nos dois reforços.



**Figura 9** - Fluxograma geral do protocolo de imunomodulação



**Figura 10** - Desenho esquemático: coleta de sangue, imunização e reforços.

## **5.5.4. Avaliação da Resposta Imune Humoral**

### **5.5.4.1. Titulação de anticorpos pelo método de ELISA**

Os títulos de anticorpos anti-OVA foram determinados no soro através de técnica imunoenzimática “enzyme-linked immunosorbent assay”- ELISA (BALKWILL, 2000).

As placas com 96 poços foram sensibilizadas com OVA (40 ug de proteína/ml) e incubadas à 4°C por 18 h. Após o período de aderência do antígeno à placa, foi feita a lavagem dos poços (5 vezes) com PBS-Tween-20 0,05%. As placas foram bloqueadas com PBS-Molico 5% envolvidas com papel parafilm, incubadas à 37°C por 60 minutos; e posteriormente lavadas (5 vezes) com PBS-Tween 20 0,05%. As placas foram então incubadas com diluições dos soros à 4°C por 24 h utilizando-se os seguintes controles: soro de título previamente determinado (controle positivo), soro sem anticorpos específicos (controle negativo) e solução bloqueadora (branco). Após o período de reação, foi feita nova lavagem, como descrito anteriormente. As placas foram incubadas com o anti-soro contra anticorpos de camundongos conjugado com peroxidase, na diluição de 1:1000 a 37°C por 60 minutos, seguindo-se nova lavagem. Adicionou-se então o substrato cromógeno o- Phenylenediemine Dihydrochloride (OPD), deixando-se as placas envolvidas com papel alumínio a 25 °C por 30 minutos, sendo a reação interrompida com 20 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a absorbância a 492 nm, determinada em leitor de microplacas de ELISA (leitora automática modelo 680 Microplate Reader, Bio-Rad® Laboratories). Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão da absorbância obtida a partir dos soros diluídos 5000 vezes.

### **5.5.4.2. Reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA)**

O método utilizado para as reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA) foi descrito por OVARY (1952) e modificado por MOTA & WONG (1969).

Os títulos de PCA correspondem ao inverso da diluição máxima capaz de

provocar uma reação cutânea, e foram expressos como o logaritmo na base 2 do inverso da diluição máxima ( $D_{\max}$ ) do soro capaz de dar uma reação positiva.

Título de PCA:  $\text{Log}_2 1/D_{\max}$ .

#### **5.5.4.2.1. Reações de anafilaxia cutânea passiva para IgE em Ratos**

Os testes para a determinação qualitativa e quantitativa de IgE foram feitos em ratos albinos Wistar machos adultos com idade entre 6 a 8 meses. A pele da região dorsal dos animais, sob leve anestesia com éter, foi raspada, e as diluições dos soros foram injetadas intradermicamente em pontos previamente marcados, em alíquotas de 0,1 mL de modo a obter uma pequena pápula. Após 18 horas, foi injetado por via endovenosa, no pênis do animal, uma suspensão do antígeno específico para o anticorpo em solução de azul de Evans 0,5%. A quantidade de antígeno utilizada para desencadear PCA foi de 1 mg de OVA. Os ratos foram sacrificados 30 minutos depois e a pele dissecada para leitura da reação, feita através das manchas azuladas, provocadas pelo extravasamento do corante nos sítios, onde foram injetadas as diluições dos soros contendo anticorpos posteriormente detectados.

### **5.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Para a realização da análise estatística dos dados os resultados foram expressos com a média  $\pm$  desvio padrão. Para comparar os dados entre e dentro dos grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunns. As diferenças foram consideradas significativas com um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

---

### 6.1. Caracterização fitoquímica dos extratos da folha de *Annona muricata* .

A tabela 1 mostra a caracterização fitoquímica dos extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata* L. O perfil fitoquímico indicou a presença de taninos, catequinas, saponinas e esteróides quando a extração obtida das folhas foi efetuada em presença de etanol. Já para o extrato hexânico das mesmas folhas foi detectada a presença unicamente de esteróides.

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

Classes de compostos secundários analisados	Extrato etanólico / Extrato hexânico	
Fenóis	-	-
Taninos	+	-
Antocianinas e Antocianidinas	-	-
Catequinas	+	-
Flavonóis, Flavononas. Flavononóis e Flavonóides	-	-
Xantonas	-	-
Esteróides	+	+
Triterpenóides	-	-
Saponinas	+	-
Quinonas	-	-
Antranóis	-	-
Cumarinas	-	-
Alcalóides	-	-

---

(+) Presença e (-) Ausência

## 6.2. Determinação da atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Annona muricata* L.

A tabela 2 apresenta os resultados da atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Annona muricata* L. *in vitro* pelo método de varredura do radical livre DPPH. Os extratos etanólico e hexânico (10 mg/ml) das folhas de *A. muricata* apresentaram índices de varredura de 79,27 e 40,44% respectivamente. O grupo controle positivo BHT apresentou o maior índice de varredura (91,90%) e conseqüentemente maior capacidade antioxidante. O índice de varredura do extrato etanólico é aproximadamente duas vezes maior que o do extrato hexânico. Portanto, o extrato etanólico apresenta maior atividade antioxidante quando comparada a do extrato hexânico.

**Tabela 2** - Determinação da atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Annona muricata* L. *in vitro* pelo método de varredura do radical livre DPPH.

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO ( mg/mL)	INDICE DE VARREDURA(%)
EE	10	79,27
EH	10	40,44
BHT	10	91,90

## 6.3. Avaliação da toxicidade subcrônica dos extratos de folhas de *Annona muricata* L.

Para avaliar a toxicidade subcrônica os extratos etanólico e hexânico foram administrados nos camundongos por via oral, diariamente por 30 dias consecutivos, nas doses 10, 100 e 1000 mg/Kg e distintos parâmetros comportamentais e fisiológicos tais como frequências respiratória e cardíaca, diarreia, lacrimejamento, sialorréia, eriçamento de pelos, peso, mortalidade, peso relativo dos órgãos, avaliação macroscópica dos estômagos e avaliação de parâmetros sanguíneos foram observados.

Os animais não apresentaram mudanças comportamentais significativas no tocante a agitação, apatia etc. Igualmente, não se detectou alterações fisiológicas comprometendo peso (Tabela 3) e os animais não apresentaram diarreia, lacrimejamento, sialorréia e eriçamento dos pêlos. Como pode ser observado na tabela 3 não houve morte de animais e nenhum sintoma tóxico foi detectado.

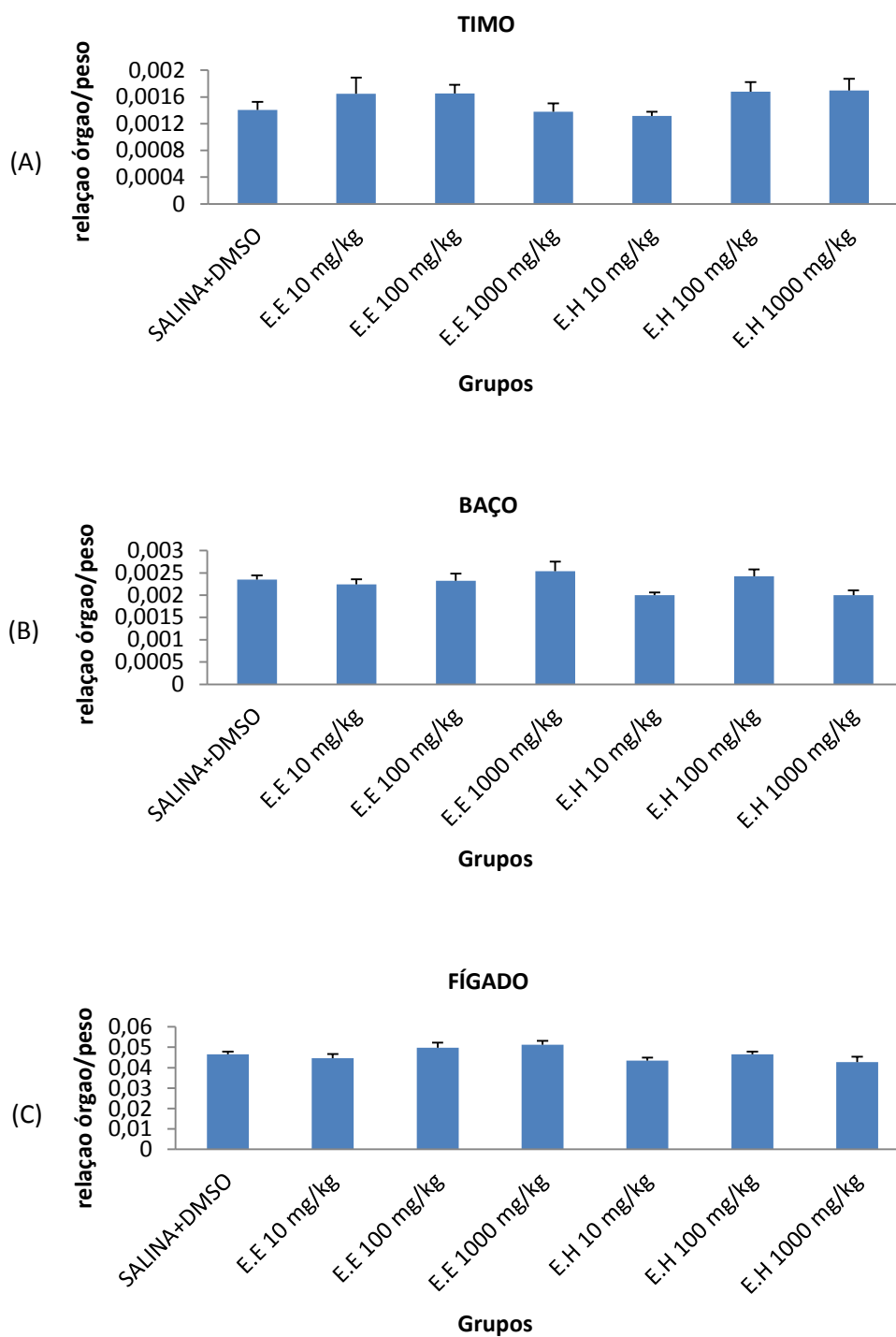
**Tabela 3** - Avaliação da toxicidade subcrônica dos extratos de folhas de *Annona muricata* L.

Tratamentos	Mortalidade	Peso (g)		Sintomas tóxicos
		Dia 0	Dia 30	
Salina + DMSO 5%	0/7	29,2 ± 2,02	30,18 ± 2,52	Nenhum
EE 10 mg/Kg	0/7	28,9 ± 1,88	30,94 ± 1,69	Nenhum
EE 100 mg/Kg	0/7	28,65 ± 1,54	30,42 ± 1,34	Nenhum
EE 1000 mg/Kg	0/7	28,48 ± 1,69	31,45 ± 1,94	Nenhum
EH 10 mg/Kg	0/7	27,41 ± 2,28	30,08 ± 3,21	Nenhum
EH 100 mg/Kg	0/7	30,1 ± 2,92	31,88 ± 2,67	Nenhum
EH 1000 mg/Kg	0/7	28,61 ± 1,92	31,34 ± 2,15	Nenhum

Dados apresentados como média ± desvio padrão

Após realização de necropsia não foram visualizadas alterações macroscópicas nos órgãos situados nas cavidades abdominal e torácica dos animais de nenhum grupo.

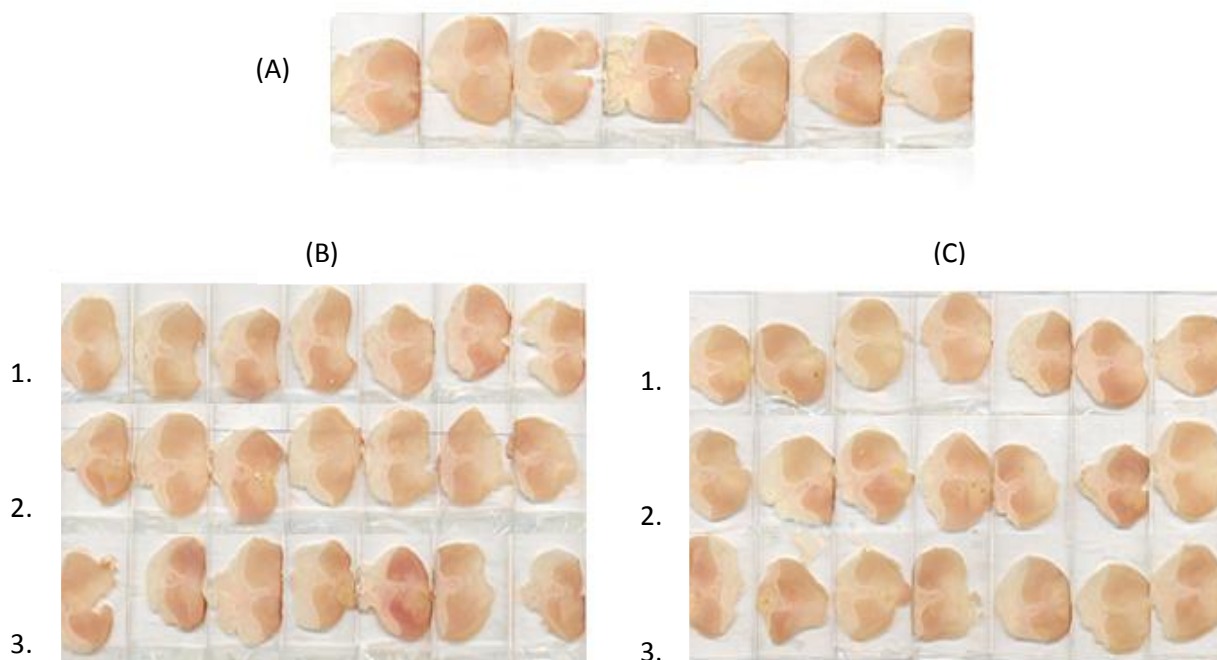
O efeito do tratamento dos EE e EH de *Annona muricata* L. por 30 dias sobre o peso relativo dos órgãos dos camundongos está mostrado na Fig. 11. Não foram observadas diferenças significativas entre os pesos relativos do timo (Fig. 11A), baço (Fig. 11B) e fígado (Fig. 11C) dos animais quando comparados ao controle.



**Figura 11** - Peso relativo do timo (A), baço (B) e fígado (C) de camundongos *Swiss* tratados com extratos etanólico e hexânico das folhas de *Annona muricata* L



A figura 12 mostra fotos dos estômagos de camundongos Swiss tratados ou não com os EE e EH das folhas de *Annona muricata* L. Não foram visualizadas alterações macroscópicas nos estômagos dos animais tratados com diferentes doses dos EE e EH quando comparados ao controle (Figura 12).



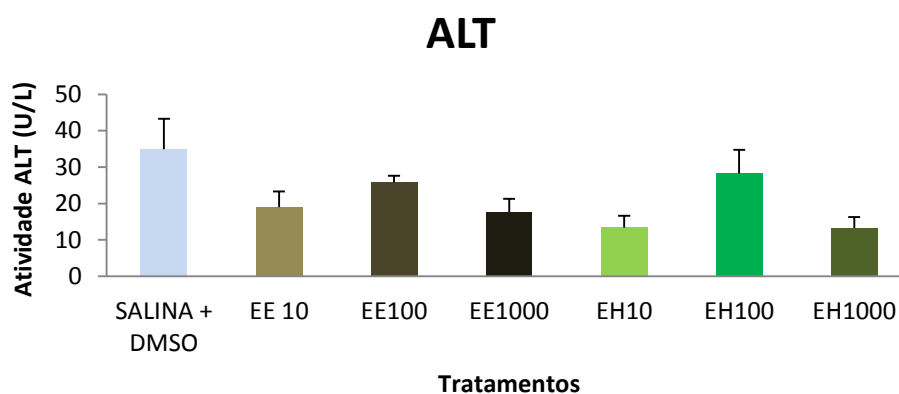
**Figura 12** - Avaliação macroscópica dos estômagos de camundongos Swiss tratados com os EE e EH das folhas de *Annona muricata* L. (A) Controle (Salina + DMSO 5%); (B) Tratamento com os EE nas concentrações 10 (B1), 100 (B2) e 1000 (B3) mg/Kg; (C) Tratamento com os EH nas concentrações 10 (C1), 100 (C2) e 1000 (C3) mg/Kg)

Os parâmetros séricos usados para avaliar danos hepáticos foram a quantificação das atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) apresentadas nas figuras 14 e 15 respectivamente.

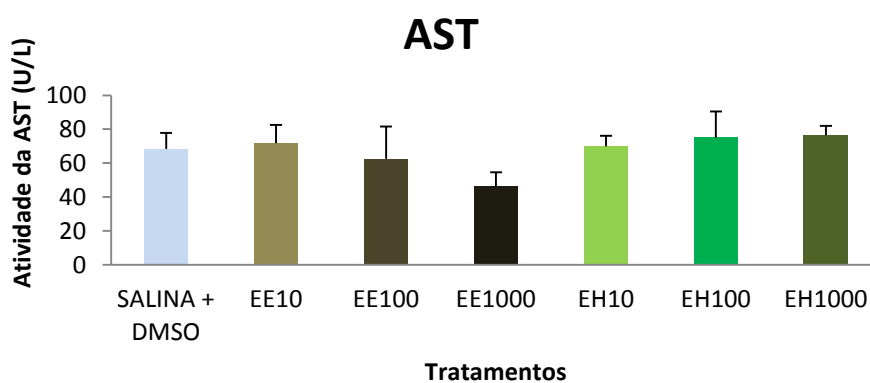
Os valores médios da atividade de ALT (n=7) para o grupo controle foi 34,92 U/L, para os grupos tratados com EE nas doses 10, 100 e 1000 mg/Kg foram 18,76; 25,87 e 17,71 U/L, respectivamente, enquanto para os grupos tratados com EH, com as mesmas doses, os valores obtidos foram 13,37; 28,24 e 13,25 para as respectivas

concentrações (Fig. 13). Os grupos tratados com os EE e EH em todas as doses estudadas (10, 100 e 1000 mg/Kg) obtiveram níveis séricos de ALT mais baixos comparados ao grupo controle, como mostrado na figura 13.

Os valores médios da atividade de AST (n=7) para o grupo controle foi 68,28 U/L e para os grupos tratados com EE nas doses 10, 100 e 1000 mg/Kg foram encontrados os valores médios de 71,71; 62,42 e 46,28 U/L, respectivamente, enquanto para os grupos tratados com EH, com as mesmas doses, os valores obtidos foram 69,83; 75 e 76,5 U/L para as respectivas concentrações (Fig. 14). Os níveis séricos encontrados para AST com EE (10mg/Kg) e EH (100 e 1000 mg/Kg) foram maiores que os valores do grupo controle 5,0; 9,8 e 12,0% respectivamente.



**Figura 13** - Atividade da ALT em soro de camundongos *Swiss* tratados ou não com os extratos etanólico (EE) e hexânico (EH) de folhas de *Annona muricata L.* nas doses 10, 100 e 1000 mg/kg.



**Figura 14** - Atividade da AST em soro de camundongos *Swiss* tratados ou não com os extratos etanólico (EE) e hexânico (EH) de folhas de *Annona muricata L.* nas doses 10, 100 e 1000 mg/kg.

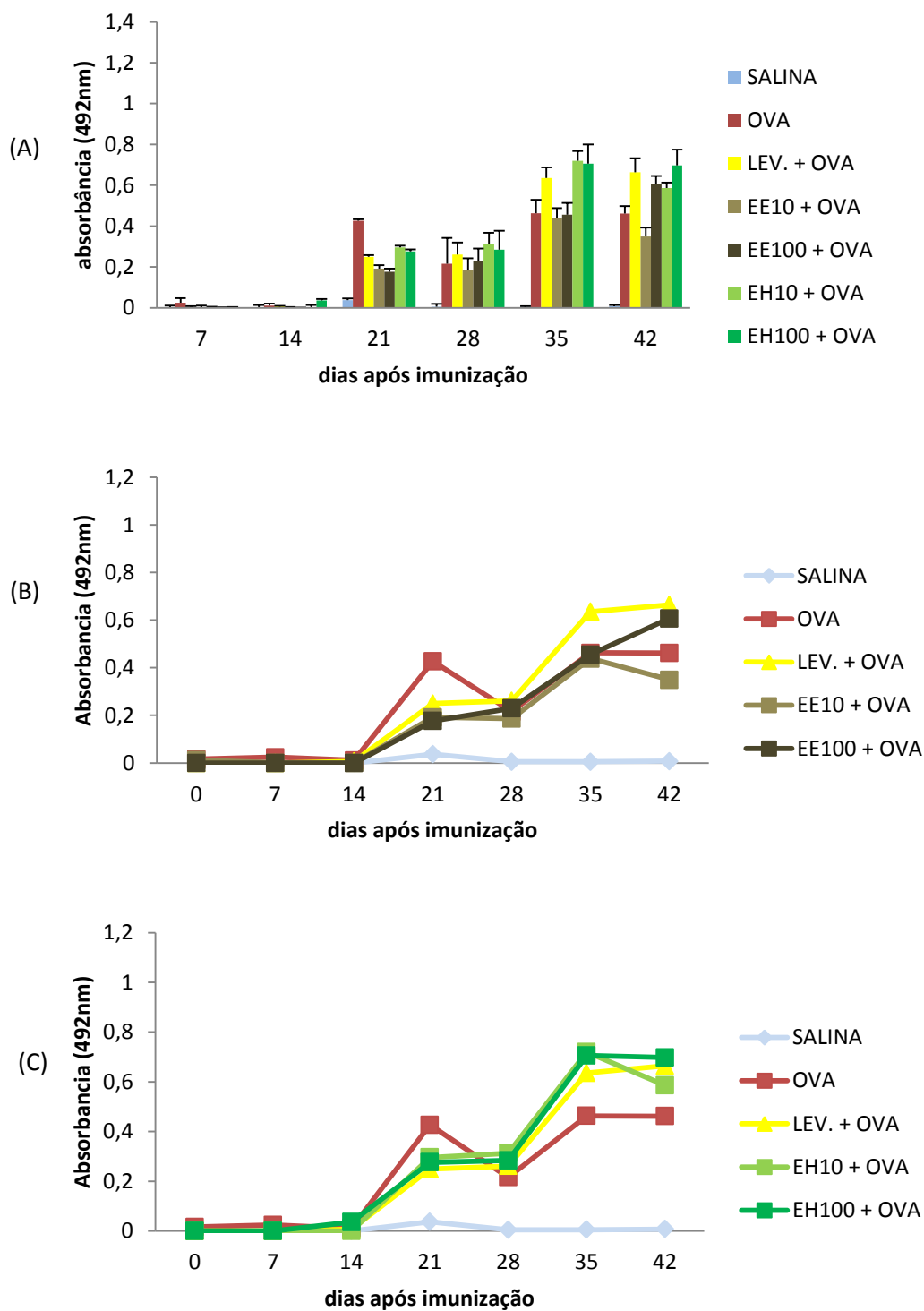
#### **6.4. Estudo do efeito dos EE e EH das folhas de *Annona muricata* L. na resposta imune de camundongos imunizados com ovalbumina por via s.c.**

##### **6.4.1. Efeito dos EE e EH das folhas de *Annona muricata* L. na produção de anticorpos anti-OVA (Ig totais)**

A figura 15 apresenta a cinética da síntese de anticorpos específicos anti-OVA, ao longo de 42 dias, após imunização com OVA por via s.c. Para a resposta primária, independente dos tratamentos, não se detectou por ELISA a presença de anticorpos anti-OVA. Após o primeiro reforço (14 dias) houve produção dos anticorpos anti-OVA em todos os tratamentos nos dias 21 e 28 após imunização e em seguida ao segundo reforço (28 dias) houve aumento na produção de anticorpos em todos os tratamentos.

O perfil cinético do grupo imunizado com OVA revelou um aumento com 21 dias superior aos demais grupos e uma queda com 28 dias que após o segundo reforço (28 dias) atingiu valores similares ao do 21º dia mantendo-se ao longo dos 42 dias. Para o grupo tratado com levamisol por via oral e imunizado com ovalbumina por via s.c. (LEV + OVA) detectou-se um aumento de anticorpos com 21 dias que se manteve até 28 dias e após o segundo reforço alcançou valores superiores a duas vezes aqueles detectados com 21 e 28 dias os quais foram mantidos (35 e 42 dias). O perfil cinético dos grupos tratados com EE (10 e 100 mg/Kg via o.) e imunizados com OVA via s.c. (EE 10 + OVA e EE 100 + OVA) revelou comportamentos similares ao do grupo LEV + OVA até 35 dias, com menores produções de anticorpos, divergindo com 42 dias em que o grupo EE 100 + OVA aumenta a produção de Ig anti-OVA alcançando valor semelhante ao do grupo LEV + OVA e o grupo EE 10 + OVA mostra uma diminuição na síntese de Ig anti-OVA, com valores próximos aos do grupo OVA.

O perfil cinético dos grupos tratados com EH (10 e 100 mg/Kg via o.) e imunizados com OVA via s.c. (EH 10 + OVA e EH 100 + OVA) revelou comportamentos similares ao do grupo LEV + OVA até 35 dias. Aos 42 dias o grupo EH 100 + OVA revelou uma produção de anticorpos idêntica ao do grupo LEV + OVA e superior a dos grupos OVA e EH 10 + OVA. Após 35 dias o grupo EH 10 + OVA apresentou uma diminuição nos níveis séricos de Ig anti-OVA mas ainda com produção superior a do grupo OVA.

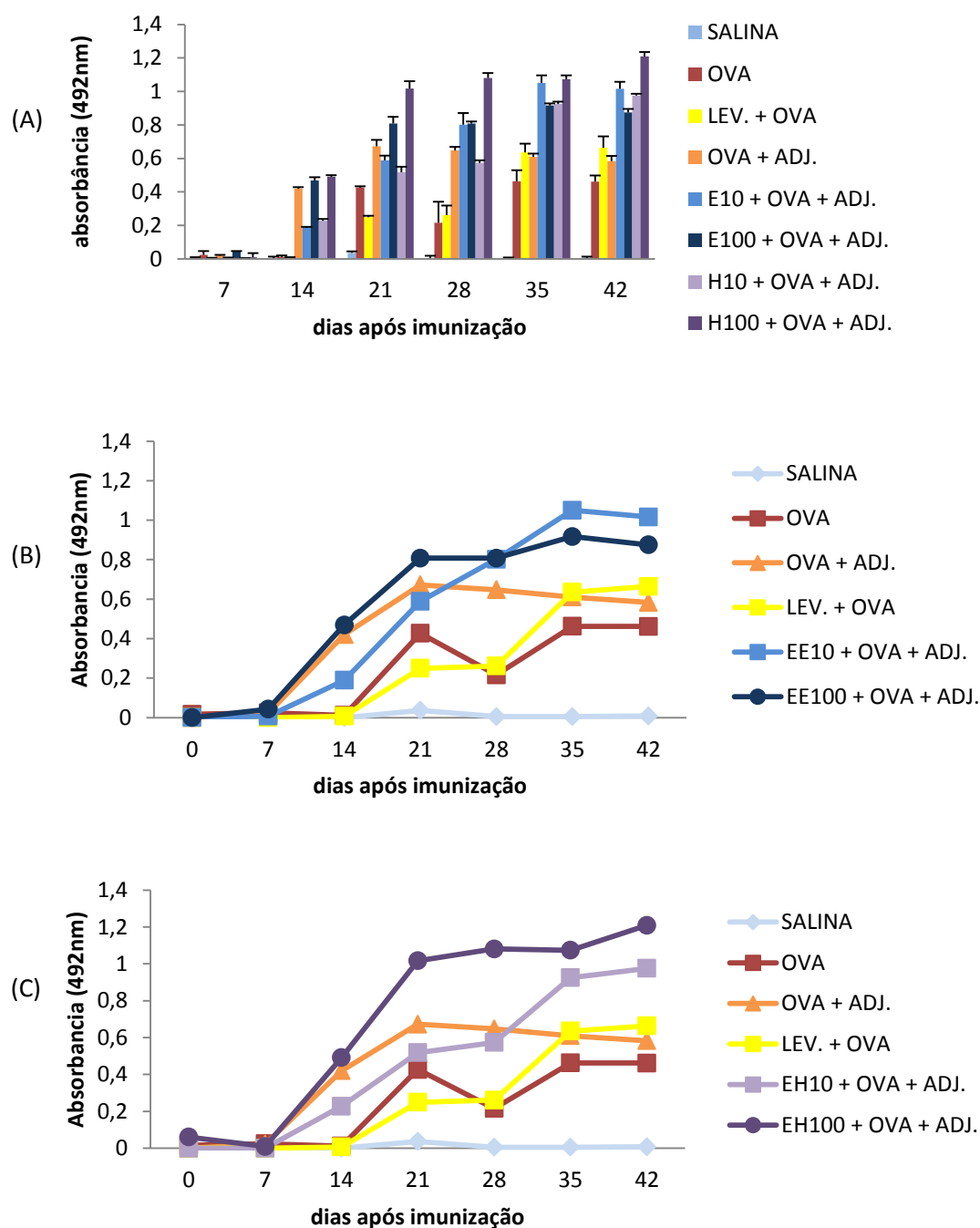


**Figura 15** – (A) Cinética da síntese de anticorpos específicos anti-OVA, ao longo de 42 dias, após imunização apenas com OVA por via s.c. (B) Somente EE nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA comparados com os controles e (C) Somente EH nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA comparados com os controles. Cada ponto (média  $\pm$  desvio padrão) corresponde à absorbância obtida a partir dos soros diluídos 5000 vezes analisados pelo método de ELISA.

A figura 16 apresenta a cinética da síntese de anticorpos específicos anti-OVA, ao longo de 42 dias, após imunização com OVA por via s.c. com ou sem adjuvante de Freund. Para a resposta primária até 7 dias, independente dos tratamentos, não se detectou por ELISA a presença de anticorpos anti-OVA. No entanto, no 14<sup>o</sup> dia para todos os grupos imunizados com OVA + ADJ detectou-se produção de anticorpos. Após o primeiro reforço (14 dias) houve aumento na produção dos anticorpos anti-OVA em todos os tratamentos e em seguida ao segundo reforço (28 dias) houve aumento na produção de anticorpos em todos os tratamentos exceto para o grupo OVA + ADJ.

Na figura 16 observa-se que o perfil cinético do grupo imunizado com OVA revelou um aumento com 21 dias superior aos demais grupos e uma queda com 28 dias que após o segundo reforço (28 dias) atingiu valores similares ao do 21<sup>o</sup> dia mantendo-se ao longo dos 42 dias. Para o grupo tratado com levamisol por via oral e imunizado com ovalbumina por via s.c. (LEV + OVA) detectou-se um aumento de anticorpos com 21 dias que se manteve até 28 dias e após o segundo reforço alcançou valores superiores a duas vezes aqueles detectados com 21 e 28 dias os quais foram mantidos (35 e 42 dias). A cinética de síntese de Ig anti-OVA para o grupo de animais imunizados com ovalbumina em adjuvante completo de Freund (OVA + ADJ) revelou síntese de anticorpos já aos 14 dias após imunização inicial, atingindo o valor máximo aos 21 dias e diminuindo a produção a partir de 28 dias. O perfil cinético dos grupos tratados com EE (10 e 100 mg/Kg via o.) e imunizados com OVA e adjuvante de Freund por via s.c. (EE 10 + OVA +ADJ e EE 100 + OVA +ADJ) revelou comportamentos similares ao do grupo OVA + ADJ até 21 dias, divergindo aos 28 dias em que a síntese de anticorpos continua aumentando para os grupos EE 10 + OVA +ADJ e EE 100 + OVA +ADJ e atinge valor máximo aos 35 dias e esses valores são superiores aos valores quantificados para o grupo OVA + ADJ no mesmo dia. O perfil cinético dos grupos tratados com EH (10 e 100 mg/Kg via o.) e imunizados com OVA e adjuvante de Freund via s.c. (EH 10 + OVA + ADJ e EH 100 + OVA +ADJ) revelou comportamentos similares ao do grupo OVA + ADJ até 21 dias, divergindo aos 28 dias em que a síntese de anticorpos continua aumentando para os grupos EH 10 + OVA + ADJ e EH 100 + OVA +ADJ ao longo dos 42 dias. No entanto, os valores quantificados para o grupo EH 100 + ADJ + OVA são superiores aos de todos os grupos testados. Ademais, quando se compara o grupo EH 100 + ADJ + OVA com os grupos OVA e LEV + OVA verifica-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos dias 35 e 42 respectivamente. Após 35 dias, os valores

quantificados para o grupo EH 10 + OVA +ADJ são superiores aos do grupo OVA + ADJ.



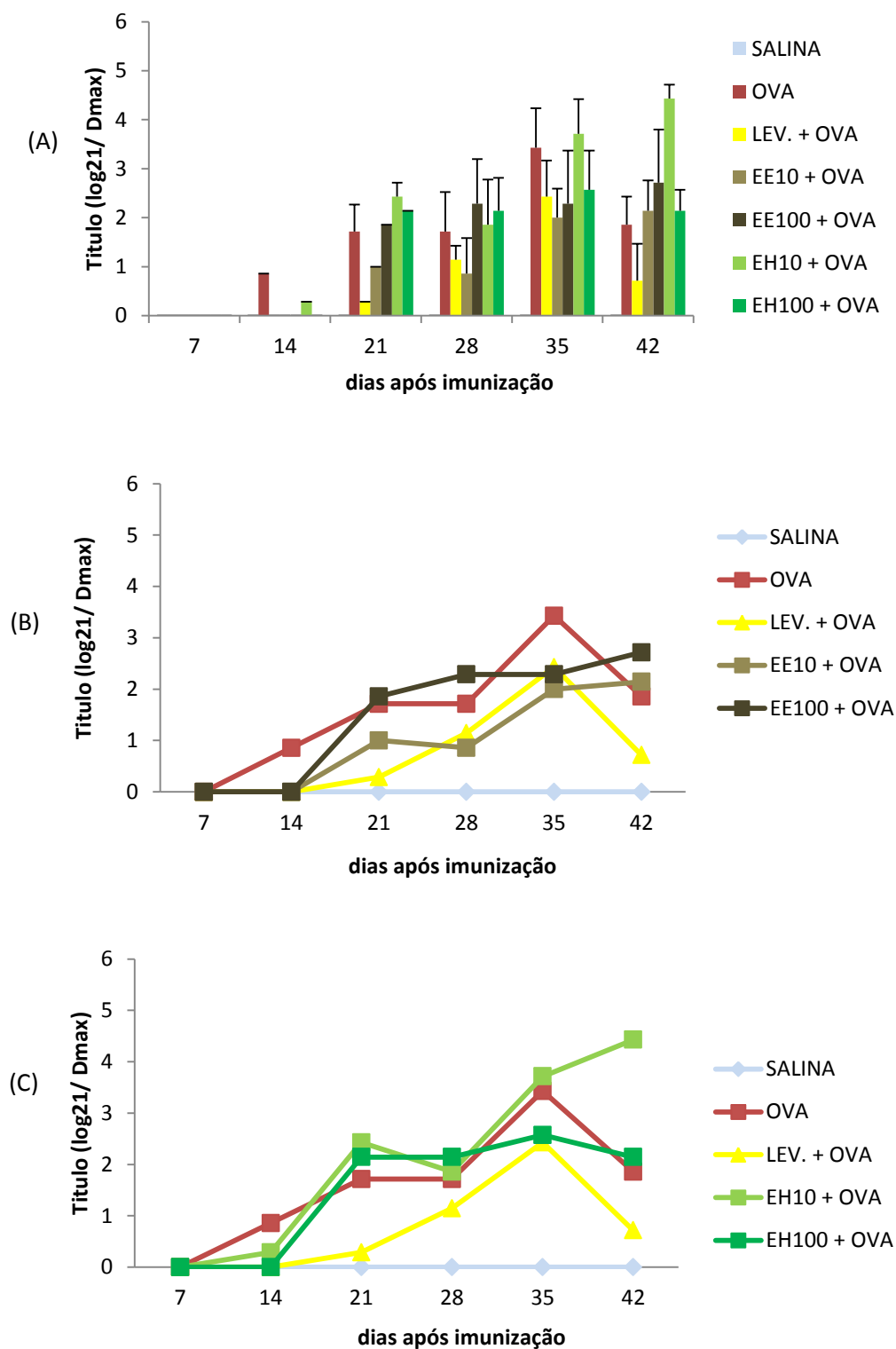
**Figura 16** – (A) Cinética da síntese de anticorpos específicos anti-OVA, ao longo de 42 dias, após imunização com OVA com ou sem adjuvante por via s.c. (B) Somente EE nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA + Adj. comparados com os controles e (C) Somente EH nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA + Adj. comparados com os controles. Cada ponto (média  $\pm$  desvio padrão) corresponde à absorbância obtida a partir dos soros diluídos 5000 vezes analisados pelo método de ELISA.

#### 6.4.2. Efeito dos EE e EH das folhas de *Annona muricata* L. na produção de anticorpos IgE anti-OVA

A figura 17 apresenta a cinética da síntese de isótipos IgE específicos anti-OVA, ao longo de 42 dias, após imunização com OVA por via s.c. Para a resposta primária detectou-se títulos de IgE inferiores a 1 para os grupos OVA e EH 10 + OVA e nenhuma síntese foi detectada para os demais grupos. Após o primeiro reforço (14 dias) houve produção de IgE anti-OVA em todos os tratamentos nos dias 21 e 28 após imunização e em seguida ao segundo reforço (28 dias) foi revelado um padrão de síntese de IgE diferente entre os grupos avaliados.

O perfil cinético do grupo imunizado com OVA já apresentou uma produção de IgE no 14º dia, superior aos demais grupos, atingindo um pico no 35º dia, quando em seguida, a produção de IgE declinou. Para o grupo tratado com levamisol por via oral e imunizado com ovalbumina por via s.c. (LEV + OVA) detectou-se títulos de IgE após 21 dias sendo alcançado um pico aos 35 com redução aos 42 dias. O perfil cinético exibido apresentou os menores valores de títulos de IgE quando comparados aos dos demais tratamentos, exceto para o grupo EE 10 + OVA (28º e 35º dias). O perfil cinético dos grupos tratados com EE (10 e 100 mg/Kg via o.) e imunizados com OVA via s.c. (EE 10 + OVA e EE 100 + OVA) revelou comportamento diferente dos grupos OVA e LEV + OVA. O grupo EE 10 + OVA aumenta ao longo dos 42 dias apresentando títulos de IgE menores que os dos demais grupos. Para o grupo EE 100 + OVA detecta-se síntese de IgE a partir dos 21 dias que se mantém ao cabo dos 42 dias.

O perfil cinético dos grupos tratados com EH (10 e 100 mg/Kg via o.) e imunizados com OVA via s.c. (EH 10 + OVA e EH 100 + OVA) revelou comportamentos similares até 28 dias, quando se diferenciam, com EH 10 + OVA duplicando o título de IgE aos 42 dias ao passo que o grupo EH 100 + OVA manteve-se constante.



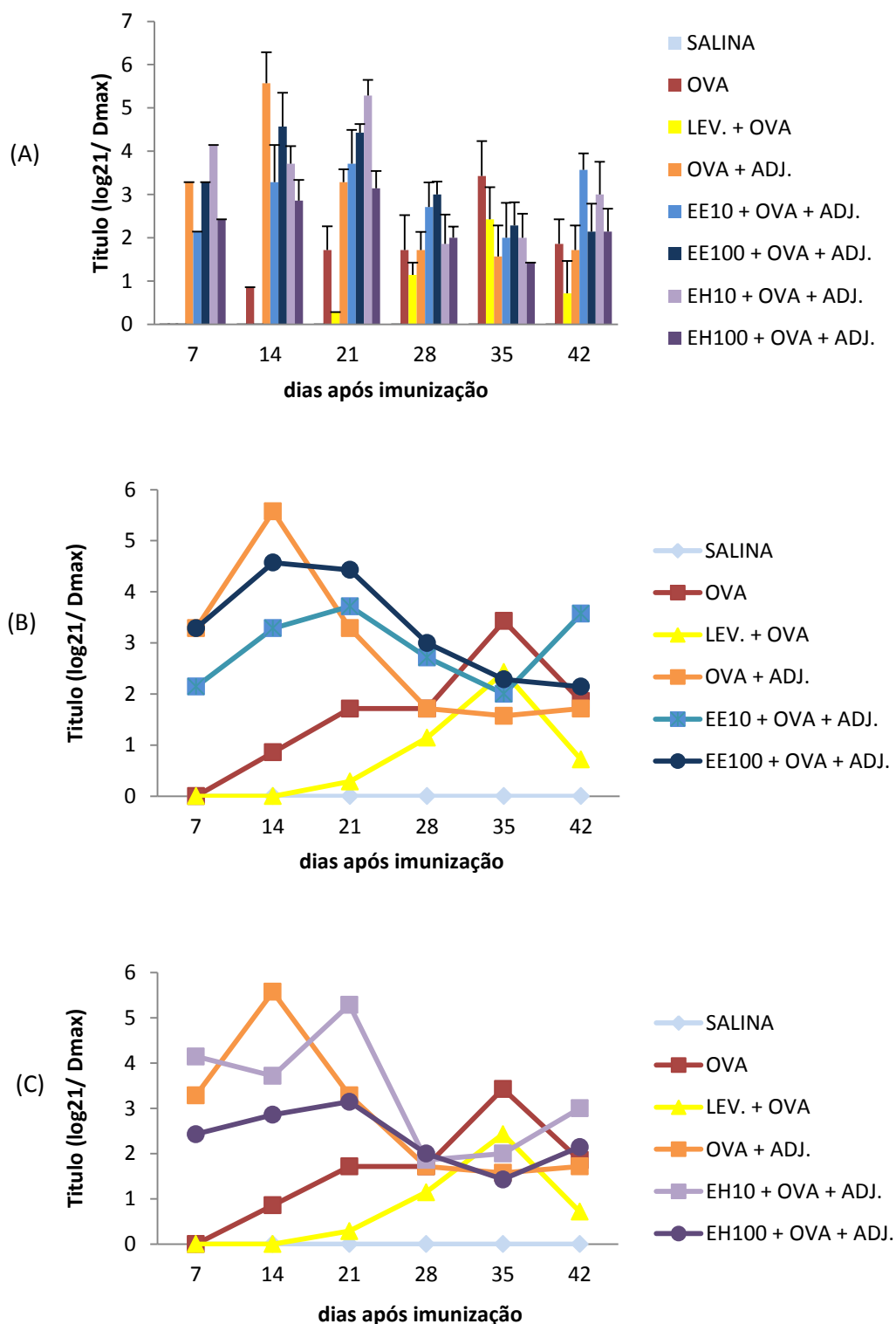
**Figura 17** – (A) Cinética da síntese de IgE sérica anti-OVA em animais imunizados apenas com OVA por via s.c. (B) Somente EE nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA comparados com os controles e (C) Somente EH nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA comparados com os controles. Cada ponto (média) corresponde aos títulos de IgE sérica anti-OVA, com diluição  $\frac{1}{4}$ .



A figura 18 apresenta a cinética da síntese de isotipos de IgE específicos anti-OVA, ao longo de 42 dias, após imunização com OVA por via s.c. com ou sem adjuvante de Freund. Para a resposta primária já com 7 dias, todos os grupos imunizados com OVA e adjuvante de Freund apresentaram títulos de IgE superiores a 1 durante os 42 dias.

O grupo imunizado com OVA apresentou uma produção de IgE somente a partir do 14º dia, inferior aos grupos imunizados com OVA e adjuvante de Freund, atingindo um pico no 35º dia, quando em seguida, a produção de IgE declinou. Para o grupo tratado com levamisol por via oral e imunizado com ovalbumina por via s.c. (LEV + OVA) detectou-se títulos de IgE após 21 dias sendo alcançado um pico aos 35 com redução aos 42 dias. A cinética de síntese de IgE anti-OVA para o grupo de animais imunizados com ovalbumina em adjuvante completo de Freund (OVA + ADJ) revelou síntese de anticorpos já aos 7 dias após imunização inicial, atingindo o valor máximo aos 14 dias e a partir de então diminuindo os títulos de IgE. O perfil cinético dos grupos tratados com EE (10 e 100 mg/Kg via o.) e imunizados com OVA e adjuvante de Freund por via s.c. (EE 10 + OVA +ADJ e EE 100 + OVA +ADJ) revelou comportamentos diferentes do grupo OVA + ADJ, diminuindo a produção de IgE após 21 dias. Para EE 100 +OVA + ADJ, os títulos de IgE foram superiores ou igual a 3 até 28 dias atingindo o título 2 no 42º dia. Já os títulos de IgE para o grupo EE 10 + OVA +ADJ foram inferiores aqueles de EE 100 + OVA +ADJ até 35º dia, quando voltou a apresentar título superior a 3 no 42º dia, sendo o maior valor de todos os grupos no mesmo período.

O perfil cinético dos grupos tratados com EH (10 e 100 mg/Kg via o.) e imunizados com OVA e adjuvante de Freund via s.c. (EH 10 + OVA + ADJ e EH 100 + OVA +ADJ) revelou comportamentos distintos ao do grupo OVA + ADJ, mas similares ao do grupo EE10 + OVA + ADJ atingindo um pico da síntese de IgE aos 21 dias quando começou a diminuir até 35º dia e voltou a apresentar aumento de título de IgE , aos 42 dias, alcançando valores superiores a 2.



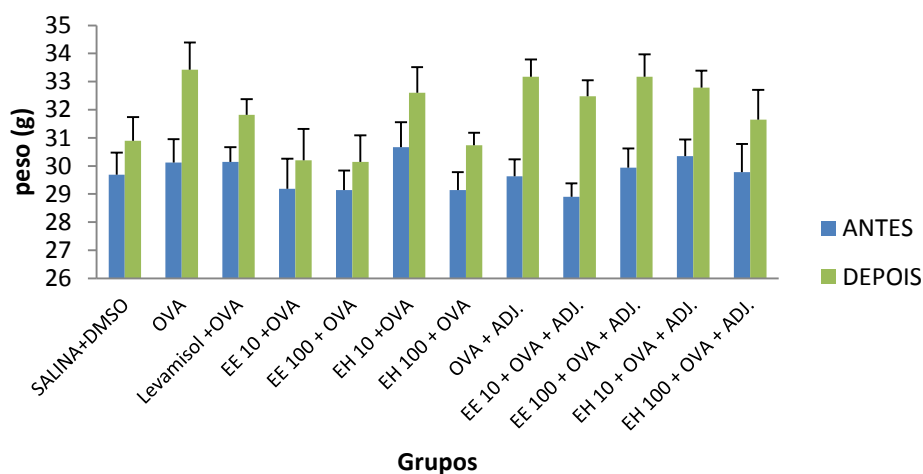
**Figura 18** – (A) Cinética da síntese de IgE específicos anti-OVA, ao longo de 42 dias, após imunização com OVA com ou sem adjuvante de Freund por via s.c. (B) Somente EE nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA + Adj. comparados com os controles e (C) Somente EH nas doses de 10 e 100mg/Kg imunizados com OVA + Adj. comparados com os controles. Cada ponto (média) corresponde aos títulos de IgE sérica anti-OVA, com diluição  $\frac{1}{4}$ .

### 6.4.3. Avaliação dos tratamentos com os extratos etanólico e hexânico no peso dos animais e no peso relativo dos órgãos.

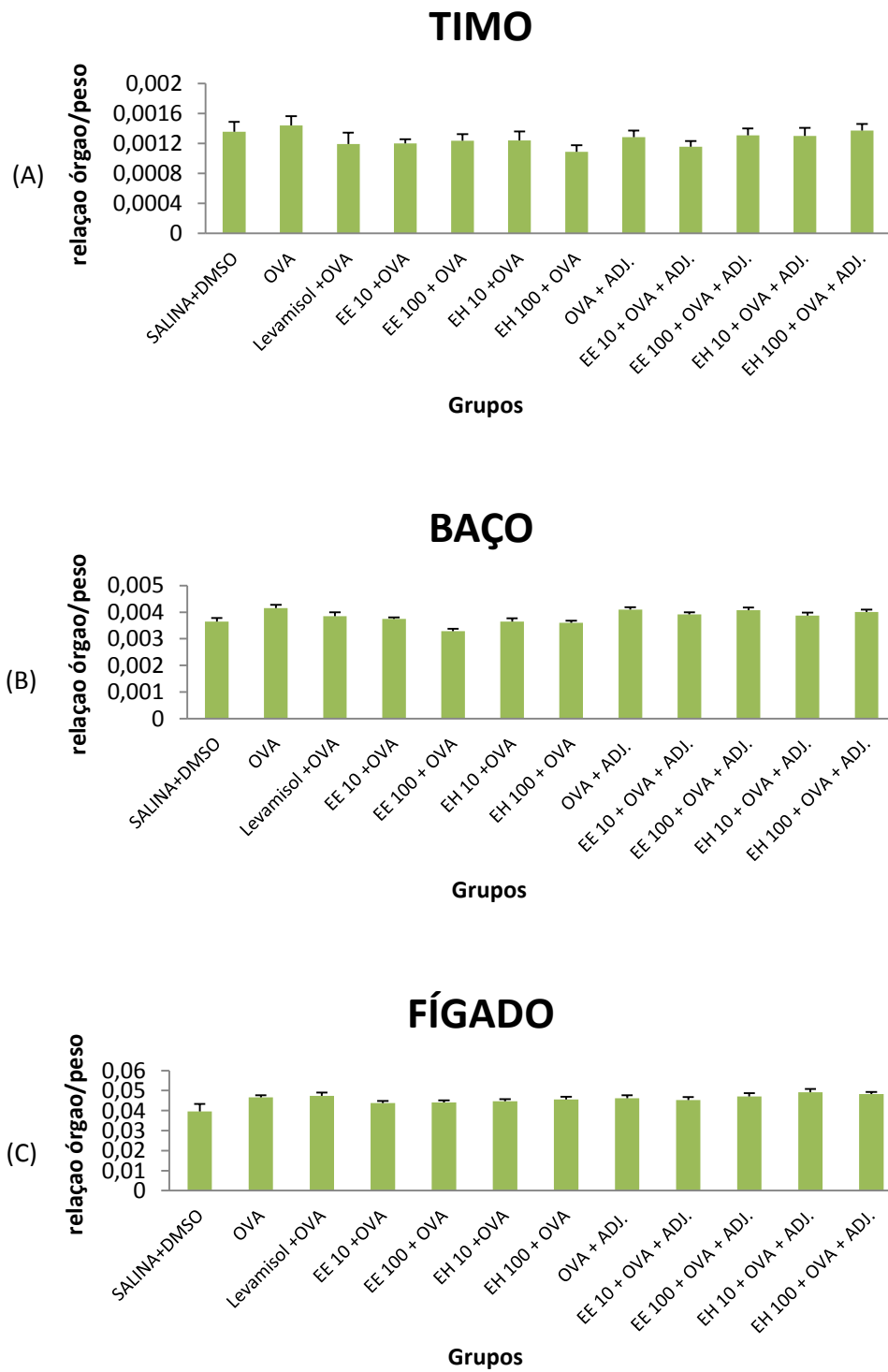
A figura 19 apresenta o peso dos animais antes e depois dos tratamentos com os extratos etanólico e hexânico durante o período de imunização (42 dias). Os resultados foram indicativos de que não houve perda de peso e as alterações detectadas foram condizentes com o desenvolvimento dos animais, isto é, peso esperado para a faixa etária dos mesmos.

Após realização de necropsia não foram visualizadas alterações macroscópicas nos órgãos situados nas cavidades abdominal e torácica dos animais de nenhum grupo.

O efeito do tratamento dos EE e EH de *Annona muricata* L. por 42 dias sobre o peso relativo dos órgãos dos camundongos está mostrado na Fig. 20. Não foram observadas diferenças significativas entre os pesos relativos do timo (Fig. 20A), baço (Fig. 20B) e fígado (Fig. 20C) dos animais quando comparados ao grupo controle.



**Figura 19** - Peso dos animais antes e depois dos tratamentos (42 dias) com os extratos etanólico e hexânico de folhas de gravioleira.



**Figura 20** - Peso relativo dos órgãos: timo (A), baço (B) e fígado (C) de animais tratados com os extratos etanólico e hexânico de folhas de gravioleira.

## 7. DISCUSSÃO

---

O estudo de atividades terapêuticas de extratos oriundos de plantas tem despertado grande interesse e tem direcionado para pesquisa envolvendo estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos (WAGNER, 2007). Com interesse em determinar propriedades terapêuticas, os extratos etanólico e hexânico de *Annona muricata* L. foram testados, quanto aos seus constituintes fitoquímicos e potencial antioxidante *in vitro*, bem como uma possível toxicidade quando administrados por via oral e em relação ao seu efeito sobre a resposta imunológica *in vivo*.

Para a obtenção dos extratos, foi utilizada a extração a frio, com uma etapa hidrofílica (extração com etanol) para separação dos compostos mais polares e outra lipofílica (extração com hexânico) para separação dos demais compostos, mais apolares. Os estudos fitoquímicos objetivam determinar a presença de diferentes compostos, dentre estes os metabólitos secundários. Uma vantagem econômica da maioria das metodologias de extração, tanto de metabólitos primários, quanto de secundários, é a facilidade de obtenção desses compostos através de processos relativamente simples, como a destilação a vapor ou por extração com solventes aquosos ou orgânicos (CHAGAS, 2004).

Para a caracterização dos compostos fitoquímicos, os EE e EH foram testados seguindo metodologia de MATOS (1997). Foi observada a presença de taninos, catequinas, saponinas e esteróides no EE e apenas esteróides no EH (Tabela1). Em um estudo realizado por BAFNA e MISHRA (2006) com extrato metanólico da raiz de *Curculigo orchioides* foi determinada a presença de alcalóides, fenóis, taninos, saponinas e esteróides, basicamente os mesmos fitoquímicos encontrados no presente estudo. PRADO e colaboradores (2005) determinaram a presença de polifenóis do extrato aquoso de *Camellia sinensis* (chá verde) através de diferentes metodologias.

Atualmente existe uma série de métodos *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais, tendo em vista a grande variedade de compostos com propriedades antioxidantes e a complexidade dos mesmos quanto ao seu modo de combater os distintos radicais livres. Dentre estes métodos, um dos mais utilizados para

a determinação da atividade antioxidante de extratos de folhas é o ensaio de captura de radicais livres por 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) realizado no presente estudo.

O EE apresentou maior atividade antioxidante que o EH (Tabela 2). O EE apresentou 79,27% quanto ao índice de varredura mostrando ser maior que o EH com 40,44% comparados com o BHT, antioxidante conhecido com 91,90%. Esse maior efeito pode estar associado às quantidades mais elevadas de metabólitos secundários, tais como taninos, catequinas, saponinas e esteróides, que foram determinadas para esse extrato. É importante ressaltar que os metabólitos aqui estudados são apenas alguns 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, dependendo da polaridade dos diferentes extratos, há uma maior ou menor capacidade dos fitoquímicos em atingir os sítios gerados das espécies radicalares. O resultado obtido para o EE corrobora com BASKAR e colaboradores (2007) que trabalhando também com o extrato etanólico das folhas da *Annona muricata* mostraram que esse extrato apresentava uma potente atividade antioxidante *in vitro*, conferindo assim um importante papel na captação de radicais livres e sugerindo um efeito terapêutico do mesmo. Dentre os metabólitos secundários evidenciados no EE, os principais responsáveis pela atividade antioxidante podem ser os taninos e as catequinas. De acordo com MONTEIRO e colaboradores (2005), os taninos atuam como captadores de radicais livres e também apresentam atividades antimicrobiana, antiviral, antifúngica e antisséptica. Ainda sobre esses compostos, outros pesquisadores demonstraram a capacidade dos mesmos de ativar mudanças morfológicas de macrófagos peritoneais e induzir várias citocinas antitumorais, como o fator de necrose tumoral (TNF-alfa) e interleucina 1 (IL-1) (FELDMAN et al, 1999;. EL ABBAOUIYI et al, 2004). As catequinas estão entre os flavonóides polifenólicos com maior potencial antioxidante em estudos *in vitro* (LEE et al., 2003; DREOSTI, 2000). Estes compostos são um grupo de moléculas biologicamente ativas, que tem apresentado larga escala de efeitos *in vitro*, com destaque para a 3-galato de (-) epicagalocatequina que tem atividade relacionada à prevenção do câncer (DEMEULE et al., 2000) e atividade antioxidante, já confirmadas em chá verde (VAYALIL et al., 2004; PRADO et al., 2005; COOPER et al., 2005).

Após estudar a composição fitoquímica e atividade antioxidante dos EE e EH de folhas de gravioleira, foram realizados os ensaios *in vivo*, começando com os estudos toxicológicos em camundongos em condições previamente estabelecidas durante 30

dias. A avaliação toxicológica de substâncias administradas em organismos vivos pode envolver a avaliação dos efeitos obtidos após 24 horas da administração (toxicidade aguda) ou após administrações em doses repetidas: toxicidade subcrônica e crônica (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2005). Nesse contexto o estudo de toxicidade realizado no presente trabalho classifica-se como modelo de toxicidade subcrônica de acordo com a ANVISA através da RE nº 90, de 16 de março de 2004.

Os resultados dos ensaios toxicológicos mostraram que os EE e EH de folhas de *Annona muricata* L. administrados durante 30 dias não causaram nenhuma toxicidade evidenciada por diferentes parâmetros (Tabela 3), vale ressaltar que não foram observados mortalidade ou sintomas adversos, nem mudanças nos aspectos macroscópicos dos órgãos linfóides (Fig.11) e dos estômagos (Fig.12) e não houve redução de peso em nenhum animal após a administração das 3 doses (10, 100 e 1000mg/Kg) em estudo. Em relação aos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST, foram detectados para ALT menores valores que os determinados para o controle (Fig. 13) e para AST valores comparáveis aos do controle (Fig. 14). Essa diminuição dos níveis séricos de ALT e a manutenção de AST são um bom indicativo do potencial antioxidante dos extratos. Uma vez que o aumento destas enzimas no sangue é indicativo de possíveis lesões hepáticas (GELLA, 1994; LIMA et al, 2001). A AST está presente em altas concentrações em vários órgãos, como coração, pulmão, rins, baço, dentre outros; enquanto a ALT por estar mais restrita ao citossol de hepatócitos é mais sensível para indicar lesão hepatocelular, sendo o grau de aumento dos níveis da ALT correlacionado ao grau de injúria ao órgão (GELLA, 1994; LIMA et al, 2001). Após os bons resultados do estudo toxicológico, os extratos revelaram-se seguros para utilização nos ensaios para a determinação do potencial imunomodulador.

A fim de determinar o efeito desses extratos sobre a resposta imunológica, os animais foram imunizados com ovalbumina (OVA) 10 µg por via subcutânea com ou sem adjuvante de Freund e tratados ou não por via oral com levamisol (10 mg kg<sup>-1</sup>) e os EE e EH (10 e 100 mg kg<sup>-1</sup>). A ovalbumina é uma proteína de baixo peso molecular, constitui um antígeno T-dependente, havendo a necessidade de auxílio das células T antígeno-específicas para a produção da resposta humoral e que, por sua vez, estimula a síntese de IgG e de IgE (SCHIJNS, 2002; MESQUITA et al., 2010). No entanto, sabe-se que antígenos purificados e solúveis, como a ovalbumina, quando injetados são rapidamente degradados e removidos do local da injeção, induzindo uma resposta imune

fraca e transitória (SCHIJNS, 2002). Para resolver esse problema, no experimento grupos de camundongos foram imunizados com OVA associada ao adjuvante de Freund. Quando antígenos solúveis são associados com adjuvantes oleosos, como os adjuvantes de Freund, as emulsões ficam retidas no local da injeção formando um depósito de antígeno que é liberado em pequenas quantidades e por um período de tempo mais longo, ocasionando uma ativação sustentada das células T e uma imunidade mais efetiva (COX, COULTER, 1997; HILTON et al., 1997; MARCIANI, 2003).

A fim de determinar possível efeito imunomodulador dos extratos, escolheu-se como um imunomodulador químico ou sintético como padrão. Os imunomoduladores químicos podem ser definidos como substâncias cuja atuação sobre o sistema imunológico, em geral, melhora e amplia a atividade de linfócitos T e B. Esses compostos químicos podem ser divididos em quatro grupos básicos: imidazólicos, tióis, compostos sianozaridínicos e análogos de ácidos nucleicos (FINGER & SCHEINBERG, 2002). O levamisol, imunostimulante de referência usado nesse trabalho é um imidazotiazol com propriedades imunomoduladoras já descritas e que vem sendo utilizado nas terapias imunológicas (PURZYC & CALKOSINSKI, 1998). Em relação à síntese de anticorpos totais específicos (anti-OVA), para o grupo LEV + OVA detectou-se um aumento de anticorpos com 21 dias e após o segundo reforço esses valores duplicaram e mostraram-se superior ao do grupo OVA (Fig. 15A). O levamisol pode estimular a resposta imune afetando a ativação e maturação das células dendríticas (CHEN; LIN; CHIANG, 2007), aumentando a produção de células do sistema imune, como o número absoluto de linfócitos (SOUSA, 1992; RAYCHAUDHURY et al., 2005). Ao comparar os valores de Ig totais para EE (EE 10 + OVA) com o do grupo LEV + OVA, estes foram semelhantes até 35 dias, mas com valores um pouco inferiores, estando mais próximos aos valores do grupo OVA. Já para o grupo EE 100 + OVA, os valores de Ig anti-OVA alcançam valor semelhante ao do grupo LEV + OVA (Fig. 15B). Com isso, pode-se observar que somente EE 100 mg kg<sup>-1</sup> apresentou atividade comparável ao do levamisol aos 42 dias. Para o EH, ambos os grupos EH 10 + OVA e EH 100 + OVA apresentaram efeito similar ao do grupo LEV + OVA até 35 dias (Fig. 15C). Com o grupo EH 100 + OVA apresentando produção de anticorpos idêntica ao do grupo LEV + OVA e superior a dos grupos OVA e EH 10 +



OVA aos 42 dias (Fig. 15C). O EH 100 mg kg<sup>-1</sup> foi o que mais estimulou a resposta imunológica secundária.

Para os grupos imunizados com OVA com adjuvante de Freund, os anticorpos anti-OVA foram detectados a partir dos 14 dias (resposta primária) e essa produção intensificou-se após os reforços e ao longo dos dias após imunização (Fig. 16A). Para o grupo OVA + ADJ há um pico com 21 dias e depois se mantém com valores superiores ao do grupo OVA. Essa antecipação da resposta e manutenção dos níveis de anticorpos deve-se ao próprio efeito do adjuvante, em liberar aos poucos o antígeno, agindo como depósito. Alguns adjuvantes apresentam a capacidade de modificar a rede de citocinas, promovendo a regulação do sistema imune como um todo, de forma a estimular a secreção de certas citocinas e inibir de outras, bem como estimulando a apresentação do antígeno às células efectoras apropriadas (COX & COULTER, 1997). Os adjuvantes conferem benefícios como: aumento dos níveis de anticorpos neutralizantes, interferência na afinidade dos anticorpos e influência na duração da resposta imune (COX & COULTER, 1997). Ambos os extratos na duas doses testadas, apresentaram efeito sinérgico com o adjuvante, potencializando a síntese de anticorpos anti-OVA, na resposta secundária, nos grupos imunizados com OVA em adjuvante de Freund (Fig. 16). No entanto, os valores quantificados para o grupo EH 100 + ADJ + OVA são superiores aos de todos os grupos testados (Fig. 16C).

A observação diferencial das respostas imunológicas para produção de isótipos IgE foi feita usando o teste de PCA. Esse teste apesar de antigo apresenta especificidade e seletividade bem definidos (OVARY; CALAZZA; KOJIMA, 1975). Para a resposta primária detectou-se títulos de IgE inferiores a 1 para os grupos OVA e EH 10 + OVA e nenhuma síntese foi detectada para os demais grupos (OVA sem adjuvante). Após o primeiro reforço (14 dias) houve produção de IgE anti-OVA em todos os tratamentos em que os animais foram imunizados somente com OVA (Fig.17). Para o grupo OVA, foram detectados títulos de IgE já no 14<sup>o</sup> dia, superior aos demais grupos, atingindo um pico no 35<sup>o</sup> dia (Fig. 17). METCALFE (1985) e RENZ e colaboradores (1993) relataram a indução da síntese de IgE pelo antígeno sozinho (grupo OVA, Fig. 17), associando ao fato que a ovalbumina, proteína do ovo, é um dos maiores alérgenos alimentares e que estimula forte produção de IgE e IgG. O grupo LEV + OVA apresentou os menores valores de títulos de IgE quando comparados aos dos demais tratamentos, exceto para o grupo EE 10 + OVA (28<sup>o</sup> e 35<sup>o</sup> dias). Em relação à síntese de IgE, os resultados foram favoráveis aos extratos. Os grupos EE 10 + OVA e EE 100 +

OVA apresentaram títulos de IgE anti-OVA menores ou iguais aos apresentados pelo grupo OVA, sendo os títulos apresentados pelo grupo EE 10 + OVA menores que os apresentados pelo grupo EE 100 + OVA (Fig. 17B), indicando que esse extrato não estimulou a síntese de IgE anti-OVA. Em relação aos grupos EH 10 + OVA e EH 100 + OVA, os títulos de IgE quantificados foram também similares aos do grupo OVA, exceto para EH 10 + OVA no 42º dia (Fig. 17C). O fato da não estimulação da IgE anti-OVA foi ainda melhor evidenciado quando se associou a OVA ao CFA, uma vez que na síntese de Igs totais os extratos em ambas as doses potencializaram a resposta do CFA, o que não foi o caso da resposta para IgE específica (Fig. 18). Como pode ser observado para a síntese de IgE no grupo EH 100 + OVA + ADJ (Fig. 18C), os títulos de IgE detectados foram menores ou iguais aqueles detectados no grupo OVA+ ADJ. A indução da resposta de IgE antígeno-específica predispõe indivíduos suscetíveis para reações alérgicas aos componentes das vacinas (MEKORI; METCALFE, 2000; MARCIANI, 2003).

Vale ainda ressaltar que assim como para os testes toxicológicos, após os 42 dias de experimento para os EE e EH em ambas as doses testadas, não foram observados mortalidade ou sintomas adversos, nem mudanças nos aspectos macroscópicos e peso relativo dos órgãos linfóides (Fig.20) e não houve redução do peso dos animais (Fig.19) durante o período experimental.

Os tratamentos com os extratos etanólico e hexânico estimularam a resposta imune humoral secundária. Desses extratos, o EH foi o melhor, pois independente da concentração promoveu uma ação imunoestimulatória sobre as imunoglobulinas totais específicas para OVA. A estimulação de uma resposta humoral indica uma possível responsividade aumentada de macrófagos e linfócitos T e B, envolvidos na síntese de anticorpos (SHUKLA et al., 2009).

A atividade imunomoduladora de muitas plantas é atribuída a diferentes princípios ativos presentes em sua constituição, assim, pode-se tentar explicar o efeito imunomodulador dos extratos das folhas de *Annona muricata* L. pela presença dos diferentes fitoquímicos, alguns caracterizados no presente estudo e outros que não foram determinados. Segundo SCHENKEL e colaboradores (2007), as saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, derivadas do metabolismo secundário das plantas, e relacionadas com o sistema de defesa das mesmas, sendo encontradas nos tecidos mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório

dos insetos (WINA et al., 2005), possuindo, assim, ação antimicrobiana, prevenindo o crescimento de fungos, podendo ser indicadas como “fitoprotetoras” (PIZARRO, 1999). As saponinas são conhecidas por possuírem a capacidade de estimular a resposta inflamatória (OLIVEIRA, 2008; MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010), também tem sido relatado com sucesso o uso de saponinas como adjuvantes em vacinas contra leishmaniose canina e murina (SANTOS, 2007) e como agentes imunoestimulantes (LIU et al., 1995; BAFNA & MISHRA, 2006).

De acordo com BAFNA & MISHRA (2006), o extrato metanólico da rizoma de *Curculigo orchioides* teve efeito imunoestimulante em modelos experimentais usando camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e como antígenos, hemácias de carneiro. Houve aumento da resposta imune humoral e celular induzidas por hemácias de carneiro. Nesse extrato, os autores caracterizaram também por testes qualitativos, como no presente estudo, a presença dos seguintes fitoquímicos: alcalóides, compostos fenólicos, taninos, saponinas e esteróides. Ainda sobre a presença dos fitoquímicos e a associação com a imunomodulação, CARLOS e colaboradores (2005) determinaram a presença de flavonoides, triterpenos, esteróides, ácido gálico e catequinas em extratos metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. e associou esses fitoquímicos ao potencial imunoestimulante da resposta de macrófagos murinos.

Os imunoestimulantes podem ser considerados como recursos promissores em novos protocolos terapêuticos de doenças relacionadas ao sistema imunológico. Os extratos de folhas de gravioleira seriam bons candidatos a imunoestimulantes por serem acessíveis, de fácil extração, não terem apresentado toxicidade, o que viabilizaria seu uso concomitante com os demais medicamentos para o tratamento da doença, obtendo assim uma melhora na resposta.

## 8. CONCLUSÕES

---

Os extratos etanólico e hexânico de folhas de *Annona muricata* L. apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, sendo o extrato etanólico o de maior potencial, provavelmente devido a sua composição em taninos e catequinas. Esses extratos não apresentam efeitos tóxicos quando administrados por via oral em camundongos.

Os extratos etanólico e hexânico revelaram uma cinética de síntese de anticorpos distinta. O extrato hexânico em ambas as concentrações testadas teve efeito estimulante similar ao levamisol para síntese de imunoglobulinas totais anti-ovalbumina, potencializou o efeito do adjuvante de Freund na resposta imune secundária e não estimulou a síntese de IgE específica. Já o extrato etanólico em ambas as concentrações testadas só apresentou atividade imunoestimulante, na resposta secundária quando a ovalbumina estava associada ao adjuvante, bem como também não estimulou a síntese de IgE específica.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABDULLAH, F.; SINA, I. The potential of soursop seed extract *Annona muricata* Linn as a biopesticide against aphids *Aphis gossypii* glover (Homoptera: Aphididae) on chilly. **Malaysian Journal of Science**, v.22, n.2, p.11-16, 2003.

ADEYEMI, D. O., KOMOLAFE, O. A., ADEWOLE, O. S., OBUOTOR E. M., KEHINDE A. T.; Anti hyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn); **Afr. J. Trad. CAM** , 6 (1): 62 – 69; 2009.

ANDRADE, S. F.; SANTARÉM, V. A. Endoparasitoides e ectoparasitoides. In: ANDRADE, S. F. *Manual de terapêutica veterinária*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p.437- 476.

ANVISA 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução - RE nº 90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de março de 2004.

BAFNA, A.R., MISHRA, S.H. Immunoestimulatory effect of methanol extract of *Curculigo orchioides* on immunosuppressed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 1-4, 2006.

BALLKWILL, F. **Cytocine cell biology – a practical approach**. Oxford University Press, New York, 254p, 2000.

BARROS SBM, DAVINO SC. Avaliação da Toxicidade. In: \_\_\_\_\_. S. OGA. **Fundamentos da Toxicologia**. 2.ed. são Paulo: Atheneu. 2003, p.57-67.

BARTA, O. **Immunoadjuvant therapy**. In: \_\_\_\_\_. KIRK, R.W.; BONAGURA, J. D. **Kirk's current veterinary therapy**. 11. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992, p. 217.

BASKAR, R.; Rajeswari, V.; Kumar, T.S. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian J. Exp. Biol.**, 45, 480-485; 2007.

BRAGA, L.T, NUNES-PINHEIRO, D.C.S., SOUSA, J.A.V., SILVA, F.M.S., FARIAS, V.M., LEITE, A.K.R.M., LOPES, C.A.P., FAÇO, O., CAMPELLO, C.C., COSTA, J.H., NOGUEIRA, T.N.A.G. Efeito do levamisol e do extrato etanólico de folhas de *Momordica charantia* sobre a dermatofitose experimental em coelhos. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.2, p.285-95, 2007.

BORIES C, LOISEAU P, CORTES D, MYINT S H, HOCQUEMILLER R, GAYRAL P, CAVE A AND LAURENS A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds; **Planta Med.** 57 434–436; 1991.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F., MORAIS, S. M., SANTOS, L. F. L., ROCHA, M. F. G., BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade antihelmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, p. 97-106, 2005.

CAPARROS-LEFEBVRE, D., LEES, A.J. Atypical Unclassifiable Parkinsonism on Guadeloupe: An Environmental Toxic Hypothesis; **Movement Disorders**, Vol. 20, Suppl. 12, pp. S114–S118; 2005.

CARLOS, I.Z., LOPES F.C.M., BENZATTI F.P., CARLI C.B.A., MARQUES M.F., JORDÃO JUNIOR C.M., RINALDO D., CALVO T.R., SANTOS L.C., VILEGAS W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.15, n. 1, p. 44-50, Jan./Mar. 2005.

CARVALHO ACB, BALBINO EE, MACIEL A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev Bras Farmacogn.** 18: 314-319; 2008.

CELY M. Ervas e Aromas; blog nº 02. Disponível em < <http://ervasearomas.blogspot.com/2009/11/graviola-folhas.html> > Acesso em 15 de janeiro de 2011.

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, p. 156-160, 2004.

CHAMPY P, HÖGLINGER GU, FEGER J, GLEYE C, HOCQUEMILLER R, LAURENS A, GUERINEAU V, LAPREVOTE O, MEDJA F, LOMBES A, MICHEL PP, LANNUZEL A, HIRSCH EC, RUBERG M. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **J Neurochem** 88:63–69; 2004

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

CHANG, F.R.; LIAW, C.C.; LIN, C.Y.; CHOU, C.J.; CHIU, H.F.; WU, Y.C. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Planta Medica**, v.69, p.241-246, 2003.

CHEESBROUGH, M., MAC ARTHUR, J. **A laboratory manual for rural tropical hospitals**. London: ELBS, 48, 1987.

CHRISTENSEN, J. P., KAUFFMANN, S. O. & THOMSEN, A. R. Deficient CD4+ T cell priming and regression of CD8+ T cell functionality in virus-infected mice lacking a normal B cell compartment. **J. Immunol**. 171, 4733–4741; 2003.

COOMBS RRA, GELL PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Gell PGH, Coombs RRA, Lachmann PJ, editors. **Clinical aspects of immunology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.761; 1975.

COOPER R, MORRÉ J, MORRÉ DM. Medicinal benefits of green tea: part II. review of anticancer properties. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine** 11: 639-652; 2005.

COX, J.C., COULTER, A.R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. **Vaccine** v. 15, p.48-56, 1997.

DAMICO, D.C.; FREIRA, M.G.; GOMES, V.M.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, M.L. Isolation and characterization of a lectin from *Annona muricata* seeds. **Journal of Protein Chemistry**, v.22, p.655-661, 2003.

DAVIS, L.; KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n.1-2, p.193-200, 2000.

DE CARVALHO, J.M.; DOS SANTOS, A.F.; SANT'ANA, A.E.G. Estudo da atividade moluscicida da *Annona muricata*. XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Anais do Congresso, QB-028, 2000.

DE FEO, V. Medicinal and magical plants in northern Peruvian Andes. **Fitoterapia** 63:417-440. 1992

DOS SANTOS, A.F.; DIAS, R.C.; DE CARVALHO, J.M.; DO NASCIMENTO, R.R.; DE LIMA, I.S.; SANT'ANA, A.E.G. **Atividade Moluscicida de Plantas da Família Annonaceae**. XV Simpósio de plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia, Anais do Congresso, p.118, 1998.

DOS SANTOS, A.F.; FRANÇA, A.K.R.; DIAS, R.C.; PEREIRA, S.S.; SANT'ANA, A.E.G. **O Potencial Moluscicida das Anonas**. XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Anais do Congresso, PN-131, 2000.

DREOSTI IE. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition**, 2000, 16, 692-694.



DEMEULE, M.; BROSSARD, M.; PAGE, M.; GINGRAS, D.;BELIVEAU, R., Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1478, n. 1, p. 51-60. 2000.

DI STASSI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2a edição, editora UNIFESP, SP, 2002.

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

DUNN, W. B., ELLIS, D. I. Metabolic: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005.

EL ABBAOUYI, A., TOUMI, M., EL HACHIMI, Y., JOSSANG, A., In vitro effects of aqueous seeds extract of *Acacia cyanophylla* on the opsonized zymosan-induced superoxide anions production by rat polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Ethnopharmacology**; 91, 159–165: 2004.

ELENKOV, I.J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1024, p. 138-46, 2004.

ENGEL L.W. & STRAUSS S.E. Development of therapeutics: opportunities within complementary and alternative medicine. **Nature Review**, v. 1, p. 229– 237, 2002.

ESSER, M. T.; MARCHESE, R. D.; KIERSTEAD,L. S. TUSSEY, L. G.; WANG, F. CHIRMULE, N.;WASHABAUGH, M. W. Memory T Cells Vaccines. **Vaccine**, v. 21, p. 419-430, 2003

FALKENBERG, M. B; SANTOS, R. I; SIMÕES, C. M. Introdução à Análise Fitoquímica. In: \_\_\_\_\_. SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Da UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2001. p. 165.

FELDMAN, K.S., SAHASRABUDHE, K., SMITH, R.S., SCHEUCHENZUBER, W. J.; Immunostimulation by plant polyphenols: a relationship between tumor necrosis factor production and tannin structure. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** 9, 985–990; 1999.

FINGER, E.; & SCHEINBERG, M. A. IN VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2ª edição, Atheneu, Rio de Janeiro, p.33-38; 2002.

FREITAS, S.F., SHINOHARA, L., SFORCIN, J.M., GUIMARAES, S.,. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine** 13, 170–175; 2006.

GAUTAMA M., SAHAA S., BANIB S., KAULB A., MISHRAA S., PATIL D., N.K. SATTIC, K.A. SURIC, GAIROLAD S., SURESHD K., JADHAVD S., G.N. QAZIB, PATWARDHANA B.; Immunomodulatory activity of *Asparagus racemosus* on systemic Th1/Th immunity: Implications for immunoadjuvant potential; **Journal of Ethnopharmacology**; 121; 241–247; 2009.

GBEASSOR, M.; NIKABU, O.; DE SOUZA, C.; WERNER, W. In vitro antimalarial activity of six medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, n. 3, p. 115-117; 1990

GELLA, J.; Enzimologia clinica. In: \_\_\_\_\_. Sastre, F.G. **Bioquímica clinica**. Barcelona:, 1994, p. 113-124.

GIRGIN, G., BAYDAR, T., LEDOCHOWSKI, M., SCHENNACH, H., BOLUKBASI, D.N., SORKUN, K., SALIH, B., SAHIN, G., FUCHS, D. Immunomodulatory effects of Turkish propolis: changes in neopterin release and tryptophan degradation. **Immunobiology**. 214, 129-134; 2009.

GRANUCCI F, ZANONI I, RICCIARDI-CASTAGNOLI P. Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. *Cell. and Mol. Life Sciences*; 65:1683-97; 2008.

GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIM, S.; GUPTA, C.K. Adjuvants- a balance between toxicity and adjuvant activity. **Vaccine**, v. 11, p. 293-306, 1993.

HASRAT, J. A.; DE BRUYNE, T.; DE BACKER, J.-P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A. J. Isoquinoline Derivatives Isolated from the Fruit of *Annona muricata* as 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Agonists in Rats: Unexploited Antidepressive (Lead) Products; **Journal of Pharmacy and Pharmacology**; Volume 49, Issue 11, p.1145–1149, 1997.

HERZYK, D.J; GORE, E.R.; Adequate immunotoxicity testing in drug development. **Toxicology Letters**, vol. 149, p. 115-122, 2004.

HILTON J, DEARMAN RJ, BOYLETT MS, FIELDING I, BASKETTER DA, KIMBER I. The mouse IgE test for the identification of potential chemical respiratory allergens: Considerations of stability and controls. **J. Appl. Toxicol.** 16, 165-170; 1996.

HOLETZ FB, PESSINI GL, SANCHES NR, CORTEZ DA, NAKAMURA CV, FILHO BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem I Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOMANN, D. et al. Evidence for an underlying CD4 helper and CD8 T -cell defect in B-cell-deficient mice: failure to clear persistent virus infection after adoptive immunotherapy with virus-specific memory cells from  $\mu$ MT/ $\mu$ MT mice. **J. Virol.** 72, 9208–9216; 1998.

HU, F., HEPBURN, H.R., LI, Y., CHEN, M., RADLOFF, S.E., DAYA, S., Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**; 100, 276–283; 2005.

HUANG, C.F., LIN, S.S., LIAO, P.H., YOUNG, S.C., YANG, C.C., The immunopharmaceutical effects and mechanisms of herb medicine. **Cellular & Molecular Immunology** 5, 23–31; 2008.

JACHAK, S.M.; SAKLANI, A. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. **Current Science**, v., 92, p. 1251-1257, 2007.

JANEWAY, C., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema immune na saúde e na doença**. Artmed editora, São Paulo, 5 ed., 2002.

KIM, G.S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L.L.; WU, F.E.; McLAUGHLIN, J.L.; SASTRODIHARDJO, S. Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, annonuricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.** 61, 432-436; 1998.

KIM, J.Y., YOON, Y.D., AHN, J.M., KANG, J.S., PARK, S.K., LEE, K., SONG, K.B., KIM, H.M., HAN, S.B. Angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4. **International Immunopharmacology**, 78–87., 2007.

KIMURA A., NAKA T., KISHIMOTO T. IL-6 dependent and –independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. **Proc Natl Acad Sci USA**; 104(29); 12099-104; 2007.

KINET JP. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. **Immunological Reviews**,; 217:5-7, 2007.

KIOUKIA-FOUGIA, N., ANTONIOU, K., BEKRIS, S., LIAPI, C., CHRISTOFIDIS, I., PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 823-30, 2002.

KUMAR V, SINGH PN, MURUGANANDAM AV, BHATTACHARYA SK. Effect of Indian *Hypericum perforatum* Linn on animal models of cognitive dysfunction. **J Ethnopharmacol.** 72:119–128; 2000.

LEE KW, LEE HJ, SURH YJ, Vitamin C and cancer chemo prevention: reappraisal. **American Journal of Clinical Nutrition**, 78, 1074-1078; 2003.

LEE, J., KIM, I.S., KIM, J., KIM, J.S., KIM, D., YUN, C. Supressive effects of Houttuynia cordata thumb (Saururaceae) extract on TH2 immune response. **Journal of Ethnopharmacology** . v.117, p. 34–40. 2008.

LI, C.M.; TAN, N.H.; ZHENG, H.L.; MU, Q.; HAO, X.J.; HE, Y.N.; ZOU, J. Cyclopeptide from the seeds of Annona muricata. **Phytochemistry**, v.48, p.555-556, 1998.

LI, D. Y.; YU, J. G.; ZHU, J.X.; YU, D.L.; LUO, X. Z.; 1 Estado da Arte/State of the Art Plantas Mediciniais Brasileiras. IV. Annona muricata L. (Graviola) SUN, L.; YANG, S.L. Annonaceous acetogenins of the seeds from Annona muricata. **Journal of Asian Natural Product Research**, v.3, p.267-276, 2001.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; LIN, C. Y.; CHOU, C. J.; CHIU, H.F.; WU, M. J.; WU, Y.C., New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from Annona muricata. **Journal of natural products**, Ohio, v. 65, n. 4, p. 470-75. 2002.

LIMA, A. O. **Métodos de laboratório aplicados a clínica**. 8ª edição, Ed. Guanabara Koogan, RJ, 2001.

LIU, J., WANG, S., LIU, H., YANG, L., NAN, G.. Stimulatory effect of saponin from Panax ginseng on immune function of lymphocytes in the elderly. **Mechanisms of Ageing Development** 83, 43–53; 1995.

LIU, Q.; LIU Z., ROZO C. T., HAMED C. T.; ALEM F., URBAN J. F. JR. AND. GAUSE J. F. The role of B cells in the development of CD4 effector T cells during a polarized Th2 immune response. **J. Immunol.** 179, 3821–3830; 2007.

LIU, Y.; WANG, M-W. Botanical drugs: challenges and opportunities. **Life Sciences**, v.82, p.445-449, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum, 2002, 544 pp.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 68, p. 81-85, 2000.

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.

LUND F. E., HOLLIFIELD M, SCHUER K, LINES J. L, RANDALL T. D, GARVY B. A.; B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection. **J. Immunol.** 176, 6147–6154 (2006).

LUND F. E. AND RANDALL T. D.. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. **Nature Reviews Immunology**, Vol. 10; p. 236-247; 2010.

MAKARE, N., BODHANKAR, S., RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 78, p. 133-137. 2001.

MALAGA, C. A.; WELLER R. E, ROGER BRODERSON J.; GOZALO A. S. Tuberculosis-like lesions arising from the use of Freund's complete adjuvant in an owl monkey *Aotus* sp. **Journal of medical primatology**, v. 33, p. 109-112, 2004.

MANZ, R. A; HAUSER A. E.; HIEPE F.; RADBRUCH A.; Maintenance of serum antibody levels. **Annual reviews in immunology**, v. 23, p. 367-386, 2005.

MARCIANI, D. J. Vaccine adjuvants: role and mechanism of action in vaccine immunogenicity. **Drug discovery today**, v. 8, p. 934-943, 2003.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R.L.C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil; **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.3, p.380-397, 2010.

MATOS F.J.A.. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. 2ª edição. Fortaleza: Imprensa Universitária, Universidade Federal do Ceará. 139p. 1997.

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.

MEKORI, Y.A., METCALFE, D.D. Mast cells in innate immunity. **Immunological Reviews**, v.173, p.131-40, 2000.

MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P; CATELAN, T.T.T; SOUSA, A.W.S; CRUVINEL, W.M; ANDRADE, L.E.C; SILVA, N.P; Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. Bras. Reumatol.**, vol.50, no.5, p.552-580. ISSN 0482-5004; 2010.

METZ M., GRIMBALDESTON MA, NAKAE S, PILIPONSKY AM, TSAI M, GALLI SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. **Immunological Reviews**; 217:304-328; 2007.

MINAMI, K.P.; VALADARES M.C.; QUEIROZ, M.L.S. Efeitos do fitoterápico *Annona muricata* sobre o crescimento e diferenciação de células hematopoéticas normais. **XII Congresso Interno de Iniciação Científica**, UNICAMP, Campinas, Anais do Congresso, B-137, 2004.

MORS, B.W; RIZZINI, T.C; PEREIRA, A.N. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Inc., EUA, p.289, 2000.

MONTEIRO JM, LINS-NETO EMF, AMORIM ELC, STRATTMANN RR, ARAÚJO EL, ALBUQUERQUE UP. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. **Revista Árvore**; 29: 999-1005; 2005.

MOSER M, LEO O. Key concepts in immunology. **Vaccine**; v. 28, Supplement 3; p.C2-C13; 2010.

MOSMANN TR, COFFMAN RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol.**;7:145–73; 1989.

MOTA, E. F. **Atividade adjuvante dos óleos de amendoim (*Arachis hypogaea* L), algodão (*Gossipium hirsutum* L) e arroz (*Oryza sativa* L) na resposta imune humoral e celular.** Fortaleza: UFC, 2006. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2006.

MOTA & WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse anti-sera during the course of immunization. **Life Science**, v.8, p.913-820, 1969.

MURAD, J.M., CALVI, S.A., SOARES, A.M., BANKOVA, V., SFORCIN, J.M., Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology** 79, 331–334; 2002.

NORRBY K. **Mast cells and angiogenesis.** *APMIS*,; 110:355-371; 2002.

NUDO L. P., CATAPA E. S.,; Immunostimulatory effects of *Uncaria perrottetii* (A. Rich.) Merr. (Rubiaceae) vinebark aqueous extract in Balb/C mice; **Journal of Ethnopharmacology** 133; 613–620; 2011.



OKRUHLICOVA L, MORWINSKI R, SCHULZE W, BARTEL S, WEISMANN P, TRIBULOVA N., Autoantibodies against G-protein-coupled receptors modulate heart mast cells. **Cellular & Molecular Immunology**,; 4(2):127-133, 2007.

OLIVEIRA, P.R.N, TESTA, G., SENA, S.B., COSTA, W.F., SARRAGIOTTO, M.H., SANTIN, S.M.O. Saponinas triterpênicas das raízes de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (RUBIACEAE); **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 4, 755-758, 2008.

OMS, Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra:OMS, 2003.

ORSI, R.O., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R., BANKOVA, V., Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. **International Immunopharmacology** v. 5, nº 2; 359–368; 2005.

OTTO, R.G.; KAPLAN, C.A.M.; ORIN, R.M. **Biodiversidade um enfoque bioquímico**. Rio de Janeiro, editora UFRJ, p. 20-32, 1996.

OVARY, Z. Cutaneous anaphylaxis in the albinos rat. **International Archives Allergy Application Immunology**, v. 3, 292p, 1952.

OVARY, Z.; CALAZZA, S. S.; KOJIMA, S. PCA reactions with mouse antibodies in mice and rats. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 48, 16-21, 1975.

PADMA P, PRAMOD NP, THYAGARAJAN SP, KHOSA RL. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **J Ethnopharmacol**;61(1):81-3; 1998.

PARHAM, P. **O sistema immune**. Porto Alegre: Artmed, 372p.; 2001.

PARKIN, J., COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, p. 1777-1789, 2001.

PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 711-740; 2007.

PIZARRO, A. P. B.; FILHO, A. M. O.; PARENTE, J. P.; MELO, M. T. V.; SANTOS, C. E. ; LIMA, P. R. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 23-29, 1999.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, Paul J.M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 18, n. 2, 2004.

PRADO CC, ALENCAR RG, PAULA JR & BARA MTF. Avaliação do teor de polifenóis da *Camellia sinensis* (Chá Verde). **Revista eletrônica de Farmácia**; 164-167; 2005

PRESS, J. B.; REYNOLDS, R. C.; MAY, R. D.; MARCIANI, D. J. Structure/function relationships of immunostimulating saponins. **Study Natural Product Chemistry**, v. 24, p. 131-174, 2000.

PURZYC, L.; CALKOSINSKI, I. Ecto-ATPase from rat lymphocytes: in vivo studies on the influence of levamisole. **Polish Journal of Pharmacology**, v.50, p.239-251, 1998.

RAYCHAUDHURY, B.; BANERJEE, S.; GUPTA, S.; SINGH, R.V.; DATTA, S.C. Antiparasitic activity of triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta Tropica**, v.95, p.1-8, 2005.

RENZ, H.; BRADLEY, K.; LARSEN, G.L.; MCCALL, C.; GELFAND, F. W. **Journal Immunology**, v.151, p.7206-7213, 1993.

ROCHA, K. C.; GORESCU, R.A.G.; BELTRAME, R. L. Metodologia laboratorial para estudo da resposta imune celular. In: \_\_\_\_\_. VAZ, A. J.; KIOKO, T.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

RODINEI M.G: Perfil fitoquímico de diferentes extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire Erechim 2008.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6ª edição. Sao Paulo: Manole, 443p, 2003.

SACRAMENTO, C.K; SOUZA, F.X.; Graviola. In: \_\_\_\_\_. SANTOS-SEREJO, J.A.; DANTAS, J.L.L.; SAMPAIO, C.V.; COELHO, Y. S. **Fruticultura tropical: Espécies regionais exóticas**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, p.500; 2009.

SAKAGAMI, H., HATANO, T., YOSHIDA, T., TANUMA, S., HATA, N., MISAWA, Y., ISHII, N., TSUTSUMI, T., OKUDA, T.. Stimulation of granulocytic cell iodination by tannins and related compounds. **Anticancer Research** 10, 1523–1531; 1990.

SANTUCCI L, FIORUCCI S, GIANANTI M, BRUNORI PM, DIMATTEO FN, MORELLI A. Pentoxifylline prevents indomethacin-induced acute mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor- . *Gut* 35:909–915, 1994

SANTOS, F. N. **Imunoterapia contra a leishmaniose visceral experimental canina com a vacina Leishmune® enriquecida de saponina**. 97f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia “Prof. Paulo de Góes”, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: \_\_\_\_\_. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; SCHINJS, V.E.J.C. **Immunological Concepts of Vaccine Adjuvant Activity**. *Current Opinion in Immunology*, v. 12, p. 456-463, 2000.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: \_\_\_\_\_. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 711-740.

SCHIJNS, V. E. J. C. Antigen delivery systems and immunostimulation. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 87, p. 195-198, 2002.

SFORCIN, J.M.,. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology** 113, 1–14; 2007.

SHEN, H. et al. A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*. **J. Immunol.** 170, 1443–1451; 2003.

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.

SILVA, C. Imunologia: Métodos Laboratoriais que utilizam Anticorpos. Resumo: aula 24 SET. 2010. citocinas. Disponível em: <<http://metodoslaboratoriaiscomac.blogspot.com/2010/09/resumo-aula-24092010-citocinas.html>>. Acesso em 24 abr. 2010.

SILVA, L.C.N.; MENDONÇA, S.M.L.; NASCIMENTO, R.L.; LIMA, I.S.; SANT'ANA, A.E.G. Isolamento dos constituintes voláteis dos frutos da Annonaceae, *Annona muricata* (graviola). **XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, Anais do Congresso, PN-126, 1997.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International Journal of Parasitology**, v. 33, p. 469-478, 2003.

SOUSA, M.C.B.B. **Influência da Dose e Esquema de Administração de C. parvum Inativado, Cepa DAUFEPE nº 187, Sobre o Eritograma, Leucograma e Perfil Protéico de Camundongos (Mus musculus)**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Clínica Médica) Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1992.

SOUZA, A.W.S.; JÚNIOR D. M., ARAÚJO J. A. P., CATELAN T. T. T., CRUVINEL W. M ANDRADE L. E. C., SILVA N. P., **Rev Bras Reumatol**; 50(6):665-94, 2010.

SPELMAN, K., BURNS, J., NICHOLS, D., WINTERS, N., OTTERSBERG, S., TENBORG, M.; Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. **Alternative Medicine Review** 11, 128–150; 2006.

SPRENT J, KISHIMOTO H. The Thymus and negative selection. **Immunol. Rev**; 185:126-135; 2002.

STEINMAN L.; A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T-cell mediated tissue damage. **Nat Med**; 13(2); 139-45; 2007.

SUNDARRAO, K. Preliminary screening of antibacterial and antitumor activities of Papua New Guinean native medicinal plants. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, n. 1, p. 3-6; 1993.

SUYENAGA ES, RECHE E, FARIAS FM, SCHAPOVAL EES, CHAVES CGM, HENRIQUES AT. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytother Res** 16: 514-518, 2002.

TIZARD, I.R. Vacinação e vacinas. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia Veterinária - Uma Introdução**. 6 ed., Roca: São Paulo, Cap. 21, 261-281 p. 2002.

TURVEY SE, BROIDE DH. Innate Immunity. **J Allergy Clin Immunol**; 125, S24-S32; 2010.

USLUOGLU, N., PAVLOVIC, J., MOELLING, K., RADZIWIŁL, G., RIP 2 mediates LPS-induced p38 and IBsignaling including IL-12 p40 expression in human monocyte-derived dendritic cells. **European Journal of Immunology** 37, 2317–2325, 2007

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão, **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**; v.24; n.4; p. 146-154; 2001.

VAYALIL PK, MITTAL A, HARA Y, ELMETS CA & KATIYAR SK. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology** 122: 1480-1487; 2004.

WAGNER, H. Pesquisa fitomédica no novo milênio: Tendências e mudanças. In: \_\_\_\_\_. YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí; Editora da UNIVALI, p.34-47; 2007.

WANG, L. Q.; MIN, B. S.; LI, Y.; NAKAMURA, N.; QIN, G. W., LI, C. .J.; HATTORI, M. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona Montana*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Oxford. v. 10, n. 3, p. 561-5. 2002.

WÉLÉ, A.; ZHANG, Y.; CAUX, C.; BROUARD, J.P.; POUSSET, J.L.; BODO, B. Annonuricatin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. **Comptes Rendus Chimie**, v.7, n.10-11, p.981-988, 2004.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Moluscicide screening and evaluation. **World Health Organization**, v.33, p.565-581, 1995.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant productions: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 8093-8105, 2005.

WOJCIECHOWSKI, W.; HARRIS D.P., SPRAGUE F., MOUSSEAU B., MAKRIS M., KUSSER K., HONJO T.; MOHRS, K.; MOHRS, M. RANDALL, T. AND LUND F.E. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. **Immunity**; v.30, 421–433; 2009

WU, L.; LU, Y.; ZHENG, Q.T.; TAN, N.H.; LI, C.M.; ZHOU, J. Study on the spatial structure of anomuricin A, a cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. **Journal of Molecular Structure**, v.827, p.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.

YU, J.G.; GUI, H.Q.; LUO, X.Z.; ZHU, P., YU, Z.L. Studies on the chemical constituents of *Annona muricata*. **Yao Xue Xue Bao**, v.32, n.6, p.431-437, 1997.