

PERFIS FITOQUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS, CITOTÓXICOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS DO EXTRATO ALCOÓLICO DE FOLHAS DE ATEMOIA (*Annona Squamosa*, L. x *Annona Cherimola*)

PHYTOCHEMICAL, MICROBIOLOGICAL, CYTOTOXIC AND ANTI-INFLAMMATORY PROFILES OF THE ALCOHOLIC EXTRACT OF ATEMOY LEAVES (*Annona Squamosa*, L. X *Annona Cheremola*)

PERFILES FITOQUÍMICO, MICROBIOLÓGICO, CITOTÓXICO Y ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ATEMOY (*Annona Squamosa*, L. X *Annona Cheremola*)

Gabriela Sossai Marcomini*, Laura Folquito Oliveira*, Sara de Souza Costa**, Melina Mizusaki Iyomasa Pilon***, Lucas Possebon****, Ana Paula Girol*****

Resumo

Introdução: Os extratos alcoólicos de plantas com potencial medicinal possuem compostos com alto potencial anti-inflamatório e aplicação terapêutica. Dentre as espécies vegetais de interesse destacamos a atemoia, um híbrido de *Annona cherimola*, Mill e *Annonas quamosa*, L. **Objetivo:** Caracterizar o extrato alcoólico bruto de folhas da atemoia em ensaios fitoquímicos, microbiológicos, citotóxicos e no modelo de peritonite. **Método:** O extrato de folhas de atemoia foi obtido por percolação, com o uso de 20g de folhas secas e trituradas com 100 ml de álcool de cereais. Na padronização dos extratos foram utilizadas análises de identificação de componentes químicos, os taninos, flavonoides, saponinas e alcaloides, por meio de diferentes reações químicas e os antioxidantes foram analisados pela atividade do DPPH. Diferentes cepas bacterianas foram avaliadas quanto a sensibilidade ao extrato em várias concentrações. A citotoxicidade das diferentes concentrações do extrato também foi analisada por hemólise e pelo teste da membrana corioalantide (CAM). Ainda, a capacidade anti-inflamatória do extrato a 4% foi avaliada na peritonite induzida por endotoxina em ratos. **Resultados:** As análises fitoquímicas indicaram a presença de alcaloides, taninos e flavonoides e ausência de saponinas além da alta capacidade antioxidante. Na concentração de 100% o extrato inibiu a proliferação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os testes de hemólise e CAM mostraram ausência de citotoxicidade na concentração de 4% e elevada citotoxicidade a partir de 10%. No modelo de peritonite, a administração do extrato na concentração de 4% inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. **Conclusão:** O extrato alcoólico das folhas da atemoia mostra importante perfil anti-inflamatório e antioxidante o que estimula estudos futuros para sua aplicação farmacológica.

Palavras-chave: Fitoterápicos. Annona. Extratos vegetais.

Abstract

Introduction: The alcohol extracts of plants with medicinal potential have compounds with high anti-inflammatory potential and therapeutic application. Among the plant species of interest, we highlight athemoia, a hybrid of *Annona cherimola*, Mill and *Annonas quamosa*, L. **Objective:** To characterize the raw alcoholic extract of athemoia leaves in phytochemical, microbiological, cytotoxic tests and in the peritonitis model. **Method:** The extract of athemoia leaves was obtained by percolation, with the use of 20g of dried leaves and crushed with 100 ml of cereal alcohol. In the standardization of the extracts were used identification analyses of chemical components, tannins, flavonoids, saponins and alkaloids, by means of diffractive chemical reactions and antioxidants were analyzed by DPPH activity. Different bacterial strains were evaluated regarding the sensitivity to the extract in different concentrations. Cytotoxicity of the different concentrations of the extract were also analyzed by hemolysis and by the corioalantide membrane (CAM) test and the anti-inflammatory capacity of the 4% extract was evaluated in endotoxin-induced peritonitis in rats. **Results:** Phytochemical analysis indicated the presence of alkaloids, tannins and flavonoids and absence of saponins and high antioxidant capacity. At 100% concentration the extract inhibited the proliferation of gram-positive and gram-negative bacteria. Hemolysis and CAM tests showed no cytotoxicity at 4% concentration and high cytotoxicity at 10% level. In the peritonitis model, administration of the extract at the 4% concentration inhibited the migration of neutrophils to the peritoneal cavity. **Conclusion:** The alcoholic extract of the leaves of athemoia shows an important anti-inflammatory and antioxidant profile which stimulates future studies for its pharmacological application.

Keywords: Phytotherapics. Annona. Plant extracts.

* Acadêmicos do curso de Medicina do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil.

** Bióloga. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências da UNESP/IBILCE "Júlio de Mesquita Filho" de São José do Rio Preto-SP. Doutoranda pelo mesmo programa da UNESP/IBILCE. Docente nas disciplinas de Biologia Celular e Histologia nos cursos de Medicina, Engenharia Agrônômica, Biomedicina e Farmácia do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil.

***Bióloga e especialista em Biotecnologia pelo Centro Universitário Barão de Mauá. Técnica do Laboratório de Pesquisa Multidisciplinar e Laboratórios de Aulas Práticas do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil.

**** Biólogo, mestre pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências da UNESP/IBILCE "Júlio de Mesquita Filho" de São José do Rio Preto-SP. Doutorado programa da UNESP/IBILCE. Pós-graduação *Lato Sensu* em Biologia Molecular e Genética em Ciências da Saúde pela Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão de Serviços à Comunidade da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAEPE/FAMERP). Docente nas disciplinas de Biologia Celular e Histologia nos cursos de Medicina, Engenharia Agrônômica, Biomedicina e Farmácia do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil.

***** Bióloga, mestre em Morfologia pela UNIFESP, doutora em Genética, área de concentração Biologia Celular e Molecular e pós-doutora em Imunomorfologia pela UNESP de São José do Rio Preto-SP. Docente das disciplinas de Biologia Celular, Histologia e Embriologia do curso de Medicina do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil, e docente da Pós-Graduação em Genética, UNESP de São José do Rio Preto-SP. Pró-Reitora de Pesquisas e Pós-Graduação da UNIFIPA. Contato: anapaulagirol@hotmail.com

Resumen

Introducción: Los extractos alcohólicos de plantas con potencial medicinal presentan compuestos con alto potencial antiinflamatorio y aplicación terapéutica. Entre las especies vegetales de interés destacamos la atemoia, un híbrido de *Annona cherimola*, Mill y *Annonas quamosa* L. **Objetivo:** Caracterizar el extracto alcohólico crudo de hojas de atemoia en ensayos modelo fitoquímicos, microbiológicos, citotóxicos y de peritonitis. **Método:** El extracto de hojas de atemoia se obtuvo por percolación, utilizando 20g de hojas secas y trituradas con 100 ml de alcohol de grano. En la estandarización de los extractos se utilizaron análisis para identificar componentes químicos, taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides, a través de diferentes reacciones químicas y los antioxidantes fueron analizados por la actividad de DPPH. Se evaluó la sensibilidad al extracto de diferentes cepas bacterianas a diferentes concentraciones. También se analizó la citotoxicidad de las diferentes concentraciones del extracto por hemólisis y por el test de membrana de corioalantida (CAM) y se evaluó la capacidad antiinflamatoria del extracto al 4% en peritonitis inducida por endotoxinas en ratas. **Resultados:** Los análisis fitoquímicos indicaron la presencia de alcaloides, taninos y flavonoides y la ausencia de saponinas y alta capacidad antioxidante. A una concentración del 100%, el extracto inhibió la proliferación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las pruebas de hemólisis y CAM no mostraron citotoxicidad a una concentración del 4% y alta citotoxicidad a partir del 10%. En el modelo de peritonitis, la administración del extracto a una concentración del 4% inhibió la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal. **Conclusión:** El extracto alcohólico de hojas de atemoia muestra un importante perfil antiinflamatorio y antioxidante, lo que estimula futuros estudios para su aplicación farmacológica.

Palabras clave: Fitoterápicos. Annona. Extractos de plantas.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pela população em geral como terapia alternativa para tratar muitas doenças é secular. Contudo, o interesse científico em comprovar a eficácia das ervas medicinais e desenvolver fitoterápicos aumentou significativamente em todo o mundo nos últimos anos^{1,2}. Várias plantas na forma de extratos, decocção ou óleos essenciais (OE) são indicadas na medicina popular como anti-inflamatórias, antimicrobianas, cicatrizantes, antioxidantes e antitumorais^{1,3-5}. No Brasil, a utilização de plantas medicinais no tratamento de diferentes condições clínicas é uma prática comum e, atualmente, alguns medicamentos fitoterápicos estão disponíveis na rede farmacêutica e nas instituições de saúde^{3,6,7}, o que estimula o desenvolvimento de novas investigações sobre a eficácia de fitoterápicos como alternativas terapêuticas ou adjuvantes no tratamento de diferentes doenças.

As plantas possuem uma grande variedade de compostos químicos que agem sobre o organismo humano e servem como substrato para prevenir ou tratar doenças, promovendo bem-estar^{5,8}. Os medicamentos vindos das plantas (fitoterápicos) têm sido utilizados em escala crescente em todo mundo nos últimos anos, principalmente na atenção primária à saúde por sua ampla biológica e atividades medicinais, ampla margem de segurança e custos menores^{2,7,9,10}.

A família *Annonaceae* contém cerca de 130 gêneros e mais de 2.000 espécies. A *Annona squamosa* é conhecida popularmente como pinha ou fruta-do-conde e é utilizada para os mais diversos tipos de tratamento, como epilepsia, disenteria, problemas cardíacos, infecções por vermes, prisão de ventre, hemorragia, infecções bacterianas, disúria, febre e úlcera^{11,12}. A *Annona cherimola*, chamada de cherimoia, é outra planta pertencente à família das *Annonaceae*, sub-família *Annonoideae* e gênero *Annona*, originária do Peru e Equador e está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais¹³. A *A. cherimola* apresenta propriedades antimicrobianas e antitumorais^{12,14}.

Dentre as plantas brasileiras promissoras, embora ainda pouco conhecidas, destacamos a atemoia, uma fruta híbrida produzida a partir do cruzamento entre a fruta-do-conde (*Annona squamosa*, L.) e a cherimoia (*Annona cherimola*)¹⁵ que apresenta importantes propriedades funcionais para a saúde, como capacidade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiangiogênica, antinociceptiva e hipolipidêmica^{14,16-18}, mas com raros relatos na literatura científica relacionados ao desenvolvimento de fitoterápicos.

A fruta da atemoia tem quantidades substanciais de carboidratos digeríveis e seu consumo pode ajudar na recuperação rápida da desidratação pelo

significativo conteúdo de açúcares e minerais¹⁹. As sementes e casca da fruta contêm maiores quantidades de proteína bruta e fibra dietética, enquanto a polpa mostra níveis mais elevados de ácido ascórbico e açúcares totais²⁰. As propriedades físico-químicas e nutricionais das frutas imaturas e maduras também foram avaliadas²¹ e indicaram presença satisfatória dos minerais Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn. O alto conteúdo de: K, Cu, Mg, Vitamina C e carboidratos encontrados sugerem a fruta como bom suplemento dietético²¹. As quantidades totais de compostos fenólicos e flavonoides principalmente na polpa, mas também na casca e sementes, apontam o potencial antioxidante da fruta^{16,21}. Além destas, outra investigação indicou as atividades potenciais antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias do OE extraído dos frutos imaturos secos ao sol ou no forno²².

A presença de antioxidantes neste fruto faz com que ele exerça atividade na proliferação celular, o que protege as células contra apoptose induzida por oxidantes e a peroxidação lipídica. A ativação da glutathione peroxidase também foi observada, o que tem efeito importante sobre a prevenção de doenças associadas ao stress oxidativo como aterosclerose e doenças neurodegenerativas, além de ^{câncer}²³⁻²⁵. Quanto à atividade antimicrobiana, o extrato metanólico das folhas e o etanólico do caule da atemoia exibiram atividade contra bactérias Gram-positivas¹⁸.

Diante do exposto, neste estudo procedemos com a caracterização fitoquímica, microbiológica e citotóxica *in vivo* e *in vitro* do extrato bruto de folhas de atemoia. Também foram avaliadas as atividades anti-inflamatórias dos extratos em modelo de peritonite. Os resultados obtidos poderão ser úteis no desenvolvimento de novas formulações de medicamentos fitoterápicos.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção e padronização do extrato alcoólico

As folhas de *Annona squamosa*, L. x *Annona cherimola*, (exsicatas foram depositadas no herbário IRINA DELANOVA GEMTCHUJNICOV (BOTU) número: 33512, atemoia) foram obtidas da APTA, Polo Regional

Centro Norte, de Pindorama-SP, Brasil, em março de 2018. Posteriormente, foram secas à sombra em temperatura ambiente, durante 15 dias, para sua completa dessecação.

O extrato bruto foi obtido por percolação com o uso de 50 g das folhas de atemoia secas e trituradas e 250 ml de álcool de cereais. O extrato bruto permaneceu em um recipiente fechado, sem interferência de luz externa, durante uma semana. Após esse período, o extrato bruto foi filtrado pelo gotejamento por esgotamento 3 vezes no balão de filtração e, após as análises fitoquímicas, pelo rotavapor para a retirada de parte de sua fração alcoólica. Na padronização do extrato bruto foram utilizadas diferentes reações para as análises de identificação de seus componentes histoquímicos²⁶.

Identificação de taninos totais e taninos específicos

A identificação de taninos totais foi realizada por meio das reações com Cloreto Férrico, Acetato de Chumbo e Acetato de Cobre. Para a reação com Cloreto Férrico ($FeCl_3$), em tubo de ensaio, foi colocado 1 ml da solução extrativa, 5 ml de água destilada e uma gota de Cloreto Férrico a 2%, escorrendo-o pela parede do tubo. Na reação com Acetato Neutro de Chumbo, em tubo de ensaio, foi diluído 1 ml da solução extrativa a uma proporção 1:5, na qual foram adicionadas 2 gotas de solução aquosa de Acetato Neutro de Chumbo a 10%. Finalmente, para a reação com Acetato de Cobre, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa diluída na proporção de 1:5 e 2 gotas de solução de Acetato de Cobre a 5%²⁷.

Os taninos específicos foram identificados pelas reações com Acetato de chumbo e Ácido Acético Glacial, Reativo de Wasicky. Para a reação com Acetato de Chumbo e Ácido Acético Glacial, que identifica a presença de taninos gálicos, em tubo de ensaio, foram adicionados 3 ml da solução extrativa e 2 ml de Ácido Acético Glacial a 10% e 3 ml de Acetato de Chumbo a 10%. Enquanto que para a reação com o Reativo de Wasicky, foi utilizado o conteúdo do tubo com a reação com Acetato de Cobre, do qual foi descartado o precipitado da reação anterior por filtração e adicionado 0,5 ml de Polimetilaminobenzaldeído²⁷.

Identificação de saponinas

As saponinas foram identificadas por meio da reação por agitação. Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 ml da solução extrativa, submetida a agitação por um minuto²⁸.

Identificação de flavonoides

A presença de flavonoides foi pesquisada por meio das reações com Cloreto Férrico e Hidróxido de Sódio. Para a reação com Cloreto Férrico, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa e 5 ml de água destilada, na proporção de 1:5. Em seguida, 1 ml dessa mistura foi descartado e, ao conteúdo restante, foi adicionada, pela parede do tubo, 1 gota de Cloreto Férrico a 1%. Na reação com Hidróxido de Sódio, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa e 5 ml de água destilada, na proporção de 1:5. Em seguida, 1 ml dessa mistura foi descartado e, ao conteúdo restante, foram adicionadas, pela parede do tubo, 2 gotas de NaOH a 5%.

Identificação de alcaloides

Para a identificação de alcaloides, os reagentes de Bourchardat, Mayer e Dragendorff foram preparados previamente de acordo com o preconizado pela Sociedade Brasileira de Farmacognosia²⁹. Para a reação de Bourchardat, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa, 1 ml de água destilada e 5 gotas do reagente de Bourchardat. No desenvolvimento da reação de Mayer, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa, 1 ml de água destilada e 5 gotas do reagente de Mayer. Para a reação de Dragendorff, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa, 1 ml de água destilada e 5 gotas do reagente de Dragendorff.

Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato foi determinada pela capacidade de sequestro de radicais livres com o uso de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Após adição de solução de DPPH a 2,4 mg/100 mL, a amostra foi mantida ao abrigo da luz durante 30 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a

520 nm. A atividade antioxidante é expressa como o percentual de inibição do radical DPPH (AA%) e em termos de CE50 (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% da concentração inicial do DPPH). As determinações foram realizadas em triplicata³⁰.

Análises microbiológicas

Após as análises fitoquímicas a solução extrativa foi submetida a evaporação do álcool e ressuspensa em água destilada em diferentes concentrações. Para as análises microbiológicas, os microorganismos *Escherichia coli* (ATCC 0022), *Staphylococcus aureus* (ATCC 0023), *Enterococcus spp.* (ATCC 0012), *Salmonella* (ATCC 0028), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 0083), *Proteus* (ATCC 0133), *Shigella* (ATCC 0122) foram incubados em placa de Petri a 37°C por 24 horas com discos embebidos em concentrações crescentes da solução extrativa diluída em solução de glicose (4%, 6%, 8%, 10%, 15%, 20%, 50%, 100%). Após esse período, e comparados ao halo de antibióticos de referência como ampicilina (*Escherichia coli*, *Enterococcus spp* e *Shigella*) e penicilina (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Proteus e Streptococcus pyogenes*)³¹.

Avaliações de citotoxicidade *in vitro*

A avaliação de citotoxicidade *in vitro*³² foi realizada com suspensões de 1 ml de hemácias nas quais foram adicionados 1 ml de concentrações crescentes (4%, 6%, 8%, 10%, 15% e 20%) do extrato diluído em solução glicosilada. Para o controle negativo foi colocado 1 ml da suspensão de hemácias em tubo de ensaio e adicionado 1 ml da solução glicosilada. Para o controle positivo foi colocado 1 ml da suspensão de hemácias em tubo de ensaio e 1 ml de Triton. A leitura da absorbância em 540 nm foi realizada em espectrofotômetro.

Ensaio da membrana corioalantoide (*Chorioallantoic membrane assay* - CAM) *in vivo*

O ensaio da membrana corioalantoide (*Chorioallantoic membrane assay* - CAM) *in vivo* foi realizado para complementar a avaliação toxicológica do

extrato de atemoia. Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios Multidisciplinares do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), em Catanduva-SP, e conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA), UNIFIPA (07/18). Para a realização dos testes *in vivo*, foram utilizados ovos fertilizados de galinha (*Gallus gallus*), incubados à temperatura de 38°C e umidade relativa de 45% a 65% durante 3 dias³³⁻³⁵. Os ovos embrionados foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle, em que os ovos permaneceram fechados e sem intervenções, grupo sham, em que os ovos foram injetados na câmara de ar com PBS (solução salina tamponada com fosfato) e grupos tratados, nos quais foram aplicados na câmara de ar 100 µl do extrato de atemoia em concentrações de 4%, 6%, 8%, 10%, 15%, 20%. A casca dos ovos foi perfurada na região da câmara de ar para administração do PBS ou do extrato e, após, o orifício foi selado com parafilme. No terceiro dia de incubação, a casca do ovo ao redor da câmara de ar foi removida para avaliação da vascularização na membrana corioalantoide e o desenvolvimento morfológico do embrião.

Indução da peritonite e protocolos de tratamento

A peritonite foi induzida, em dois grupos de ratas, com solução de 25 mg de LPS (sorotipo 0127: B8, Sigma Chemical Co.) diluído em 200 µL de PBS e aplicado intraperitonealmente (i.p)³⁶. Animais sem manipulação foram usados como grupo controle.

Para avaliação das atividades anti-inflamatórias da *Annona squamosa*, L. X *Annona cherimola*, um dos grupos foi administrado duas vezes, por gavagem, com o extrato a 4% (1mL / gavagem), sendo a primeira administração realizada imediatamente antes da injeção do LPS e a segunda 12h depois da indução da peritonite. Após 24h da injeção do LPS os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico inalatório (isoflurano) para coleta de sangue, do lavado peritoneal e do intestino delgado.

RESULTADOS

Identificação de compostos fitoquímicos **Identificação de taninos totais (Cloreto Férrico, Acetato de Chumbo, Acetato de Cobre) e taninos específicos (Acetato de chumbo e Ácido Acético Glacial, Reativo de Wasicky)**

Na reação com Cloreto Férrico ($FeCl_3$) a 2%, houve formação de precipitado esverdeado. Dessa forma, pode-se inferir que o extrato apresenta taninos totais, evidenciados pela presença de precipitados com colorações frias. Também pela reação com Acetato de Cobre a 5%, houve formação de precipitado castanho avermelhado, evidenciando a presença de taninos totais. Diferentemente, na reação com Acetato Neutro de Chumbo a 10%, não houve formação de precipitado castanho avermelhado. A ausência de tal precipitado demonstra ausência de taninos para esse reagente (Tabela 1).

A presença de taninos gálicos foi confirmada pela formação de precipitado castanho avermelhado na reação com Acetato de Chumbo a 10% e Ácido Acético Glacial a 10%, enquanto a formação de precipitado carmin/róseo pela reação com o Reativo de Wasicky, evidenciou a presença de taninos catequínicos (Tabela 1).

Identificação de saponinas (reação por agitação)

Na reação por agitação do frasco, não houve a formação de espuma, evidenciando a ausência de saponinas (Tabela 1).

Identificação de flavonoides (Cloreto Férrico, Hidróxido de Sódio)

A presença de flavonoides foi confirmada pela reação da solução extrativa diluída e o Cloreto Férrico a 1%, com o aparecimento de cor entre verde, amarelo-castanho e violeta, como esperado para a comprovação do composto no extrato. Contudo, a reação com Hidróxido de Sódio e foi negativa (Tabela 1).

Identificação de alcaloides (Bouchardat, Mayer, Dragendorff)

A busca por alcaloides foi feita pelos reagentes Bouchardat, Mayer e Dragendorff. Nas reações de Bouchardat e Dragendorff, obtivemos a mudança esperada para a presença de alcaloides. Na reação com

o reagente Mayer, não foram detectados alcaloides (Tabela 1).

Tabela 1 - Fitoquímica para identificação e caracterização do extrato bruto de folhas de atemoia

Reativos	Fitoquímico	Presença
Cloreto Férrico	Taninos Gerais	+
Acetato de Cobre	Taninos Gerais	+
Acetato Neutro de Chumbo	Taninos Gerais	-
Acetato de chumbo + Ácido Acético Glacial	Taninos gálicos	+
Reativo de Wasicky	Taninos catequímicos	+
Agitação	Saponinas	-
Cloreto Férrico	Flavonoides	+
Hidróxido de Sódio	Flavonoides	-
Reagente de Bourcharadat	Alcaloides	+
Reagente de Dragendorff	Alcaloides	+
Reagente de Mayer	Alcaloides	-

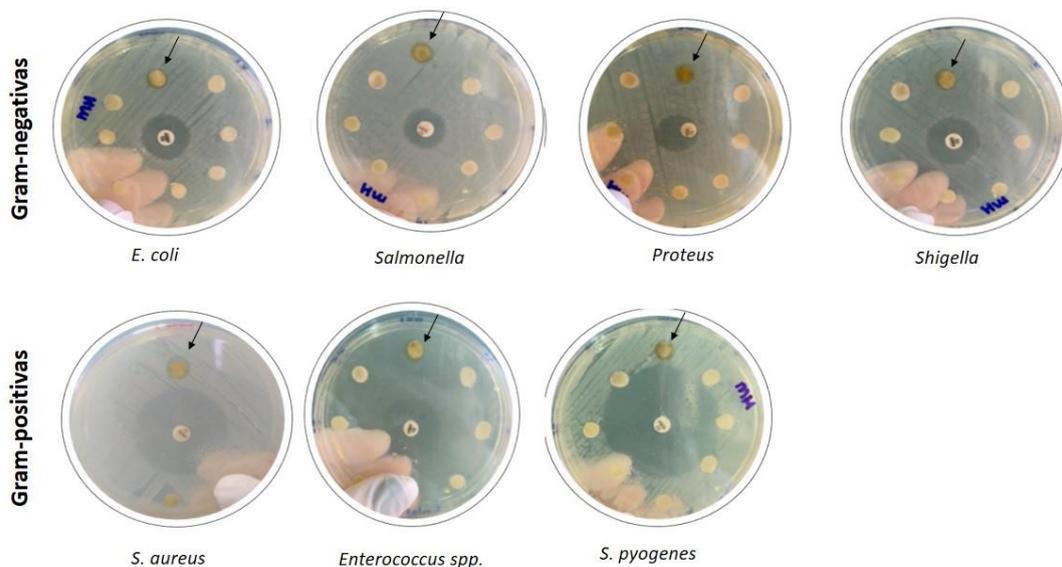
Capacidade antioxidante

A análise da atividade antioxidante do extrato foi determinada pela capacidade de sequestro de radicais livres com o uso de DPPH. Os estudos demonstraram que o extrato bruto das folhas de atemoia apresenta atividade antioxidante de 87%.

Análises microbiológicas

Com relação a capacidade de inibição do extrato das folhas de atemoia, não foram observados halos de inibição nas concentrações do extrato de 4% a 20%, mas na concentração de 100%, todas as bactérias estudadas mostraram sensibilidade ao extrato, embora com formação de halos pequenos comparados aos antibióticos de referência (Figura 1)

Figura 1 - Análises microbiológicas. Setas indicam halos de inibição do crescimento em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas com extrato a 100%. Discos centrais mostram halos de inibição promovidos pelos antibióticos de referência.

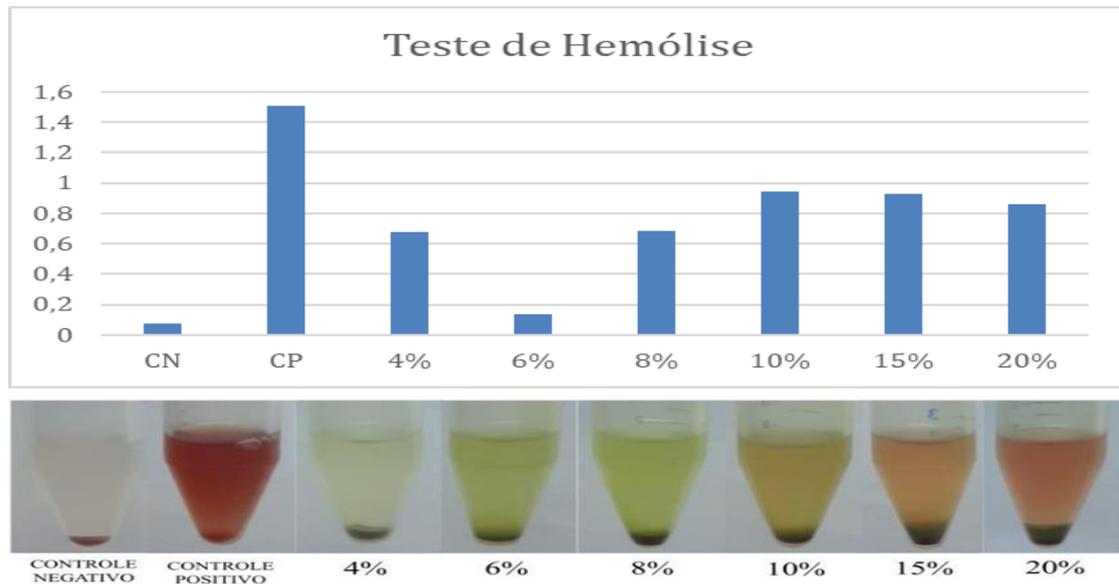


Avaliações de citotoxicidade *in vitro*

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* mostraram baixa citotoxicidade do extrato na dosagem

de 4%, citotoxicidade relativa nas dosagens de 6% e 8% e potencialmente citotóxica nas concentrações acima de 10% (Figura 2).

Figura 2 - Análises de citotoxicidade por Hemólise (*in vitro*). Gráfico de comparação das absorbâncias entre as diferentes concentrações e nos controles negativo (CN, PBS) e positivo (CP, 0.1% Triton) Tubos representativos da hemólise da esquerda para a direita: Controle negativo, Controle positivo, Controle do extrato à 4%, 6%, 8%, 10%, 15% e 20%

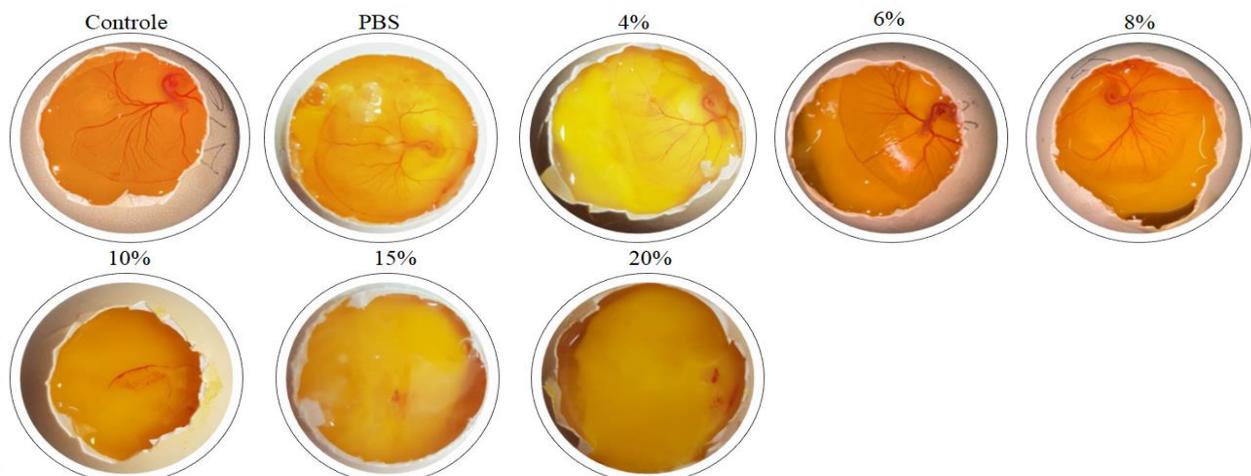


Avaliações de citotoxicidade *in vivo*

As análises de CAM não mostraram citotoxicidade do extrato em 4%, 6% e 8% com desenvolvimento normal do embrião e ausência de vasoconstrição e coagulação,

comparados ao controle (não manuseado) e PBS. A partir da concentração de 10% há redução da vascularização, hemólise e morte dos embriões (Figura 3).

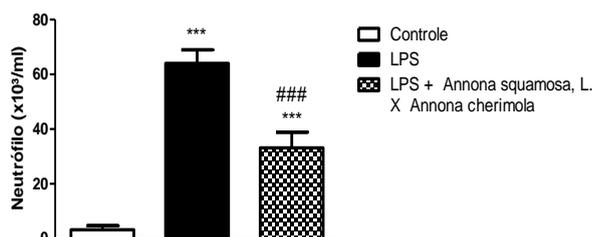
Figura 3 - Teste de citotoxicidade *in vivo* CAM: Os ovos controles, não manipulados, e PBS com desenvolvimento embrionário normal. Na sequência os ovos que foram injetados, respectivamente, com as seguintes concentrações do extrato bruto, 4%, 6%, 8% e 10%. Não se observam alterações na vascularização da membrana CAM e desenvolvimento até a concentração de 8%.



Avaliações da capacidade anti-inflamatória em modelo de peritonite

A análise de leucócitos do lavado peritoneal (Figura 4) indicou aumento de neutrófilos ($p < 0,001$) nos animais induzidos à peritonite e não tratados, comparado ao controle. Contudo, nos animais com o extrato de *Annona squamosa*, L. X *Annona cherimola* ocorreu redução do influxo de neutrófilos ($p < 0,001$) em relação ao grupo sem tratamento embora ainda elevado comparado ao grupo controle ($p < 0,001$).

Figura 4 - Quantificação de neutrófilos no lavado peritoneal. Grupos Controle, Induzido por LPS e não tratado e Induzido por LPS e tratado com extrato de atemoia a 4%. Os dados são representados como média \pm S.E.M (n = 5 / group). *** $p < 0,001$ vs Controle; ### $p < 0,001$ vs LPS sem tratamento



DISCUSSÃO

A padronização do extrato das folhas *Annona cherimola* x *Annona squamosa* é importante para o conhecimento dos compostos e o estabelecimento de dosagens seguras. Assim, procedemos às análises fitoquímicas, os estudos da ação antimicrobiana, da avaliação de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* e potencialidade anti-inflamatória em modelo de peritonite, que mostraram efeitos promissores para administrações da solução extrativa em estudos pré-clínicos futuros.

Nossos resultados mostraram a presença de taninos, flavonoides e alcaloides, o que evidencia as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do extrato bruto de folhas de atemoia. A capacidade antioxidante elevada da solução extrativa das folhas de atemoia foi confirmada pela análise de DPPH e corrobora com investigação anterior que avaliou a capacidade antioxidante de extratos hexânico e metanólico das folhas e extrato etanólico dos talos de atemoia³⁷. A atividade antioxidante é responsável pela

capacidade que algumas substâncias têm de reduzir e prevenir o efeito tóxico de espécies reativas de oxigênio (ROS), em funções fisiológicas normais nos humanos. Os fitoquímicos presentes nas folhas de Atemoia e Cherimoia podem encontrar aplicações para a preparação de alimentos funcionais, como chás, decocção, infusões e bebidas e para a formulação de suplementos dietéticos com o intuito de melhorar a antioxidação do organismo e prevenir doenças crônicas, principalmente pelos compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides^{14,18}.

Após as análises fitoquímicas, procedemos ao estudo da capacidade antimicrobiana da solução extrativa de folhas de atemoia sobre *Escherichia coli*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella* bactérias Gram-negativas e *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, bactérias Gram-positivas. Concentrações mais baixas do extrato não promoveram a inibição, mas o extrato bruto a 100% foi capaz de inibir o crescimento de todas as bactérias estudadas.

Microorganismos Gram-negativos apresentam-se como germes mais resistentes à ação de antimicrobianos, pois possuem parede celular composta de uma camada de lipopolissacarídeos que pode servir como barreira de proteção³⁸. Tendo em vista que patógenos como o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina antes eram restritos aos hospitais e atualmente são causadores de infecções associadas ou adquiridas na comunidade³⁹, fica evidente o quanto a pesquisa por alternativas antimicrobianas é necessária, fato corroborado também em estudo recente que apontou o uso inadequado dos antibióticos como responsável pela disseminação de resistência bacteriana⁴⁰. Como os patógenos Gram-positivos têm maior suscetibilidade, é possível que o mecanismo da ação antimicrobiana do extrato venha da interação com o peptidoglicano da parede celular dos gram positivos³⁷.

A inibição do crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* foi documentada em extrato de metanol de *Annona squamosa*, seguido de extrato de éter de petróleo e clorofórmio, e associada a presença de alcaloides, flavonoides, carboidratos, glicosídeos, taninos e compostos fenólicos, esteroides e

triterpenoides presentes na amostra¹⁰, o que corrobora com os resultados do extrato da atemoia.

Ensaio com a composição química dos óleos essenciais obtidos pela destilação a vapor das folhas frescas, flores e frutos da *Annona cherimola* demonstraram a capacidade antibacteriana contra cinco bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Proteus mirabilis*), antifúngica (*Candida albicans*) e antiviral *in vitro*¹³.

Uma investigação que usou soluções extrativas de atemoia indicou que os extratos etanólico dos talos e metanólico das folhas foram ativos contra cepas de *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*³⁷. Embora com algumas diferenças quanto a sensibilidade dos patógenos ao extrato, que podem estar associadas ao tipo de extração e/ou parte da planta utilizada, nossos resultados confirmam a potencialidade antimicrobiana do extrato de atemoia contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de novas drogas é a inibição ou a ativação do alvo sem interferir nas funções celulares normais. Para tanto é necessário caracterizar suas ações e estabelecer dosagens seguras e eficazes. Por essa razão avaliamos a citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato em testes *in vitro* e *in vivo*. Nossos estudos indicaram ausência de citotoxicidade do extrato na concentração de 4% tanto nos testes de hemólise quanto no teste CAM. Pela análise de hemólise, o extrato já apresenta citotoxicidade relativa a partir de 6% e pelo teste CAM é altamente citotóxico a partir de 10%, com redução da vascularização e morte do embrião. Outra investigação mostrou que o extrato etanólico de sementes de atemoia foi capaz de inibir significativamente as propriedades angiogênicas de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) *in vitro*, bem como a formação de vasos sanguíneos *in vivo*⁴². Esses autores também mostraram que o extrato etanólico de sementes de atemoia regulou negativamente a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e do fator de hipóxia indizível (HIF-1 α /2 α) e indicam o extrato como

potencial fonte para o desenvolvimento de drogas antitumorais⁴¹.

Contudo, diante dos nossos resultados de citotoxicidade, a concentração selecionada para análise em modelo de peritonite induzida foi de 4%. A administração da endotoxina induziu perfil inflamatório com aumento no número de leucócitos, especialmente neutrófilos na cavidade peritoneal. O LPS liga-se aos receptores em células epiteliais e promove a produção de citocinas para migração de leucócitos⁴². No entanto, o tratamento com o extrato de atemoia a 4% reduziu significativamente a resposta inflamatória. Esses dados corroboram com outra investigação em modelo de peritonite induzida por carragenina¹⁷, na qual ocorreu inibição da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal com aplicação de diferentes concentrações do extrato de folhas de atemoia.

CONCLUSÃO

O conjunto dos nossos dados evidenciaram a presença de compostos do metabolismo secundário com atividades anti-inflamatórias e antioxidantes no extrato de folhas de atemoia. O extrato apresentou capacidade antimicrobiana e citotoxicidade em altas concentrações, bem como ausência de citotoxicidade e potencialidade anti-inflamatória em baixas concentrações no modelo de peritonite. Esses resultados estimulam a continuidade de estudos sobre o uso terapêutico futuro de extratos de atemoia.

REFERÊNCIAS

1. Dutra RC, Campos MM, Santos ARS, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2016; 112:4-29.
2. Zank , Hanazaki N, (2017). The coexistence of traditional medicine and biomedicine: A study with local health experts in two Brazilian regions. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0174731.
3. Antonio GD, Tesser CD, Moretti-Pires RO. Phytotherapy in primary health care. *Rev Saúde Pública*. 2014; 48(3):541-53.
4. Ribeiro VP, Arruda C, El-Salam MA, Bastos JK. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. *Pharmaceutical Biology*. 2018; 56(1):253-68.
5. Nunes CR, Arantes MB, Pereira SMF, Cruz LL, Pasos MS, Moraes LP, et al. Plants as sources of anti-inflammatory agents. *Molecules*. 2020; 25:1-22.

6. Caccia-Bava, Maria do Carmo Gullaci Guimarães, Martinez, E.Z., Pereira, Ana Maria Soares, Bertoni, Bianca Waléria. Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do Estado de São Paulo: resultados do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ). *Cienc Saude Colet*. 2017; 22(5):1651-9.
7. Boccolini PMM, Boccolini CS. Prevalence of complementary and alternative medicine (CAM) use in Brazil. *BMC Complement Med Ther*. 2020; 20(1):51.
8. Arun J, J., Venkatesh K, Chakrapani P, Roja Rani A. Phytochemical and pharmacological potential of *Annona cherimola*-a review. *Int. J. Phytomedicine*. 2011; 3:439-47.
9. Chaudhary G, Sandeep G, Priyanka P. *Lawsonia inermis* Linn. A phytopharmacological review. *Int J Pharmaceutical Sci Drug Res*. 2010; 2(2):91-8.
10. Aher PS, Shinde YS, Chavan PP. In vitro evaluation of antibacterial potential of *Annona squamosa* L. against pathogenic bacteria. *Intern J Pharmaceutical Sciences Res*. 2012; 3(5):1457-60.
11. Chandrashekar C, Kulkarni VR. Isolation, characterization and antimicrobial activity of *Annona squamosa* leaf. *J Pharmacy Res*. 2011; 4(6):1831-32.
12. Nugraha AS, Damayanti YD, Wangchuk P, Keller PA. Anti-infective and anti-cancer properties of the *Annona* species: their ethnomedicinal uses, alkaloid diversity, and pharmacological activities. *Molecules*. 2019; 24:4419.
13. Capelinha-Knopfel B, Paranhos AHS, Ferreira JJO; Vidal MAAP. Propriedades farmacológicas da *Annona cherimola* Mill. [dissertação]. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Farmácia Esperança e SESARAM; 2018.
14. Mannino G, Gentile C, Porcu A, Agliassa C, Caradonna F, Berteau CM. Chemical profile and biological activity of *cherimoya* (*Annona cherimola* Mill.) and *atemoia* (*Annona atemoia*) Leaves. *Molecules*. 2020; 25(11):2612.
15. Pino JA. *Annona* fruits. In: Hui YH, editor. *Handbook of fruit and vegetable flavors*. New Jersey: Wiley Online Library; 2010. p. 231-46.
16. Moraes MR. Avaliação e caracterização dos compostos bioativos da atemoia (*Annona cherimola* mil x *Annona squamosa*). [doutorado]. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP; 2016.
17. Silva HN, Rabelo SV, Diniz TC, Oliveira FGS, Teles RBA, Silva JC, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extract from *atemoia* (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.). *Afr J Pharmacol*. 11(18):224-32.
18. Bassam SM, Kazman AL, Harnett JE, Hanrahan JR. The phytochemical constituents and pharmacological activities of *annona atemoia*: a systematic review. *Pharmaceuticals* (Basel). 2020; 13(10):269.
19. Clerici MTPS, Carvalho-Silva LB. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Res Intern*. 2011; 44:1658-70.
20. Cruz LS, Lima RZ, Abreu CMP, Corrêa AD, Pinto LMA. Caracterização física e química das frações do fruto atemoia (*Gefner*). *Ciênc Rural*. 2013; 43(12):2280-4.
21. Santos WN, Sauthier MC, Cavalcante DD, Benevides CM, Dias FS, Santos DC. Mineral composition, nutritional properties, total phenolics and flavonoids compounds of the *atemoia* fruit (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill.) and evaluation using multivariate analysis techniques. *An Acad Bras Ciênc*. 2016; 88:1243-52.
22. Liu TT, Chaob LKP, Peng CW, Yangb TS. Effects of processing methods on composition and functionality of volatile components isolated from immature fruits of *atemoia*. *Food Chemistry*. 2016; 202:176-83.
23. Gupta-Elera G, Garrett AR, Martinez A, Robison RA, O'neill KL. The antioxidant properties of the *cherimoya* (*Annona cherimola*) fruit. *Food Res Int*. 2011; 44(7):2205-9.
24. Barreca D, Laganà G, Ficarra S, Tellone E, Leuzzi U, Galtieri A, Bellocco E. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (*Annonaceae*). *Food Res Int*. 2011; 44(7):2302-10.
25. Loizzo MR, Tundis R, Bonesi M, Menichini F, Mastellone V, Avallone L, Menichini F. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (*cherimoya*) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *J Food Compos Anal*. 2012; 25(2):179-84.
26. Souza GHB, Mello JCP, Lopes NP, orgs. Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais. Ouro Pre, MG: Editora UFOP; 2011.
27. Menezes Filho ACP, Castro CFS. Identificação das classes de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de *Campomanesia adamantium*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Kielmeyera lathrophytum* e *Solanum lycocarpum*. *Estação Científica (UNIFAP)*. 2019; 9(1):89-101.
28. Souza LAP, Spehar CRE, Santos RLS. Determinação do teor de saponina em quinoa. *Pesq Agropecuária Bras*. 2004; 39(4):397-401.
29. Oliveira MAC, Albuquerque MM, Xavier HS, Strattmann RR, Grangeiro Júnior S, Queiroz AT. Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de alcaloides totais como berberina em fitoterápico contendo *Berberis vulgaris* L.. *Rev Bras Farmacogn*. 2006; 16(3):357-64.
30. Rufino R, Lapa E, Silva JR. Cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol*. 2006; 32(3):241-8.
31. Sejas LM, Silbert S, Reis AO, Sader HS. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *J Bras Patol Med Lab*. 200; 3(1):27-35.
32. Desoti VC, Maldaner CL, Carletto MS, Heinz A, Coelho MS, Piati D, Tiunan TS. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobianas e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*. 2011; 15(1):3-13.
33. Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007; 59(11):1162-76.
34. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive Toxicol*. 2017; 70:97-101.
35. Kundeková B, Macajová M, Meta M, Cavarga I, Bilcik B. Chorioallantoic membrane models of various avian species: Differences and applications. *Biology* (Basel). 2021; 10(4):1-24.
36. Gruen M, Laux-Biehlmann A, Zollner TM, Nagel J. Use of dynamic weight bearing as a novel end-point for the assessment of abdominal pain in the LPS-induced peritonitis model in the rat. *J Neurosci Methods*. 2014; 232:118-24.
37. Rabêlo SV, Costa MM, Libório RC, Almeida JRGS. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts from *atemoia* (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). *Rev Bras Frutic*. 2014; 36(esp. 1):265-71
38. Gould D. Effective strategies for prevention and control of Gram-negative infections. *Nurs Stand*. 2009; 23(48):42-6.
39. Gelatti LC, Bonamigo RR, Becker AP, D'Azevedo PA. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade. *An Bras Dermatol*. 2009; 84(5):501-6.
40. Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro MT, Ramalheira E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Rev Port Saude Pub*. 2016; 34(1):77-84.
41. Yi JM, Park JS, Lee J, Hong JT, Bang OS, Kim NS. Anti-angiogenic potential of an ethanol extract of *Annona atemoia* seeds in vitro and in vivo. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14:353.
42. Dantzer R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Neurol Clin*. 2006; 24(3):441-60.

Envio: 26/08/2021
Aceite: 12/09/2021