



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS, FITOQUÍMICOS E
BIOLÓGICOS DE *Annona glabra* L. (Annonaceae)**

Heliton Patrick Cordovil Brígido

BELÉM-PA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS, FITOQUÍMICOS E
BIOLÓGICOS DE *Annona glabra* L. (Annonaceae)**

Autor: Heliton Patrick Cordovil Brígido

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Fâni Dolabela

Co-orientador: Prof.^o Dr. Andrey Moacir do Rosário Marinho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Brígido, Heliton Patrick Cordovil, 1993-
Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e biológicos
de *annona glabra* l. (annonaceae) / Heliton Patrick
Cordovil Brígido. - 2016.

Orientadora: Maria Fâni Dolabela;
Coorientador: Andrey Moacir do Rosário
Marinho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Belém, 2016.

1. Estudo Farmacognóstico. 2. *Annona glabra*.
3. Plantas medicinais. 4. Atividade
antimicrobiana. 5. Atividade leishmanicida. I.
Título.

CDD 22. ed. 615.321

FOLHA DE APROVAÇÃO

Heliton Patrick Cordovil Brígido

ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS, FITOQUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE *Annona glabra* L. (Annonaceae)

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

1 Prof^ª. Dra. Maria Fani Dolabela (Orientadora)

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPA

Ass: _____ *Maria Fani Dolabela* _____

2 Pro^º. Dr. Andrey Moacir do Rosário Marinho (Co-Orientador)

Instituição: ICEN, UFPA

Ass: _____ *Andrey Marinho* _____

3 Prof^º. Dr. Flávio Vasconcelos

Instituição: PPGCF, UFPA

Ass: _____ *Flávio Vasconcelos* _____

4 Prof^º. Marcelo de Oliveira Bahia

Instituição: ICB, UFPA

Ass: _____ *Marcelo Bahia* _____

BELÉM-PA

2016

DEDICÁTORIA

Aos meus pais, Maria Vanuza C. Brígido e Jose Maria C. Cabral, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

A Jeová, pois sem ele nada seria possível. À Ele, também agradeço por ter me guiado e protegido durante toda a minha vida.

À minha família são infinitos os agradecimentos, pois sempre me apoiaram, mesmo distante. Especialmente aos meus pais Maria Vanuza Cordovil Brigido e Hélio Brígido, irmãs Heloísa Brigido e Viviane Brigido e segundo pai Jose Maria Campos Cabral, que se esforçaram para que eu alcançasse meus objetivos e sempre me incentivaram e me guiaram pelo melhor caminho.

À minha orientadora Prof^a. Dra Maria Fani Dolabela, por ter me recebido e acreditado no meu trabalho. Seu empenho e dedicação na minha orientação foi primordial nessa etapa de minha vida.

Agradeço minha namorada e, acima de tudo, companheira e amiga Carolina Moraes da Silva. Sempre esteve ao meu lado, incentivando e apoiando com carinho, paciência, compreensão e amor. Agradeço por Deus tê-la colocado em meu caminho.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de trabalho: Erica Vanessa (Mosquinha), João Victor (Zeraaado), Mirian Bastos (Mirica Repilika) e Milena Cristina (Milenious Falcon), “os come queijo”, os quais tornaram essa caminhada mais agradável pelos momentos de amizade, entre as horas de experimentos e descontração, torcendo pelos resultados e vibrando a cada vez que uma etapa era concluída. Agradeço por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos meus companheiros de experimento: Rosana Sarmiento, Kelly Albuquerque, Rosana Monteiro (IML) por todo trabalho, companheirismo, amizade e momentos de descontração que partilhamos.

Sou grato a todos os membros do laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas: Alexandre Rosa, Thiago Silva, Colina Pontes, Nayla, Juliana Silvestre, Natasha Cristina, Valdicley Vale, Eduardo Mota, Erica Patrícia, Juliana Corrêa, Leticia Hiromi, Amanda Roberta, Lara Vinhal, Luís, Andreza Veiga, Dayse Brandão, Ana Laura, Jessica Peniche e também aos companheiros do laboratório de química: Wander, André e Edson que participaram direta ou indiretamente dessa pesquisa. Obrigado por serem pessoas tão prestativas e

dispostas e a orientar e trocar conhecimentos. Agradeço por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos professores que cederam base científica na elaboração desta dissertação: Andrey Moacir Marinho, Marta Chagas, Márlia Coelho, Fernando Tobias, Julio Cesar, Cleuza Nagamache, Roseane Cristina, Maria das Graças Carvalho.

Agradeço ao Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas, na pessoa de Jorge Dores Rissino (seu Jorge) e ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas, na pessoa de Raimundo Nonato da Silva Barbosa (seu Nonato). Parte dessa pesquisa só pôde ser realizada através dessa parceria. Obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar com dedicação e boa vontade, principalmente nos momentos difíceis. Muito obrigado!

EPÍGRAFE

Jesus disse: “Eu lhes dou um novo mandamento: Amem uns aos outros; assim como eu amei vocês, amem também uns aos outros. Por meio disto, todos saberão que vocês são meus discípulos: se tiverem amor entre si” (João 13: 34,35).

Porque **Deus** amou tanto o mundo, que deu seu filho unigênito, para que todo aquele que nele exercer fé não seja destruído, mas tenha vida eterna (João 3: 16).

RESUMO

BRÍGIDO, H. P. C. **Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e biológicos de *Anona glabra* L. (Annonaceae)**. 2016, 121 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

No presente trabalho, a *Annona glabra* foi submetida a estudos farmacognósticos, fitoquímicos e biológicos (atividade leishmanicida e antimicrobiana). Nos estudos farmacognósticos, utilizou-se os métodos descritos na Farmacopéia Brasileira V ed. (2010). O extrato etanólico (EE) foi obtido através de maceração descontínua do pó das cascas com etanol. Este foi submetido a fracionamento por partição líquido-líquido com hexano e metanol aquoso 10%, gerando-se as frações hexânica (FH) e metanólica (FM). A FM foi refractionada em coluna de Sephadex originando-se 46 frações, analisadas em CCD e reveladas com ácido Sulfúrico, Dragendorff e ultravioleta (360 nm) sendo reunidas em 5 grupos conforme o perfil cromatográfico. O Grupo 3 foi purificado em coluna cromatográfica em escala preparativa originando a amostra G3-1. O EE, FM, FH, Grupo 2 e G3-1 foram analisadas em CLAE-DAD. A amostra G3-1 foi submetida a análise em espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear (RMN). Na avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se os métodos da difusão em ágar (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) e de microdiluição (CIM). O EE e suas frações foram submetidos ao ensaio da atividade leishmanicida (*Leishmania amazonensis*). O pó foi classificado como pó grosso e de baixa densidade com teor de cinzas e umidade estando dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira. Em CLAE-DAD, os principais picos do EE e suas frações apresentaram no espectro de UV absorbâncias com λ entre 240 nm a 280 nm e λ entre 300 nm a 400 nm sugestivos respectivamente da banda II (anel A) e banda I (anel B) de flavonóides. A estrutura química de G3-1 foi identificada como sendo o flavonóide Rutina. No teste de difusão em ágar observou-se a formação de halos do EE e FM somente nas placas de *Staphylococcus aureus*. No ensaio de microdiluição verificou-se que o EE e a FM apresentaram CIM > 1000 $\mu\text{g/mL}$, sendo assim, consideradas inativas. No ensaio antileishmania, o EE apresentou CI₅₀ > 200 $\mu\text{g/mL}$. A FM e FH também apresentaram CI₅₀ > 200 $\mu\text{g/mL}$, no entanto, inibiram o crescimento das promastigotas respectivamente em 20% e 33,7%. As subtrações Grupo 2 e G3-1 apresentaram CI₅₀ > 200 $\mu\text{g/mL}$, porém, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ inibiram o crescimento parasitário em aproximadamente 45%. O EE, suas frações e subfrações foram inativas frente as amastigotas de *L. amazonensis*, no entanto, a FH nas concentrações de 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ inibiu a infecção em 39,1% e 18,7%. Em síntese, o EE e suas frações mostraram-se inativas nos ensaios antimicrobiano e leishmanicida, porém o fracionamento contribuiu para o aumento da atividade sugerindo que substâncias ativas devam estar em baixos teores no extrato e suas frações.

Palavras chaves: Farmacognóstico, fitoquímica, atividade antimicrobiana, atividade leishmanicida, *Annona glabra*.

ABSTRACT

BRÍGIDO, H. P. C. **Pharmacognostic, phytochemical and biological studies of *Annona glabra* (Annonaceae)**, 2016, 121 p. Dissertation (Master's degree) – College of Pharmacy, Federal University of Pará, Belém, 2016.

In this study, the *Annona glabra* underwent pharmacognostic, phytochemicals and biological studies (leishmanicide and antimicrobial activity). In pharmacognostic studies, we used the methods described in Brazilian Pharmacopoeia V ed. (2010). The ethanolic extract (EE) was obtained by maceration of the powder batch of shells with ethanol. The extract was fractionated by liquid-liquid partition with hexane and 10% aqueous methanol resulting in hexane (HF), and methanol (MF) fractions. The MF was submitted to Sephadex column. This procedure resulted in 46 fractions that were analyzed in thin layer chromatography and revealed with sulfuric acid, Dragendorff, and ultraviolet (360 nm) being assembled into 5 groups according to their chromatographic profiles. Group 3 was purified by column chromatography on a preparative scale yielding the G3-1 sample. EE, MF, HF, Group 2 and G3-1 were analyzed by HPLC-DAD. The G3-1 sample was analysed by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR). To evaluate the antimicrobial activity, methods of agar diffusion (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) and microdilution (MIC) were used. The EE and its fractions were subjected to leishmanicide activity test (*Leishmania amazonensis*). The powder was classified as coarse and low-density, with ash and moisture contents within the parameters established by the Brazilian Pharmacopoeia. In HPLC-DAD, the main peaks of EE and its fractions were presented in UV absorption spectrum of 240 nm to 280 nm, and 300 nm to 400 nm suggestive respectively Band II (Ring A), and band I (ring B) of flavonoid. The G3-1 chemical structure was identified as flavonoid rutin. In the agar diffusion test, we observed the formation of halos in EE and MF only in *Staphylococcus aureus* plates. In the microdilution assay, the EE and FM showed MIC > 1000 mg / mL, considered inactive. In antileishman test, the EE showed IC₅₀ > 200 / ml. The MF and HF also showed IC₅₀ > 200 / ml; however, they inhibited the growth of promastigotes respectively in 20% and 33.7%. The subtractions and G3-1 Group 2 showed IC₅₀ > 200 / ml, but the concentration of 200 / ml inhibited the parasite growth by approximately 45%. The EE, fractions, and subfractions were inactive against *L. amazonensis* amastigotes. However, the HF concentrations of 250 and 125 g / ml inhibited infection in 39.1% and 18.7%. In short, EE and its fractions were shown to be inactive in the antimicrobial and leishmanicide trials, but fractionation contributed to increase activity suggesting that active substances must be at low levels in extract and its fractions.

Key words: Pharmacognostic, phytochemical, antimicrobial activity, leishmanicide activity, *Annona glabra*.

LISTA DE ESTRUTURAS

01	Estibogluconato de sódio	28
02	Antimoniato N-metil glucamina	28
03	Anfotericina B	29
04	Liriodenina	33
05	Alcaloide- β -carbolínico	33
06	Apigenina	33
07	Kaempferol	33
08	Quercetina	33
09	Luteolina	34
10	β -sitosterol	34
11	Estigmasterol	34
12	Uvaricina	34
13	Canfôra	36
14	Borneol	36
15	β -cariofileno	36
16	Friedelina	36
17	Classiflorina	36
18	Desoxicrassiflorina	36
19	Araticulina	36
20	Annobrainina	41
21	Liriodenina	41
22	Lisicamina	41
23	Nornuciferina	41
24	Anonaina	41
25	Nordomesticina	42
26	Stepharina	42
27	Blumenol A	42
28	β -sitosterol	42
29	Estigmasterol	43
30	SS-sitoesteril--D-glucósido	43
31	stigmasteryl-D-glucósido	43
32	Ácido caurenóico	43
33	annoglaxina	43
34	27-hidroxi-bullatacina	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Uso popular e atividades farmacológicas comprovadas de espécies de Annonaceae.	31
Quadro 2	Metabólitos isolados a partir da família Annonaceae.	33
Quadro 3	Metabólitos isolados a partir do gênero <i>Annona</i> .	36
Quadro 4	Metabólitos isolados a partir da espécie <i>Annona glabra</i>	41
Quadro 6	Interpretação dos resultados baseado na faixa do CIM e CI ₅₀ .	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Forma promastigota e amastigota de <i>Leishmania</i> spp	25
Figura 2	Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> spp	26
Figura 3	Hábitat em que pode ser encontrada a espécie <i>A. glabra</i>	39
Figura 4	Cascas dos troncos da <i>Annona glabra</i>	52
Figura 5	Esquema utilizado para o fracionamento do extrato etanólico obtido das cascas de <i>Annona glabra</i> .	58
Figura 6	Cromatograma do Grupo 3 oriundo da fração metanólica obtido extrato etanólico das cascas da <i>A. glabra</i> .	60
Figura 7	Atividade antimicrobiana de <i>A. glabra</i>	62
Figura 8	Pó das cascas de <i>A. glabra</i>	69
Figura 9	Cromatograma das subfrações da fração metanólica obtido das cascas da <i>A. glabra</i> .	73
Figura 10	Estrutura química de um flavonoide com as partes que originam as bandas de absorção características no UV.	73
Figura 11	Perfis cromatográficos e espectros de UV do extrato e suas frações obtido das cascas de <i>A. glabra</i>	76
Figura 12	Cromatograma do Grupo 2 obtido em coluna de Sephadex proveniente da fração metanólica obtido da <i>A. glabra</i> .	77
Figura 13	Perfil cromatográfico e espectros de UV do Grupo 2 proveniente da fração metanólica obtido do extrato etanólico das cascas de <i>A. glabra</i>	78
Figura 14	Cromatograma fração metanólica, Grupo 3 obtido do extrato etanólico das cascas da <i>A. glabra</i> .	79
Figura 15	Perfil cromatográfico e espectros de UV da substância G3 proveniente da fração metanólica (FM) obtido das cascas de <i>A. glabra</i>	80
Figura 16	Espectro ressonância magnética nuclear de ¹³ C da substância isolada (G3-1) a partir da fração Metanólica do extrato etanólico de <i>A. glabra</i> - 300 MHz, CD ₃ OD.	81

Figura 17	Espectro de Ressonância magnética nuclear de ^1H da substância isolada G3-1 da fração metanólica obtido do extrato etanólico de <i>A. glabra</i> – 300 MHz, CD3OD.	84
Figura 18	Espectro de massa obtido por PDA-MS/ESI da substância G-1 obtida da fração metanólica do extrato etanólico da <i>A. glabra</i>	85
Figura 19	Estrutura química da substância G3-1.	86
Figura 20	Difusão em ágar do pó das cascas de <i>A. glabra</i> e suas frações	88
Figura 21	Microdiluição do pó das cascas de <i>A. glabra</i>	89
Figura 22	Efeito da Fração Metanólica (FM) e Fração Hexânica (FH) obtido do extrato etanólico das cascas de <i>A. glabra</i> sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .	92
Figura 23	Efeito da Anfotericina B (controle positivo) sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .	93
Figura 24	Atividade antipromastigota do extrato etanólico obtido das cascas de <i>A. glabra</i> e suas frações contra <i>L. amazonensis</i>	93
Figura 25	Efeito da Anfotericina B (controle positivo) sobre a linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana (THP-1d).	95
Figura 26	Efeito do EE, Fração Metanólica (FM) e Fração Hexânica (FH) obtido do EE de <i>A. glabra</i> sobre a linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana (THP-1d).	95
Figura 27	Ensaio da atividade antiamastigota, mostrando macrófagos não infectados, infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com Anfotericina B.	98
Figura 28	Ensaio da atividade antiamastigota, mostrando macrófagos não infectados, infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com a fração Hexânica (FH) obtida do extrato etanólico da <i>A. glabra</i> .	99
Figura 29	Atividade antiamastigota, mostrando macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o extrato etanólico, frações e subfrações da <i>A. glabra</i> .	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD do extrato etanólico, frações e subfrações obtido da casca da <i>Annona glabra</i>	57
Tabela 2	Frações resultantes da cromatografia em coluna de Sephadex da fração metanólica (FM) obtido do extrato etanólico da casca de <i>A. glabra</i> e agrupamento.	59
Tabela 3	Análise granulométrica	68
Tabela 4	Análise farmacognóstica do pó das cascas de <i>A. glabra</i>	70
Tabela 5	Perfis cromatográficos, rendimento e reunião das frações resultantes do fracionamento em sephadex da fração metanólica obtido do extrato etanólico da casca da <i>A. glabra</i>	72
Tabela 6	Dados das atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C da substância G3-1 isolada a partir da fração metanólica do extrato etanólico de <i>A. glabra</i> e dados da literatura.	84
Tabela 7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Extrato Etanólico e Fração Metanólica do pó das cascas de <i>A. glabra</i>	89
Tabela 8	CIM e CI_{50} do extrato etanólico obtido da casca de <i>A. glabra</i> e suas frações testados em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .	92
Tabela 9	CC_{50} e Índice de seletividade do extrato etanólico, frações, subtrações e substância isolada obtidas da casca da <i>A. glabra</i>	94
Tabela 10	Avaliação da atividade anti-amastigota do EE, suas frações, subtrações e substância isolada obtida das cascas de <i>A. glabra</i> em macrófagos (THP-1d) infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .	98

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Volume de decocto utilizado na preparação da diluição no tubo
CCD	Cromatografia em camada delgada
CC₅₀	Concentração citotóxica 50%
CI₅₀	Concentração inibitória 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CIM	Concentração Inibitória Mínima
D	Densidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCDB	Leishmaniose cutânea disseminada Borderline
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
MS	Ministério da Saúde
n°	Número
OMS	Organização Mundial da Saúde
Rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
Sb⁵⁺	Antimônio pentavalente
SBF	Soro Fetal Bovino
UV	Ultra Violeta
WHO	World Health Organization
p/v	Peso por volume
pH	Potencial hidrogeniônico ou potencial de hidrogênio
mol/L	Mol por Litro
m/v	Massa por volume
v/v	Volume por volume
nm	Nanômetro
UFC/mL	Unidade formadora de Colônia por mililitro
µg/disco	Microgramas por disco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Família Annonaceae e o gênero <i>Annona</i>	30
2.2	<i>Annona glabra</i> L.	39
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	Material	46
4.1.1	EQUIPAMENTOS	46
4.1.2	MATERIAL DE CONSUMO	47
4.1.2.1	Solventes e Reagentes.....	46
4.1.2.2	Meio de Cultura e Outros.....	48
4.1.2.3	Materiais plásticos, de metal e de vidro.....	49
4.1.2.4	Vidrarias.....	49
4.1.2.5	Preparo dos Meios de Cultivo.....	50
4.1.2.5.1	Meio RPMI 1640 para <i>Leishmania</i>	50
4.1.2.5.2	Meio RPMI para cultura de células.....	50
4.1.3	MATERIAL BIOLÓGICO	51
4.1.3.1	Cepas de bactérias.....	51
4.1.3.2	Espécie de <i>Leishmania</i>	51
4.1.3.3	Linhagem celular e cultivo.....	52
4.1.5	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	52
4.2	Métodos	53
4.2.1	PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	53
4.2.2	ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS	53
4.2.2.1	Análise Granulométrica	53
4.2.2.2	Determinação da densidade bruta.....	53
4.2.2.3	Determinação da perda por dessecação.....	54
4.2.2.4	Determinação do teor de cinzas.....	54
4.2.2.5	Determinação do pH.....	55

4.2.2.6	Determinação do índice de espuma.....	55
4.2.3	ESTUDOS FITOQUÍMICOS.....	56
4.2.3.1	Obtenção do extrato etanólico das cascas de <i>A. glabra</i>	56
4.2.3.2	Fracionamento do extrato e análises cromatográficas.....	56
4.2.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	60
4.2.4.1	Teste de difusão em ágar.....	60
4.2.4.2	Método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	61
4.2.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA	63
4.2.5.1	Ensaio da Atividade Antipromastigota.....	63
4.2.5.2	Avaliação da atividade antiamastigota.....	64
4.2.5.2.1	Indução da diferenciação celular e ensaio de viabilidade.....	64
4.2.5.2.2	Ensaio da atividade antiamastigota.....	65
4.2.6	Determinação do Índice de Seletividade (IS).....	66
4.2.7	Análises Estatística dos Dados.....	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1	ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS.....	68
5.2	ESTUDO FITOQUÍMICO.....	71
5.3	Atividades Biológicas.....	87
5.3.1	Atividade antileishmania	90
5.3.1.1	Avaliação da atividade antipromastigota.....	90
5.3.1.2	Avaliação da atividade antiamastigota	94
7	CONCLUSÃO.....	100
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para o tratamento de uma variedade de doenças tem sido realizada desde a antiguidade. As plantas medicinais desempenham papel chave na saúde humana, mesmo com os avanços observados na medicina moderna. Isto porque, significativa parte da população mundial (65 a 80%) tem dificuldade de acesso aos medicamentos. População que reside em países em desenvolvimento e depende essencialmente de plantas medicinais para o tratamento primário de doenças, sendo esta a única alternativa terapêutica de várias comunidades e grupos étnicos (DUARTE, 2006).

Muitos estudos farmacológicos se fundamentam em estudos etnofarmacológicos, isto é, partindo do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas (antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiespasmódica, antitérmica, laxativas, entre outras) de certas drogas vegetais (SCOPEL, 2005).

No entanto, apesar de toda importância atribuída às plantas, o seu potencial é ainda pouco explorado. Segundo estimativas, o número de espécies vegetais superiores pode chegar a 500.000, sendo que destas, apenas 15 a 17% foram investigadas quanto ao seu potencial medicinal (BARROS, 2008). Apenas recentemente estas se tornaram objeto de estudo científico no que concerne às suas variadas propriedades medicinais (NOVAIS et al. 2003). O conhecimento a respeito das propriedades farmacológicas destas é requisito essencial para a transformação do vegetal em um produto fitoterápico. Sendo assim, a pesquisa com plantas medicinais tem sido e continua a ser considerada uma alternativa importante na busca de novas drogas com propriedades terapêuticas (OMS, 2002).

Nas últimas décadas, dentre as atividades farmacológicas, a antimicrobiana vem sendo exaustivamente estudada, devido a problemas sérios relacionados à quimioterapia, enquanto que, a atividade leishmanicida das plantas medicinais vem sendo pouco exploradas e essa também possui graves problemas relacionados ao tratamento (OLIVEIRA et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2006).

Na leishmaniose, o tratamento é feito principalmente com medicamentos à base de antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), introduzidos como quimioterápicos na década de 1940, enquanto anfotericina B e pentamidina são as de segunda escolha na terapêutica. Contudo, a utilização destes fármacos é questionável em virtude da eficácia variável entre as espécies de *Leishmania*, o alto custo, a via de administração parenteral, elevada toxicidade e efeitos adversos como mialgias, nefrites, alterações hepáticas, distúrbios gastrointestinais, respiratórios, cardiovasculares, arritmias fatais e morte súbita (CROFT e COOMBS, 2003; OLIVEIRA et al. 2005). Além disso, há relatos de resistência dos parasitos devido a baixas dosagens e tratamentos descontínuos.

Já nas infecções bacterianas, um dos principais problemas de saúde pública mundial é a crescente resistência dos microrganismos aos fármacos (OMS, 2012). Associado a isto se tem o fato de que a maioria dos fármacos utilizados como antimicrobianos, foram descobertos a mais de 30 anos, e a resistência bacteriana cresce numa velocidade exponencial, já a descoberta de fármacos cresce lentamente podendo chegar um momento no qual poderá não haver mais fármacos para o tratamento de muitas infecções (BERQUIÓ et al. 2004).

Considerando as dificuldades de tratamento, a ausência de vacinas (*Leishmania*) e o crescente aumento de resistências dos parasitas e bactérias aos fármacos disponíveis, há urgência na busca de novas opções terapêuticas dentre as quais se incluem as plantas medicinais (CARVALHO e FERREIRA, 2001; PAULA et al. 2003).

Neste contexto, o Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, visto que, a diversidade de climas e regiões geográficas favorecem o desenvolvimento de uma flora diversificada no qual estão inseridas uma grande variedade de plantas medicinais utilizadas nas mais variadas doenças e que ainda foram pouco estudadas em termos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos (DARABAS et al. 2009).

Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento de infecções bacterianas e das leishmanioses (MOREIRA et al. 2002). Vários estudos vêm demonstrando que espécies ricas em alcalóides (LEBOEUF et al. 1982; SANTOS et a. 1999), acetogeninas (BRINGMANN et al.

1999; YANG et al. 2009) e flavonóides (LEBOEUF et al. 1982; PRADO et al. 2008) são promissoras frente a atividades biológicas como leishmanicida e antimicrobianas (ALALI et al. 1999).

De espécies pertencentes a família Annonaceae já foram isolados alcaloides, acetogeninas e flavonóides (CHANG et al. 1998; OLIVEIRA et al. 2002; CHEN et al. 2004). O extrato de acetato de etila obtido do pericarpo de *Annona muricata* foi mais ativo que o Glucantime® em formas promastigotas de *L. (V) panamensis* (JARAMILLO et al. 2000). A atividade leishmanicida foi atribuída as acetogeninas (VILA-NOVA et al. 2011).

O gênero *Annona* possui várias espécies, entretanto, a maioria não foi submetida a avaliação da atividade leishmanicida e antimicrobiana (COSTA et al. 2009). Um exemplo é a espécie vegetal *Annona glabra* L. (Annonaceae), conhecida como araticum-do-brejo, que já se mostrou promissora no tratamento de doenças parasitárias como malária. Desta já foram isolados alcaloides, flavonóides, diterpenos e acetogeninas (CHANG et al. 1998; OLIVEIRA et al. 2002; CHEN et al. 2004), contudo, esta espécie ainda necessita de informações acerca de seus metabólitos secundários e das suas atividades biológicas leishmanicida e antimicrobiana, o que justifica o estudo deste vegetal no presente trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As doenças infecciosas afetam milhões de pessoas em todo o mundo e ao longo da história da humanidade, sempre representaram uma das principais causas de morte. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças infecciosas representam 26% da mortalidade global estimando-se que cerca de 50.000 pessoas morram a cada dia em todo o mundo por estas doenças (BECKER et al. 2006; CHANDA e RAKHOLIYA, 2011). O problema tem se agravado devido o surgimento de microrganismos (bactérias) resistentes, diminuindo as opções de terapêuticas, sendo de extrema importância o desenvolvimento de novos antimicrobianos para estes agentes (LEVY, 2005; RICE, 2008; REYNOLDS, 2009; ANURADHA et al. 2010).

Uma série de bactérias resistentes aos fármacos de importância para saúde pública tem sido descritas, entre estas encontram-se o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e a *Pseudomonas aeruginosa*. Estas bactérias têm sido associadas a infecções hospitalares de elevada gravidade (WHO, 2015).

O *S. aureus* são cocos (forma esférica) gram-positivos com cerca de 1 µm de diâmetro e formam grupos com aspecto de cachos de uvas. Importante patógeno envolvido na etiologia das infecções humanas, sendo encontrado, como microbiota normal, nas fossas nasais, virilha e axilas. É responsável por diferentes tipos de infecções, a maioria infecções ligeiras da pele e tecidos moles, mas também é agente etiológico de formas graves de pneumonia, endocardites e sepsis (MENEGOTTO e PICOLI, 2007).

As infecções causadas por *S. aureus*, apresentam morbidade e mortalidade elevadas e possui grande facilidade para adquirir resistências aos antimicrobianos. Na década de 1940, a penicilina foi lançada para tratamento de infecções causadas por esse microrganismo (FLEMING, 1929), poucos anos depois vieram os primeiros relatos de *S. aureus* resistentes à penicilina (BARBER, 1947) e um estudo no Reino Unido estimou que 60% dos *S. aureus* isolados eram resistentes a penicilina em 1946 (BARBER e ROZWADOWSKA-DOWZENKO, 1948).

O *S. aureus* metilina resistente (MRSA) é o patógeno nosocomial mais envolvido em infecções hospitalares sendo resistente a ação de vários

antimicrobianos (STRATTON, 2000), como penicilinas, fluoquinolonas, lincosamidas e macrolídeos (HIRAMATSU, 1997).

A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa fermentadora em forma de bastonete curto, que possui metabolismo anaeróbio facultativo e pode apresentar motilidade pela presença de flagelos peritríqueos (SELANDER et al. 1987; KAPER et al. 2004). A *E. coli* encontra-se entre um dos principais agentes causadores das doenças transmitidas por alimentos em humanos (KENN et al. 2006; JOHNSON et al. 2007; RUBEGLIO e TESONE, 2007). Possui distribuição cosmopolita e apesar de pertencer a microbiota normal do trato gastrointestinal, aproximadamente 10% da mesma, é considerada patogênica (SELANDER et al. 1987; JOHNSON e RUSSO, 2005).

Os vários subtipos compreendidos na diversidade patogênica dessa espécie possuem diversos mecanismos de virulência, incluindo hemolisinas (CAVALIERI et al. 1985), adesinas (HAGBERG et al. 1981), invasinas (FLECKENSTEIN et al. 1996), enterotoxinas (PARREIRA e GYLES, 2003), entre outras substâncias, que facilitam nas várias etapas da infecção (KAPER et al. 2004). As linhagens patogênicas podem causar diversos tipos de infecções, como intestinais urinárias (PARREIRA e GYLES, 2003), meningites e outras infecções extra-intestinais (KAPER et al. 2004). Quando as defesas normais do hospedeiro não estão adequadas, a *E. coli* pode atingir a corrente sanguínea e provocar septicemia (SCHAECHTER et al. 2002; KENNEDY et al. 2008).

Apesar dos diversos fatores relacionados à virulência da *E. coli* serem preocupantes à saúde pública, a resistência aos antimicrobianos é o problema mais relevante quanto a contribuição para o aumento das taxas de morbimortalidade no mundo (KENNEDY et al. 2008; IBRAHIM et al. 2012; TALEBIYAN et al. 2014). Nos últimos anos houve um aumento de cepas com resistência aos antimicrobianos (PESSANHA e GONTIJO FILHO, 2001), principalmente em amostras de infecções do trato urinário, associados aos fármacos da classe das cefalosporinas de amplo espectro, como sulfametoxazol-trimetoprima, e as quinolonas/fluoroquinolonas (MELLON et al. 2001), o que torna preocupante para os problemas de infecções urinárias graves e as relacionadas com cateteres urinários (LAUTENBACH et al. 2006).

O *P. aeruginosa* é um bacilo aeróbio Gram-negativo não fermentador de açúcar, pertencente à família Pseudomonaceae. Patógeno oportunista presente

em infecções hospitalares, urinárias e sepse, estando mais suscetíveis pacientes com queimaduras, possui alta mortalidade podendo chegar a 33% em pacientes imunodeprimidos (MARRA et al. 2006).

A epidemiologia de *P. aeruginosa* reflete sua predileção por um meio ambiente úmido, crescendo facilmente em solos, água, plantas e animais (BRITO et al. 2000; ANDRADE et al. 2002). A umidade é um fator crítico em reservatórios hospitalares de *P. aeruginosa*, como: equipamentos de ventilação mecânica, soluções de limpeza, desinfetantes, pias e panos de chão, sendo altamente resistentes à variação de temperatura. Em situações epidêmicas tem sido demonstrada contaminação a partir de fonte comum como respiradores, umidificadores, reservatórios de água e alimentos, assim como transmissão pessoa-pessoa, através das mãos, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTI). Nas UTI neonatal, os pacientes infantis estão constantemente em riscos de infecção por *P. aeruginosa* pela sua imaturidade fisiológica e imunológica (ALEGRE, 2000; MARTINS et al. 2004; MOORE e FLAWS, 2011).

Essa bactéria pode apresentar resistência natural ou adquirida a grande número de antimicrobianos utilizados como: a penicilina, ampicilina, cefalosporina, e adquirida a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, ticarcilina e piperacilina e carbapenêmicos. Os mecanismos envolvidos são: baixa permeabilidade da membrana externa, sistema de efluxo, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, alteração do alvo das fluoroquinolonas e produção de β - lactamases (LI et al.1994; LEHMAN e THOMAS, 2007).

Outro microrganismo que merece atenção especial são os parasitas causadores da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A LTA é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença afeta principalmente as pessoas pobres da África, Ásia e América Latina, e está associada à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, sistema imunológico fraco e falta de recursos (PAHO, 2012; WHO, 2016).

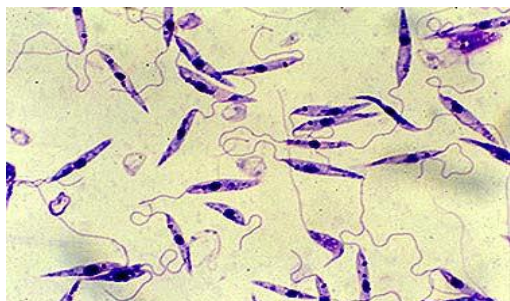
Uma análise recente mostra que mais de 98 países e territórios são endêmicas para LTA. Estima-se que cerca de 7 a 12 milhões de novos casos ocorrem a cada ano em todo o mundo e 350 milhões de pessoas estão ameaçadas de contrair a doença. A leishmaniose cutânea é amplamente distribuída, cerca de um terço dos casos ocorrem em cada uma das três

regiões epidemiológicas, nas Américas, a bacia do Mediterrâneo e Ásia ocidental do Oriente Médio para a Ásia Central. Os dez países com as contagens de casos mais estimados são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Irã, Peru, Sudão e Síria, e, juntos, são responsáveis por 70 a 75% de incidência de LTA no mundo (WHO, 2016).

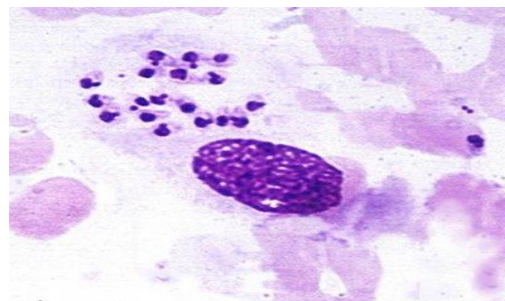
Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, no período de 2000 a 2013, foram registrados 238.749 casos de LTA, com média anual de 26.528 novos casos sendo o Norte e Nordeste as regiões com maiores porcentuais de casos no país com aproximadamente 70% dos casos confirmados nesse período (BRASIL, 2013).

As leishmanioses têm como agentes causadores, parasitas intracelulares obrigatórios capazes de infectar diferentes espécies de mamíferos. Esses microrganismos foram sistematicamente alocados no grupo dos chamados eucariotos protozoários e são taxonomicamente classificados no Reino: Protista, Sub-reino: Protozoa, Filo: Sarcomastigophora, Subfilo: Mastigophora, Classe: Zoomastigophora, Ordem: Kinetoplastida, Sub-ordem: Trypanosomatina, Família: Trypanosomatidae; Gênero: *Leishmania* (LAINSON et al. 1986).

Estes parasitas apresentam duas formas evolutivas durante seu ciclo evolutivo encontrados nas formas flageladas promastigotas (Figura 1A), paramastigotas no trato digestivo de hospedeiros invertebrados (insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos) e amastigota (Figura 1B), sem flagelo livre, parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, que incluem uma grande variedade de mamíferos, entre eles, o homem (GRIMALDI-JR, 1982).



1A



1B

Figura 1 – Forma promastigota de *Leishmania* sp (1A) e forma amastigota de *Leishmania* sp (1B).

Fonte: Brasil, 1994.

O ciclo de vida do parasito é heteroxeno, possuindo hospedeiro vertebrado (principalmente mamíferos) e invertebrado (insetos do gênero *Lutzomyia* sp). A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através do repasto sanguíneo de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, sendo o gênero *Lutzomya* o principal vetor envolvido na transmissão da leishmaniose nas Américas (RIBEIRO, 1987). A fêmea corta com suas mandíbulas o tecido subcutâneo logo abaixo da epiderme, formando sob esta um afluxo de sangue, onde são inoculadas as formas promastigotas metacíclicas provenientes das regiões anteriores do trato digestivo: probóscida, cibário, faringe e esôfago. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, como monócitos, histiócitos e macrófagos. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Figura 2; RIBEIRO, 1987; ANTOINE et al. 1998; CUNNINGHAM, 2002).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduz-se por divisão binária e diferencia-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas, migram então para a probóscide do inseto, onde poderão infectar um novo hospedeiro mamífero. O ciclo do parasita no inseto se completa em torno de 72 horas (Figura 2; RIBEIRO, 1987; SACKS e KAMHAWI, 2001).

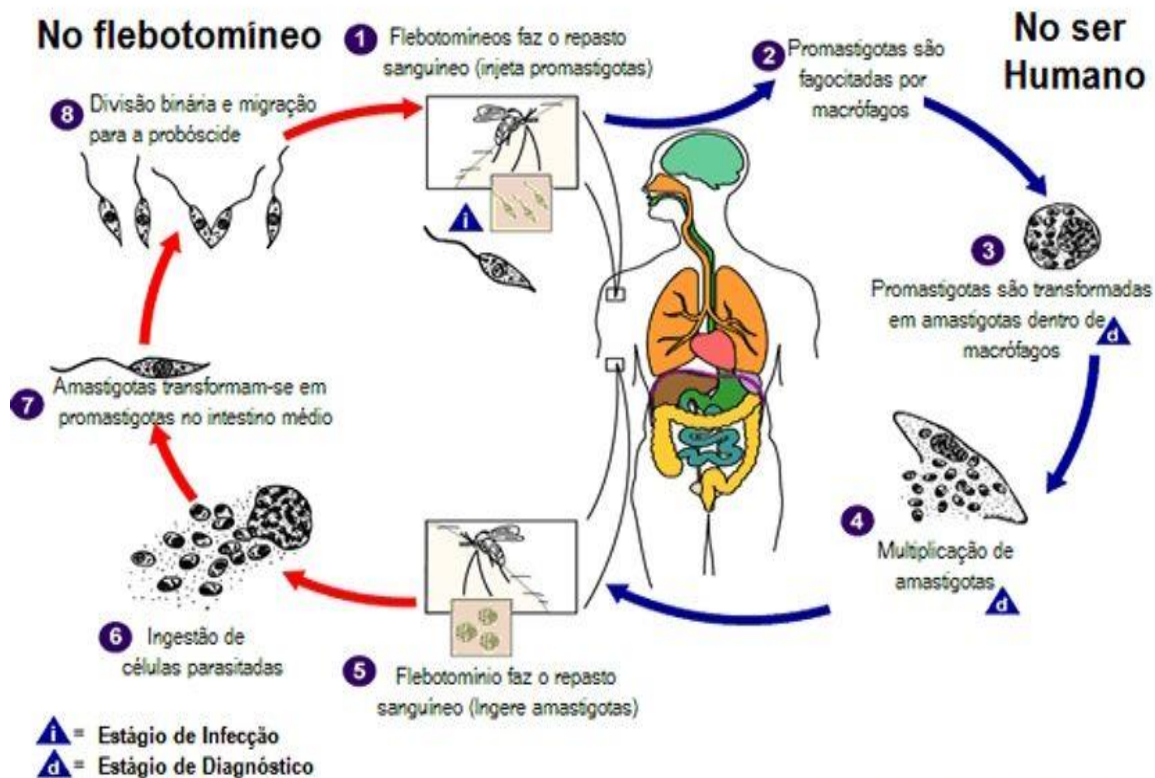


Figura 2: Ciclo de vida do parasita *Leishmania* spp.

Fonte: Adaptado de dpd.cdc.gov.

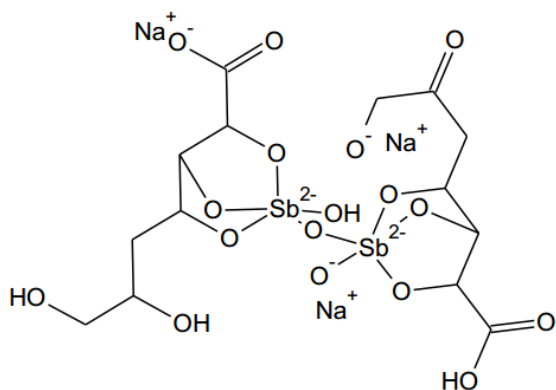
Atualmente, nas Américas o gênero *Leishmania* é agrupado em dois subgêneros, de acordo com o local de adesão e multiplicação dos parasitos no tubo digestivo dos flebotomíneos: as espécies que se desenvolvem no intestino posterior pertencem ao subgênero *Viannia*, enquanto aquelas que se desenvolvem na porção média e anterior do tubo digestivo, pertencem ao subgênero *Leishmania* (GRIMALDI JUNIOR et al. 1989).

No Brasil, foram identificadas sete espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, como causadoras de LTA. Seis espécies pertencem ao subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg* e *L. shawi* e uma espécie pertence ao subgênero *leishmania*: *L. amazonensis* (VIANNA, 1911, BARRET e SENRA, 1989). Esta última é a maior causadora de LTA e é a espécie determinante da leishmaniose cutânea difusa, estando associada a outras manifestações clínicas incluindo leishmaniose cutânea, muco-cutânea, visceral e tegumentar pós calazar (BARRAL et al. 1991; ALEIXO et al. 2006).

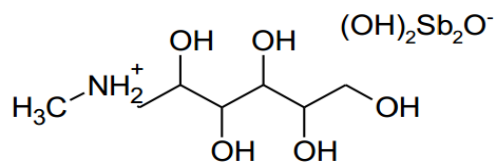
A *L. amazonensis* tem uma vasta distribuição, principalmente pelas florestas tropicais da Região Amazônica, estendendo-se à região nordeste, centro-oeste e sudeste (LAINSON, 1983). Esta espécie é responsável por casos de leishmaniose cutânea localizada (LCL - forma ulcerada, simples), com prognóstico sempre favorável à terapia, menos frequentemente de leishmaniose cutânea difusa (LCD - forma não ulcerada, nodular-infiltrada), uma forma clínica de leishmaniose tegumentar extremamente grave (CONVIT, PINARDI e RONDÓN, 1972) capaz de produzir lesões mutilantes extensas nos pacientes e resistentes a todos os tipos de terapia (SILVEIRA, LAINSON e CORBETT, 2005). Recentemente, uma nova forma intermediária foi descrita, a leishmaniose cutânea disseminada “borderline:” (LCDB), na qual a disseminação do parasito acontece apenas seis meses após a lesão cutânea primária, o número de lesões secundárias é limitado e a resposta terapêutica satisfatória (SILVEIRA e LAINSON e CORBETT, 2004). No Brasil a LCD está associada à *L. amazonensis* (LEON et al. 1990) e o encontro de casos desta forma clínica em novas áreas de transmissão mostra que esta espécie está aumentando sua distribuição (AZEREDO-COUTINHO et al. 2007).

O tratamento da leishmaniose é feito com o objetivo de obter a cura clínica, evitando recidivas e evolução das formas cutâneas para muco-cutâneas, assim, prevenindo o aparecimento de lesões mutilantes. São utilizados fármacos denominados de primeira (antimoniato de N-metilglucamina) e segunda escolha (anfotericina B) (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

O primeiro composto antimonial pentavalente utilizado no tratamento da leishmaniose foi a estibamina uréia, desenvolvida em 1920, seguida do estibogluconato de sódio (1; Pentostam®), em 1936 (RATH et al. 2003). No tratamento da leishmaniose cutânea e visceral utiliza-se o antimoniato de N-metilglucamina (2; Glucantime®), em sua composição (PELLISARI et al. 2011; BRASIL, 2011; GONTIJO e MELO, 2003).



1 – Estibogluconato de sódio



2 – Antimoniato N-metil glucamina

Embora o antimoniato de N-metilglucamina seja eficaz para tratamento da leishmaniose, são necessárias altas doses e regime terapêutico contínuo tendo como consequência graves efeitos colaterais como: artalgias, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos, azia, nefrites, dores abdominais, cefaleia, tontura, edema, alterações hepáticas, problemas cardiológicos, respiratórios e insuficiência renal aguda (REITHINGER et al. 2007; NUNES et al. 2011). Doses mais baixas, inadequadas, ou a descontinuidade do tratamento podem causar desenvolvimento da resistência do parasita (RATH et al. 2003; HALDAR et al. 2011).

O mecanismo de ação dos fármacos antimoniais pentavalentes não foi completamente estabelecido. Entretanto, há evidências de que o antimônio trivalente [Sb (III)] é muito mais potente que o antimônio pentavalente [(Sb (V))] contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*. Sugeriu-se a possibilidade de que o antimônio pentavalente agisse como um pró-fármaco, sendo convertido em antimônio trivalente, no interior dos macrófagos infectados, vindo a interferir na atividade glicolítica e na via oxidativa dos ácidos graxos do parasita e levando a depleção do ATP intracelular (RATH et al. 2003; HALDAR et al. 2011).

Outro mecanismo de ação proposto está relacionado à substituição do zinco de uma metaloprotease zinco-dependente, pelo antimônio, de forma a causar a inativação desta enzima essencial para as formas amastigotas do parasita (HALDAR et al. 2011; RATH et al. 2003).

novos fármacos é de extrema urgência, dentre os quais se incluí metabólitos secundários provenientes de espécies vegetais (CARVALHO e FERREIRA, 2001; ROCHA et al. 2005).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para humanidade. Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento de infecções bacterianas e das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre lesões cutâneas (MOREIRA et al. 2002). Muitos vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, flavonóides, terpenos, chalconas, lignanas, compostos descritos na literatura como eficazes na atividade antibacteriana e leishmanicida (TORRES-SANTOS, 1999; ROCHA et al. 2005). Um exemplo são as espécies vegetais do gênero *Annona* da família Annonaceae e que já demonstraram alto potencial nas atividades descritas. A seguir, será descrita a espécie vegetal investigada neste estudo quanto ao seu potencial antibacteriano e leishmanicida, sendo esta espécie muito utilizada na medicina popular no tratamento dessas enfermidades, cujo nome científico é *Annona glabra*.

2.1 Família Annonaceae e o gênero *Annona*

A família Annonaceae possui cerca de 50 gêneros e mais de 2000 espécies, sendo a maioria, constituída de arbustos e pequenas árvores, das quais, cerca de 119 espécies são descritas para o gênero *Annona* (LEBOEUF et al. 1982). A região amazônica abriga cerca 75% da diversidade de Annonaceae, com 27 gêneros e 280 espécies (CHATROU, 1999; MASS et al. 2009). É quimicamente uma das famílias de plantas tropicais menos estudadas. Entretanto, investigações fitoquímicas e, em menor extensão, farmacológicas vêm se intensificando nos últimos anos (MASS et al. 2009).

As espécies dessa família são utilizados para diversas finalidades, tais quais: material de construção, adubo, os frutos são comestíveis e para ornamentação (SIQUEIRA, 2008; AQUINO et al. 2007) O uso medicinal vai desde tratamento dermatológico, como exemplo edema e emoliente (MACEDO

e FERREIRA, 2004), ao tratamento de outros males como gastrite (VASQUEZ et al. 2014), reumatismo, diarreia crônica, anti-inflamatório (RODRIGUES e CARVALHO, 2001), diabetes (BOSCOLO e VALLE, 2008), hiperlipidemia (SILVA et al. 2010), anticancerígeno (COCHRANE et al. 2008), emagrecedor, antihelmíntico (LIPORACCI e SIMÃO, 2013), calmante, problemas renais (SOUZA e FELFILI, 2006), doenças associadas ao aparelho circulatório MONTELES e PINHEIRO, 2007) e outras descritas no quadro1 abaixo:

Quadro 1: Uso popular e atividades farmacológicas comprovadas de espécies de Annonaceae.

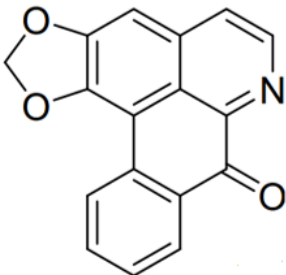
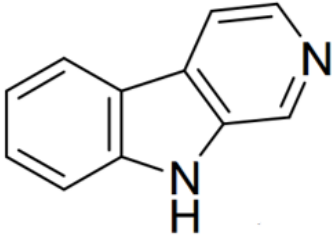
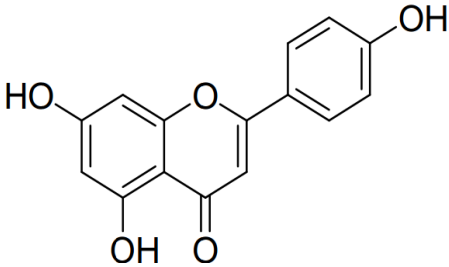
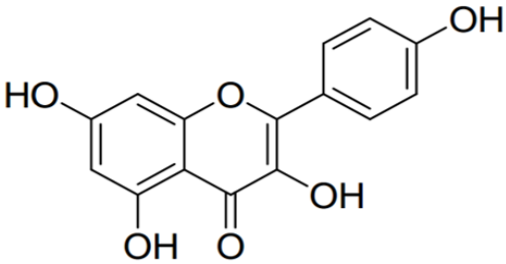
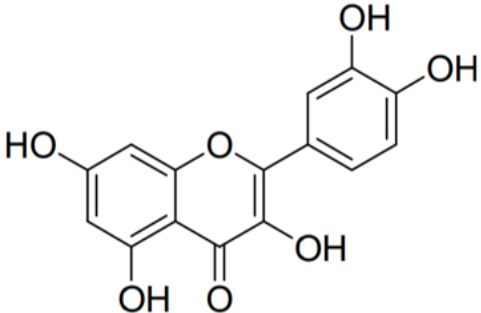
Espécie	Uso Popular	Atividade comprovada	Referência
<i>Annona</i> spp.	Antiparasitário, antitumoral, inseticida, antiviral e antimicrobiano	Antitumoral, Leishmanicida e Antimalárica	LEBOEUF et al. (1982).
<i>Artabotrys hexapetalus</i>	Antimalárico	Antimalárica e Antitumoral	LI et al. (1997)
<i>Enantia chlorantha</i>	Tuberculose, infecções hepáticas e úlceras	Anti-HIV	WAFO et al. (1999)
<i>Guatteria boliviana</i>	Antitérmico e vermífugo	Antiparasitária	MAHIOU et al. (2000)
<i>Guatteria foliosa</i>	Antiparasitário e inseticida	Antimalárica e Antiviral	PAREDES et al. (2001)
<i>Miliusa tomentosa</i>	Analgesico e Antimicrobiana	Analgésica e Antibacteriana	LEBOEUF et al. (1982)
<i>Rollinia mucosa</i>	Antitumoral, enterocolite e antiescorbútica	Antitumoral, Antimicrobiana e Antifúngica	KUO et al. (2001); SHI et al. (1997)
<i>Uvária dependens</i>	Antiparasitário	Antimalárica	NKUNYA et al. (1993)
<i>Uvária klaineana</i>	Antiparasitário	Leishmanicida	AKENDENGUE et al. (1999)

As Anonáceas mostraram grande diversidade química, produzindo várias classes de metabólitos secundários, como alcalóides (LEBOEUF et al. 1982; SCHIFF, 1991; MAHIOU et al. 1994, 2000; TEMPONE et al. 2005; PRADO et al. 2008), acetogeninas (BRINGMANN et al.1999; BERMEJO et al. 2005; YANG et al. 2009), flavonóides (LEBOEUF et al. 1982; PRADO et al. 2008) e diterpenos (LEBOEUF et al. 1982; FOURNIER et al. 1999).

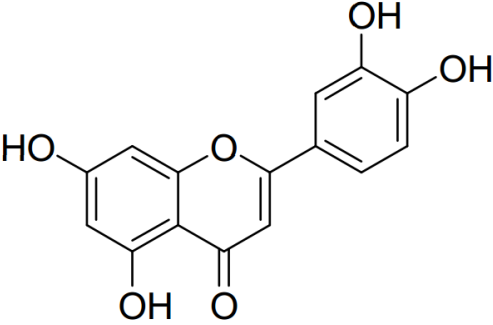
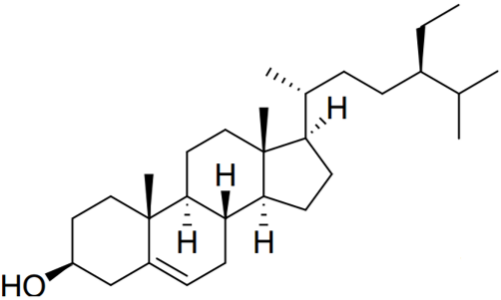
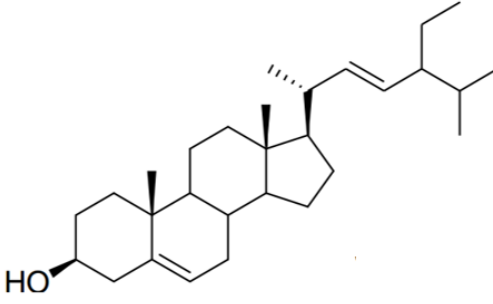
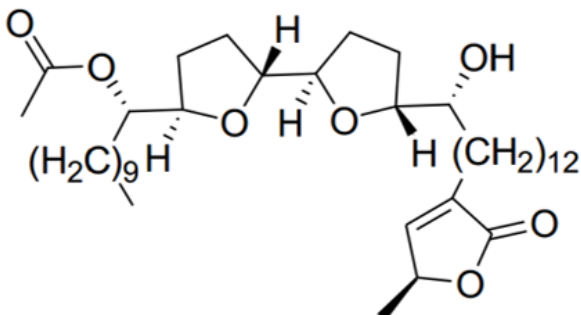
Na família Annonaceae podem ser encontrados alcaloides dos tipos quinolínicos, pirrolizidínicos, piperidínicos, indolizidínicos, piridínicos e isoquinolínicos (SIMÕES e SCHENKEL, 2004). O alcaloide oxoaporfínico liriodenina (4) é o mais encontrado em espécies da família Annonaceae (Quadro 2) (YANG et al. 1991; CHEN et al. 2001). Os de ocorrência menos comum são os alcaloides β -carbolínicos (5) (Quadro 2) (WANG et al. 2002).

Quanto aos compostos fenólicos, na família Annonaceae os de maior ocorrência são os flavonóides (SIMÕES e SCHENKEL, 2004). Flavonoides como O- glicosídeos de apigenina (6), kaempferol (7), quercetina (8), e luteolina (9) foram detectados em espécies da família Annonaceae (SANTOS e SALATINO, 2000). Entre os esteroides, os dois de ocorrência muito comum em Annonaceae são o β -sitosterol (8) e o estigmasterol (9) (Quadro 2) (LEBOEUF et al. 1982). Segundo BERMEJO et a. (2005), já foram isoladas 417 acetogeninas na família Annonaceae, destas, 176 foram relatadas no período de 1998 a 2004, sendo que a predominância dos compostos descritos era para espécies de *Annona*. A primeira acetogenina de anonácea, a uvaricina (10) foi isolada das raízes de *Uvaria acuminata* (Quadro 2) (JOLAD et al. 1982).

Quadro 2: Metabólitos isolados a partir da família Annonaceae.

Metabólitos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
Liriodenina (4)		<i>A. cherimolia</i> <i>A. bulata</i>	Folha, caule, casca e semente	YANG et al. (1991); CHEN et al. (2001).
Alcalóide β-carbólico (5)		<i>A. montana</i>	Folha	WANG et al. (2002).
Apigenina (6)		<i>A. classiflora</i>	Folha	SANTOS e SALATINO, (2000).
Kaempferol (7)		<i>A. classiflora</i>	Folha	SANTOS e SALATINO, (2000).
Quercetina (8)		<i>A. dioica</i>	Folha	SANTOS e SALATINO, (2000).

Quadro 2: Metabólitos isolados a partir da família Annonaceae (Cont.)

Metabólitos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
Luteolina (9)		<i>A. tomentosa</i>	Folha	SANTOS e SALATINO, (2000).
B-sitosterol (10)		<i>A. muricata</i> <i>A. senegalensis</i> <i>A. squamosa</i> <i>A. classiflora</i>	Folhas, Semente, casca, raiz e fruto.	LEBOEUF et al. 1982); PIMENTA, (1995)
Stigmasterol (11)		<i>A. muricata</i>	Folha	LEBOEUF et al. 1982).
Uvaricina (12)		<i>Uvaria accuminata</i>	Raiz	JOLAD et al. (1982).

Entre os gêneros desta família, destaca-se o gênero *Annona*, que possui muitos metabólitos secundários importantes.

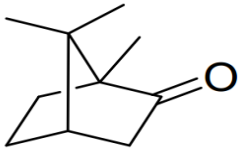
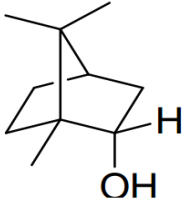
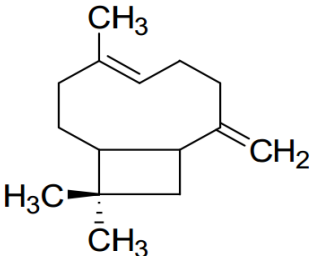
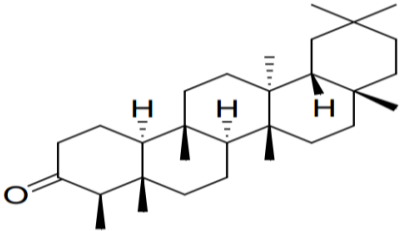
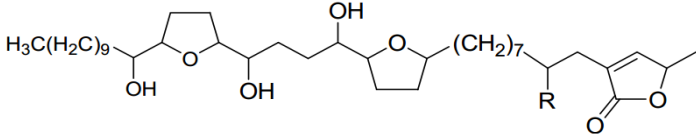
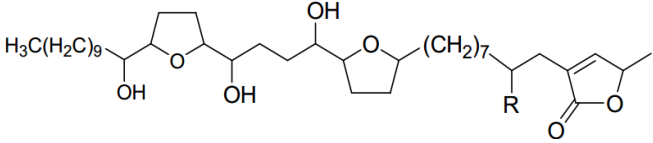
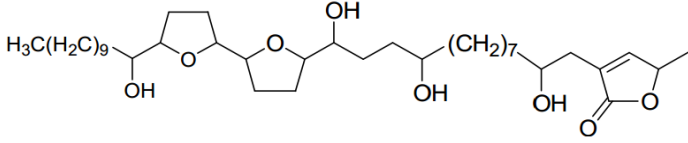
O uso tradicional deste gênero é o mais variado possível, cujas espécies podem ser usadas como plantas medicinais ou para obtenção de madeira, como é o caso da *Annona crassiflora* que é usada, também, como planta ornamental, corticeira ou como alimento (AQUINO et al. 2007). A infusão das folhas da *Annona muricata* é usada para o tratamento do câncer, para emagrecer, falta de ar e também para diabetes; já a *Annona squamosa* é utilizada para anemia e verminoses (BOSCOLO, 2013; LIPORACCI e SIMÃO, 2013), além de ambas demonstrarem atividade antimicrobiana e antilheishmania em estudos anteriormente realizados (VIEIRA, 2010; RABELO et al. 2014).

Vários estudos têm demonstrado grande quantidade de compostos de natureza química diversificada nas mais variadas partes da planta deste gênero. Os principais grupos de compostos químicos presentes em extratos preparados de cascas (CHEN et al. 2000), folhas e frutos (CHANG et al. 1998) são os alcalóides, flavonóides, as acetogeninas e os diterpenos (CHEN et al. 2004; OLIVEIRA et al. 2002). Na China, por exemplo, a espécies de *Annona* são amplamente cultivadas e utilizadas como inseticida e parasiticida (CHEN et al. 2004). Nesse contexto, as acetogeninas anonáceas já demonstraram atividades anti-helmíntica, antimalárica, antimicrobiana e antiprotozoária, além de ser tóxica para células tumorais (CHANG et al. 1998).

Os monoterpenos canfôra (13) e borneol (14) foram encontrados em raízes e casca de *A. squamosa* (LEBOEUF, 1982), Bohlmann e Rao, (1982) isolaram das raízes de *A. squamosa* um sesquiterpeno, o β -cariofileno (15) (Quadro 3).

Friedelina (16) um triterpeno, foi encontrado nas folhas de *A. squamosa* (BHAUMIK et al. 1979). β -sitosterol tem sido frequentemente encontrado em folhas de *A. muricata* e *Annona senegalensis*, nas sementes, casca e raízes de *A. squamosa*, frutos e sementes de *Annona cherimolia* (LEBOEUF, 1982) e em *A. crassiflora* (PIMENTA, 1995). Em outro estudo, das sementes de *A. crassiflora* foram isoladas três acetogeninas, a crassiflorina (17), a desoxicrassiflorina (18) e a araticulina (19) (Quadro 3) (PIMENTA, 1995).

Quadro 3: Metabólitos isolados a partir do gênero *Annona*.

Metabólitos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
Cânfora (13)		<i>A. squamosa</i>	Raíz e casca	LEBOEUF, (1982)
Borneol (14)		<i>A. squamosa</i> <i>A. muricata</i>	Raíz e casca	LEBOEUF, (1982).
β -cariofileno (15)		<i>A. squamosa</i>	Raíz	BOHLMANN E RAO, (1982).
Friedelina (16)		<i>A. squamosa</i>	Folha	BHAUMIK et al. (1979)
Crassiflorina (17)		<i>A. classiflora</i>	Semente	PIMENTA, (1995).
Desoxicrassiflorina (18)		<i>A. classiflora</i>	Semente	PIMENTA, (1995).
Araticulina (19)		<i>A. classiflora</i>	Semente	PIMENTA, (1995).

Várias atividades biológicas já foram comprovadas de extratos, substâncias isoladas, óleos voláteis de espécies de *Annona*.

Das sementes de *A. squamosa* foi isolada uma acetogenina triidroxilada com dois anéis tetraidrofurânicos e anel lactônico α,β -insaturada de 37 átomos de carbono, dotada de propriedades antihelmínticas contra *Haemonchus contortus*, principal nematódeo de ovinos e caprinos. Esta substância mostrou ação leishmanicida frente formas promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* e atividade antibacteriana (VILA-NOVA et al. 2011).

A fração de alcalóides totais das folhas de *A. coriácea* Mart. revelaram atividade em formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, com CI_{50} de 41,6 $\mu\text{g/mL}$. Em formas amastigotas, causaram a morte de 27,2% dos parasitas, à concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ (TEMPONE et al. 2005)

A fração alcaloídica, obtida a partir dos extratos em diclorometano e em metanol de *A. foetida* Mart., apresentou atividade frente às formas promastigotas de *L. braziliensis* e de *L. guyanensis* tendo sido mais ativo, nestas últimas (COSTA et al. 2006).

Do extrato etanólico obtido das cascas do caule e das raízes de *A. spinescens* Mart. e do extrato etanólico das cascas de *A. foetida* foram isolados os alcalóides liriodenina (...) e anonaína (...) e estes alcalóides foram submetidos a avaliação da atividade antipromastigota em *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. donovani*. A anonaína foi a mais ativa do que a liriodenina, frente às duas primeiras espécies, tendo causado 100% de morte, respectivamente, nas concentrações de 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a liriodenina apresentou o mesmo nível de atividade, frente às 3 espécies, à concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, contra *L. guyanensis* apresentou melhor resultado com CI_{50} de 21,5 $\mu\text{g/mL}$. A anonaína também foi mais ativa que o fármaco de referência Glucantime[®], para os mesmos parasitas (QUEIROZ et al. 1996; COSTA et al. 2006)

O extrato etanólico das folhas de *A. muricata* foi submetido ao fracionamento, sendo isolados o alcalóide benzilisoquinolínico O-metilamepavina e três acetogeninas. O alcalóide teve valores similares de CI_{50} , frente às formas circulantes e teciduais de *L. (L.) infantum chagasi in vitro*. Além disto, foi menos citotóxico que as acetogeninas e os fármacos pentamidina e Glucantime[®] em células RAW 264,7 de mamífero (VILA-NOVA et al. 2011).

O óleo volátil de *A. foetida* demonstrou atividade frente às formas promastigotas de quatro espécies de *Leishmania*, tendo sido mais ativo em *L. guyanensis* (CI₅₀: 4,1 µg/mL) (COSTA et al. 2009). O óleo volátil de *A. coriácea* mostrou-se mais ativo nas formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (CI₅₀: 39,93 µg/mL) em comparação com aquelas de *L. (L.) amazonensis* (CI₅₀: 160,2 µg/mL), *L. (V.) braziliensis* (CI₅₀: 261,2 µg/mL) e de *L. (L.) major* (CI₅₀: 305,2 µg/mL) (SIQUEIRA et al. 2001, SIQUEIRA, 2010).

Em uma revisão, um levantamento foi feito referente as atividades biológicas observadas em alcaloides aporfínicos e proaporfínicos, entre os alcaloides já isolados no gênero *Annona*, a anonaína e a estefarina apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Bacillus cereus*, a glaziovina apresentou atividades sobre *E. coli* (RIOS et al. 1988).

O extrato etanólico e hidroalcólico provenientes das folhas da *A. classiflora* apresentaram atividade contra as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Bacillus cereus*), Gram-negativas (*E. coli* e *Salmonella typhimurium*), e a levedura (*Candida albicans*) (LAGE et al. 2011).

Os alcalóides anolobina, nornantenina e a lanuginosina, também encontradas do gênero *Annona*, apresentaram atividade antimicrobiana sobre a bactéria *Salmonella typhimurium* (RIOS et al. 1988).

Flavonoides como quercetina e O-glicosídeos de quercetina apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias *S. aureus* e *Streptococcus mutans* (FEHLBERG et al. 2009).

2.2 *Annona glabra* L.

A *Annona glabra* é originária da América tropical e oeste africano e pode ser encontrada em locais alagadiços das regiões tropicais e subtropicais, como a Florida. Esta espécie tem ocorrência na América do Norte, América Central, América do Sul e Oeste da América. No Brasil, esta espécie ocorre em todo o território, principalmente em regiões costeiras ao longo das margens de lagos,

pois necessitam de solos úmidos ou em regiões periodicamente ou permanentemente inundadas (Figura 3) (CROAT, 1978).

A presença de raízes adventícias, aerênquima nas raízes e na base do caule, frutos flutuantes e sementes que se dispersam pela água são adaptações desta espécie a este tipo de ambiente (CROAT, 1978). No Brasil, é popularmente conhecida como araticum-do-brejo, araticum-bravo, araticum-da-lagoa, anona-lisa, entre outros; e em inglês, pond apple. (LORENZI et al. 2006).



Figura 3: Hábitat em que pode ser encontrada a espécie *A. glabra*
Fonte: Stephen Brown, (2013).

Popularmente a *A. glabra* é utilizada, principalmente, como fonte de madeira para carpintaria, caixotaria, ripas, mastros e remos de pequenas embarcações. As raízes são utilizadas como cortiça (FONSECA-KRUEL e PEIXOTO, 2004). Além disso, segundo Lobão et al. (2005) os frutos são comestíveis e utilizados, também, como maturativos e anti-helmínticos. Essa espécie tem demonstrado conter grande quantidade de compostos de natureza química nas suas várias partes (OLIVEIRA et al. 2008; SIEBRA et al. 2009).

Na medicina tradicional é usado como um inseticida e um parasiticida (PADMAJA et al. 1995; YANG et al. 1995). Outros estudos mostram que a *A.*

glabra é usada popularmente como larvicida, sendo suas potencialidades comprovadas pelos extratos etanólico de casca, que mostrou atividade contra larvas de *Aedes aegypti* (MENDONÇA et al. 2005).

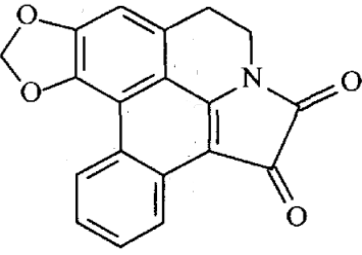
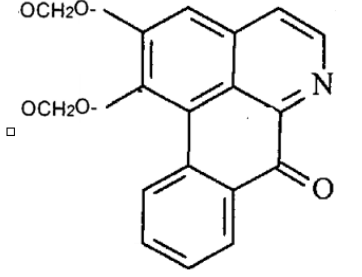
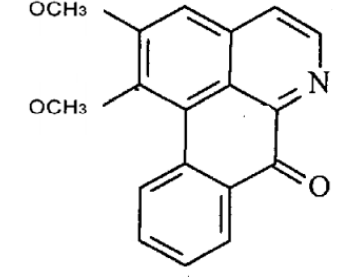
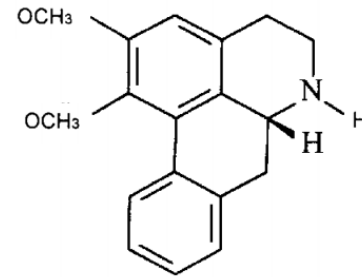
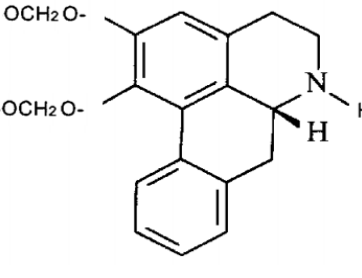
Análises fitoquímicas desta espécie a partir de extratos preparados das cascas (CHEN et al. 2000), folhas e frutos (CHANG et al. 1998) revelaram a presença de várias classes de metabólitos secundários, tais como diterpenos, acetogeninas, esteroides, oxoaporfinas e flavonoides.

Das folhas, frutos e casca desta planta já foram isolados: annobrainina (20), liriodenina (21), lisicamina (22), nornuciferina (23), anonaina (24), nordomesticina (25), stepharina (26), blumenol A (27), β -sitosterol (28), estigmasterol (29), SS-sitoesteril--D-glucósido (30), stigmasteryl-D-glucósido (31) (Quadro 4) (CHANG et al. 1998; CHEN et al. 2000).

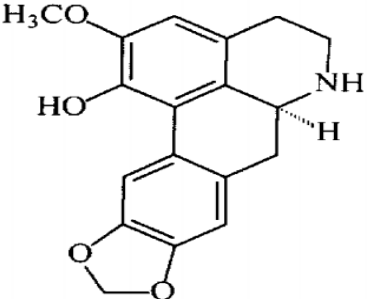
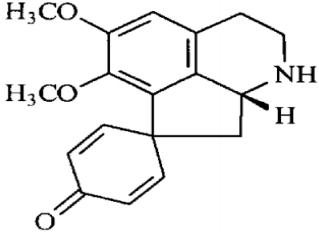
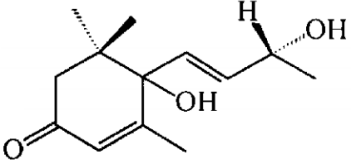
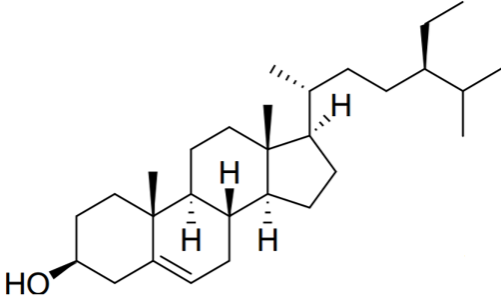
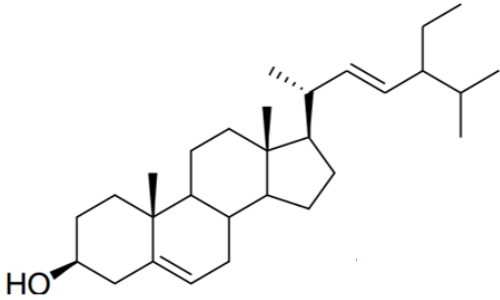
Estudos já demonstraram atividades biológicas importantes desta espécie, a exemplo do extrato metanólico de frutos frescos da *A. glabra* que possuem diterpenóides que inibem significativamente a replicação do HIV em linfócitos H9 (CHANG et al. 1998).

Outro exemplo de diterpeno muito importante isolado de *A. glabra* é o ácido caurenóico (32), ou ácido caur-*ent*-16-en-19-oico (Quadro 4) (HSIEH et al. 2004; CRUZ et al. 2011). Estudos realizados com esta substância demonstraram as seguintes atividades biológicas: relaxante da musculatura lisa vascular aórtica de ratos (TIRAPELLI et al. 2004), analgésico (BLOCK et al. 1998), tripanosomicida (ALVES et al. 1995; VIEIRA et al. 2002), inibição da replicação do vírus *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) em linfócitos (CHANG et al. 1998), agente citotóxico (COSTA-LOTUFO et al. 2002; ZHANG et al. 2004), agente anti-inflamatório (PAIVA et al. 2002) e antimicrobiano (PADMAJA et al. 1995; VELIKOVA et al. 2000).

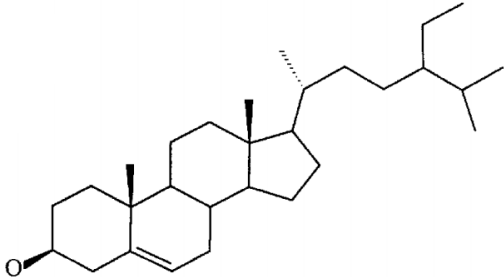
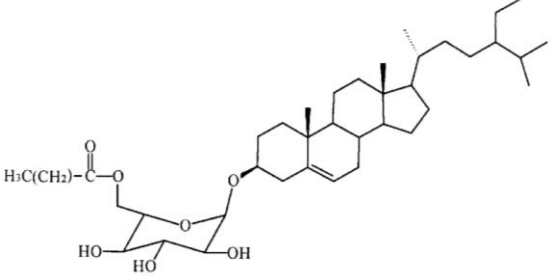
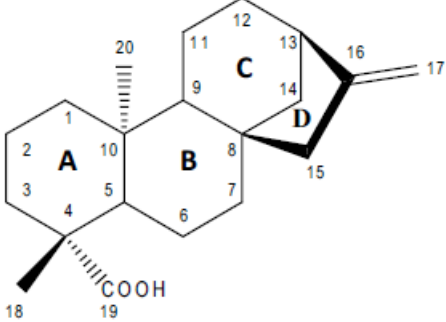
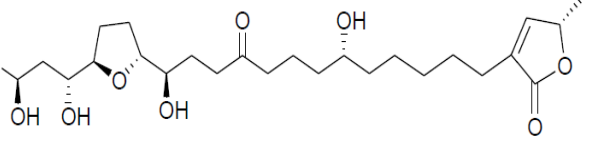
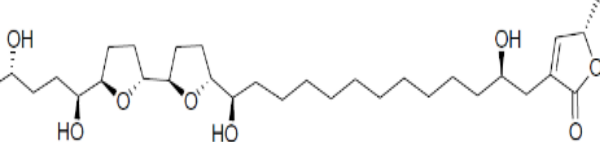
Quadro 4: Metabólitos isolados a partir da espécie *Annona glabra*.

Metabólitos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
Annobrainina (20)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).
Liriodenina (21)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).
Lisicamina (22)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).
Nornuciferina (23)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).
Anonaina (24)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).

Quadro 4: Metabólitos isolados a partir da espécie *A. glabra* (Cont.).

Metabólitos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
Nordomesticina (25)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).
Stepharina (26)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).
Blumenol A (27)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).
β-sitosterol (28)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).
Estigmasterol (29)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).

Quadro 4: Metabólitos isolados a partir da espécie *A. glabra* (Cont.)

Metabólitos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
SS-sitoesteril--D-glucósido (30)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).
Stigmasteryl-D-glucósido (31)		<i>A. glabra</i>	Folha e fruto	CHANG et al. (1998); CHEN et al. (2000).
Ácido caurenóico (32)		<i>A. glabra</i>	Folha e casca	HSIEH et al. (2004); CRUZ et al. (2011)
annoglaxina (33)		<i>A. glabra</i>	Folha	LIU et al. (1999)
27-hidroxibullatacina (34)		<i>A. glabra</i>	Folha	LIU et al. (1999)

As acetogeninas annoglaxina (33) e 27-hidroxibullatacina (34), isoladas de *A. glabra*, mostraram atividade tóxica sobre células tumorais de mama, rim, próstata e pâncreas (Quadro 4) (LIU et al. 1999) e sobre linhagem celular de hepatoma humano, sendo esta ação causada pela diminuição do potencial transmembrânico de mitocôndrias, induzindo a morte celular (apoptose) (CHEN et al. 2004).

Em outro estudo, acetogeninas isoladas de folhas e da casca da *A. glabra* apresentaram diversas propriedades biológicas, incluindo antitumorais, pesticidas, antimalárico, antifúngico e antihelmintico (PADMAJA et al. 1995). Diterpenóides com atividades antitumorais também foram registrados por Zhang et al. (2004).

Estudos de atividade leishmanicida e antimicrobiana ainda são escassos acerca dessa espécie o que enfatiza a importância da investigação fitoquímica e de atividade biológica deste vegetal contra leishmaniose e infecções bacterianas. Assim, a grande diversidade dos constituintes químicos da família Annonaceae e do gênero *Annona* e as respectivas atividades biológicas citadas anteriormente, levaram a espécie vegetal *A. glabra* a ser investigada no presente trabalho.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

- Realizar estudos farmacognósticos, fitoquímicos e avaliar a atividade antimicrobiana e leishmanicida do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas da casca da *Annona glabra* L. (Annonaceae).

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar, em termos farmacognósticos, o pó da casca de *A. glabra*;
- Isolar e identificar o componente majoritário da *A. glabra*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e suas frações;
- Avaliar a atividade antipromastigota do extrato, frações e substâncias puras da *A. glabra* frente a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*;
- Avaliar a atividade anti-amastigota do extrato, frações e substâncias puras da *A. glabra*;
- Determinar a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) do extrato, frações e substâncias puras frente a macrófagos humanos *in vitro*;
- Determinar o índice de seletividade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético mini com aquecimento - Quimis;
- Autoclave 75 L - Phoenix;
- Balança analítica – Bioprecisa, modelo FA2104 N Eletronic Balance;
- Banho-maria – SOLAB Científica, modelo SL 150;
- Banho de Ultrassom – Tecnal Equipamentos para laboratório, modelo 2210 Branson.
- Cabine de fluxo laminar vertical – Pachane, modelo PA 310;
- Câmara de contagem de Neubauer espelhada – Improved.
- Capela – Quimis;
- Centrifuga refrigerada – Cientec Equipamentos para Laboratório, modelo CT-600R;
- Contador manual de células – DIGETIMER;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE-DAD), modalidade analítica, equipado com injetor automático, mod. 2695; detector de arranjos de diodos (DAD) - Waters®;
- Dessecador de vidro;
- Destilador de água;
- Estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) – Byosistens com Importadora e Exportadora de Equipamentos para Laboratório LTDA, modelo HF212 UV;
- Espectrofotômetro – Biospectro SP 220;
- Espectro de Ressonância Magnética Nuclear - Mercury 300 (VARIAN);
- Estufa – Medicate Produtos Médicos, modelo Md 1.2;
- Evaporador rotatório, Fisatom;

- Forno Mufla – Forlabo nº 2750;
- Geladeira – Electrolux;
- Incubadora CO₂ – Ultrasafe, modelo Hf212 UV;
- Leitor de Microplacas – Biotek, modelo ELX 808;
- Micropipetas, volume ajustável de 10-100 µL e de 100-1000 µL – Paguepet;
- Micro-ondas – Esmaltec;
- Microscópio Óptico Eclipse, modelo E200-NIKON;
- Percolador;
- Phmetro de bancada – Quimis Q400RS;
- Sistema de filtração a vácuo 250 mL, membrana 0,22 µm- TPP – Switzerland;
- PDA-MS/ESI - WATERS® ACQUITY® TQD System.

4.1.2 MATERIAL DE CONSUMO

4.1.2.1 Solventes e Reagentes

- Acetato de etila P.A - Isofar Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos;
- Álcool Metílico (Metanol) – CAQ (CASA da Química Indústria e Comércio LTDA);
- Álcool grau 96°GL (Álcool Etílico hidratado) – Santa Cruz LTDA;
- Diclorometano P.A – Isofar Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos.
- Hexano P.A – CAQ (CASA da Química Ind. E Com. LTDA).
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) – Sigma-Aldrich.

4.1.2.2 Meio de Cultura e Outros

- Ágar Cetrimida – Himedia;
- Ágar MacConkey – Himedia;
- Ágar Manitol – Himedia;
- Ágar Muller-Hinton – Kasvi;
- Anfotericina B 50 mg sol. Inj – Cristália produtos farmacêuticos.
- Bicarbonato de sódios – Sigma-Aldrich
- Caldo Muller Hinton – Kasvi;
- Clorafenicol 1 g pó (suspensão);
- Cloreto de sódio P. A – Cromoline química fina Ltda
- Corante Azul de Tripán em solução (0,4%V/100 mL) testado para cultura de células – Sigma Aldrich.
- Corante Giemsa – Dinâmica química contemporânea Ltda.
- Fosfato de sódio monobásico anidro P. A – Labsynth .
- Fosfato de sódio dibásico anidro P. A - Labsynth
- Gentamicin (Sulfato de Gentamicina) 80 mg/2mL solução injetável – NovaFarma Indústria Farmacêutica LTDA
- Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) com glutamina e 25 MM HEPES, isento de bicarbonato de sódio – Sigma-Aldrich.
- Bicarbonato de sódio - Sigma-Aldrich.
- MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)- 2,5-difeniltetrazolium 500 mg - Sigma-Aldrich.
- Penicilina G - Sigma-Aldrich.
- Propilenoglicol – Vital especialidades.
- Sephadex – LH20;
- Sílica gel para cromatografia em coluna fina – Macherey-Nagel®.
- Soro bovino fetal – Gibco.

4.1.2.3 Materiais plásticos, de metal e de vidro

- Alças em poliestireno calibradas descartáveis – J. Prolab;
- Algodão hidrófobo;
- Cuba cromatográfica.
- Cubeta de quartzo;
- Disco de papel de filtro;
- Espátulas de metal;
- Espalhador;
- Estantes plásticas;
- Garrafas para cultura de células 75 cm² – TPP – Switzerland
- Garrafas para cultura de células 25 cm² – SPL Life Sciences;
- Lamínula 13 mm circular G13C – Glasscyto;
- Pinça de alça inox;
- Placas de cultura de células de 24 poços - TPP;
- Placas de cultura de células de 96 poços, – TPP;
- Placas de Petri descartáveis/poliestireno 90x15 mm – Labware;
- Ponteira 200 µL amarela, tipo universal – Labware Manufacturing CO;
- Ponteira 100-1000 µL, azul, tipo universal – Kartell S. P. A.;
- Swabs estéreis – J. Prolab;
- Tubo cônico de 1,5 mL e 2,0 mL – Eppendorf;
- Tubo cônico graduado 15 mL estéril (Tipo Falcon) - Becton-Dicknson;
- Tubo cônico graduado 50 mL estéril (Tipo Falcon) – Becton-Dicknson;
- Tubos de microcentrifuga (Tubos eppendorf) de 1,5 mL – Kartell SPA;

4.1.2.4 Vidrarias

- Balão volumétrico de 250 mL, 500 mL, 100 mL – Laborquimi;
- Bastão de vidro.
- Becker de 600, 1000 mL – Satelit.

- Coluna cromatográfica;
- Erlenmeyes de 250, 2000 mL – Vidrolabor.
- Funil de separação de 1000 mL – Schott Duran.
- Pipetas de vidro graduadas de 1 mL, 5 mL, 10 mL – Vidrolabor.
- Pipeta Pausteur descartável –
- Proveta de 50 mL, 200 mL, 500 mL, 100 mL – Vidrolex.

4.1.2.5 Preparo dos Meios de Cultivo

4.1.2.5.1 Meio RPMI 1640 para *Leishmania*

O conteúdo de um frasco (10,4 g) em pó do meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) foi dissolvido em água ultrapura (1000 mL) sob agitação, adicionado de bicarbonato de sódio (2 g), tampão HEPES (5g), penicilina 10.000 U/L e 50 mg/L de gentamicina. O pH do meio foi verificado e ajustado sempre quando não se encontrava em pH neutro (pH= 7,2). O meio foi esterilizado em membrana de 0,22 µm e acondicionado em frascos estéreis a 4°C (VEIGA, 2013).

4.1.2.5.2 Meio RPMI para cultura de células

O conteúdo de um frasco (10,4) em pó do meio RPMI 1640 foi reconstituído em água ultrapura (1000 mL) adicionado de 12,5 mM de tampão HEPES, 2 mM Glutamina, 1mM de Piruvato de Sódio, 100.000 U/L de penicilina, 50 µg/L de gentamicina, pH ajustado a 7,4, e esterilizado por filtração sob pressão com membrana de acetato de celulose estéril com poro de 0,22 µm e acondicionado em frascos estéreis a 4°C.

4.1.3 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.3.1 Cepas de bactérias

Para os testes da atividade antibacteriana foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC), recomendadas para testes antimicrobianos da FIOCRUZ e cedidas pelo Laboratório Central do Pará (LACEN/PA). Os microorganismos são: *Staphylococcus aureus* ATCC 29.213, *Escherichia coli* ATCC 25.922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.853.

4.1.3.2 Espécie de *Leishmania* e cultivo

O parasita utilizado no presente estudo foram formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, isolada de caso humano procedente do município de Ulianópolis do estado de Pará cedido pelo Instituto Evandro Chagas (ICE, Ananindeua/Pará) sob o registro – MHOM/BR/2009/M26361.

As formas promastigotas da espécie *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas no meio de crescimento Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), sendo mantidas através de passagens semanais como descrito. Foram transferidos 0,5 mL de suspensão de formas promastigotas para garrafas de cultura de células, cada uma contendo 5 mL de meio RPMI completo. Em seguida, observou-se o cultivo em microscópio invertido para verificação da viabilidade das formas em meio RPMI. O cultivo do parasita em meio RPMI completo foi feito a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.1.3.4 Linhagem celular e cultivo

A linhagem celular de leucemia monocítica humana aguda (THP-1) utilizada nos experimentos biológicos *in vitro*, foi adquirida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) em 28/05/2015 (Lote 000125).

A linhagem foi cultivada em garrafas de cultura de 75 cm² contendo 12 mL meio RPMI 1640 completo (10% de soro fetal bovino) incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. A linhagem foi mantida através de repiques no 3º ou 4º dia de crescimento e reinoculadas a uma densidade de 3x10⁵/mL. O número de células viáveis foi determinado pelo teste de exclusão do azul de trypan (0,02%), quantificado em Câmara de Neubauer e ajustado a uma concentração desejada. Para os experimentos, utilizou-se células com máximo de 15 passagens.

4.1.5 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

No presente estudo foram utilizadas cascas dos troncos da espécie *A. glabra*, coletadas na rodovia estadual Alça Viária, próximo ao município de Abaetetuba, estado do Pará, em abril de 2014. O material foi coletado e identificado pela Dra. Márlia R. F. Coelho (Museu Paraense Emílio Goeldi) e a exsicata encontra-se no herbário do referido museu sob o registro – MG176948.



Figura 4: Cascas dos troncos da *Annona glabra*.

4.2 Métodos

4.2.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi lavado em água corrente para retirada do limo e da cortiça presente em suas cascas. Posteriormente, as cascas foram lavadas com álcool 70° GL. A secagem foi realizada em estufa de ar circulado a 40°C por 7 dias. Após seco, o material vegetal foi levado para moagem em moinho de facas até a sua pulverização.

4.2.2 ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS

4.2.2.1 Análise Granulométrica

Cerca de 25 g do pó das cascas de *A. glabra* foram postos sobre um conjunto de tamises com abertura nominal de 1,70 mm, 710 µm, 355 µm, 250 µm, 180 µm e 125 µm, contendo tampa e fundo coletor. O conjunto de tamises foi colocado em agitador eletromagnético para tamises e submetidos à passagem forçada por vibração na escala 7 do aparelho, durante 30 min. Após estes experimentos, realizou-se a pesagem das frações retiradas dos tamises e do fundo coletor. O tamanho das partículas foi determinado pela quantificação percentual de retenção do pó. Este procedimento foi repetido 3 vezes (BRASIL, 2010).

4.2.2.2. Determinação da densidade bruta

A análise da densidade bruta do pó das cascas de *A. glabra* foi realizado através do método da proveta, que consiste em transferir o pó vegetal para uma proveta previamente pesada com capacidade de 25 mL, completando o volume

com o pó da planta até 15 mL. Durante a transferência, teve-se o cuidado de retirar as partículas de ar. A proveta com o pó completamente compactado foi novamente pesado e através da diferença de pesos entre a proveta vazia e a proveta com o pó, chegou-se à quantidade de pó contida na proveta. A obtenção do peso do pó se deu pela diferença entre o peso da proveta vazia e o peso da proveta contendo o pó, chegou-se a quantidade de pó contida na proveta. A partir dessas informações, calculou-se a densidade dividindo-se o peso do pó pelo volume (15 mL). Este procedimento foi realizado em triplicata (LACHMAN et al. 2001).

4.2.2.3. Determinação da perda por dessecação

O material vegetal (2,0 g) foi transferido para um pesa-filtro chato, dessecado previamente, nas mesmas condições do teste a ser empregado, o pesa-filtro com a amostra foi pesado e tampado, posteriormente, agitado até completa uniformização da amostra. O pesa-filtro destampado junto com a tampa foram para a estufa, a 105°C, primeiramente por 5 horas e depois essa pesagem foi repetida de 2 em 2 horas até peso constante, ou seja, até a diferença de pesos entre as duas pesagens consecutivas não exceder a 5 mg, o experimento foi realizado em triplicata e o resultado expresso pela média das determinações (BRASIL, 2010).

4.2.2.4. Determinação do teor de cinzas

O material vegetal (3,0 g) foi transferido para cadinho de porcelana, previamente calcinado a 450°C, em forno mufla, sendo submetido à calcinação por 1 hora, resfriado em dessecador por 30 minutos. Este procedimento foi repetido até diferença de peso entre duas pesagens consecutivas não ultrapassar 0,5 mg (BRASIL, 2010).

4.2.2.5. Determinação do pH

Preparou-se uma solução a 1% (p/v) do pó das cascas em água destilada, essa solução foi submetida a chapa-aquecedora até a sua ebulição por 5 min. Após esse processo, a solução foi filtrada em papel de filtro. Depois de resfriar mediu-se o pH do filtrado através de um potenciômetro, previamente calibrado em pH de 4,01 e 6,86. Os resultados foram obtidos pela da média de 3 determinações (BRASIL, 2010).

4.2.2.6 Determinação do índice de espuma

Para um erlenmeyer com 50 mL de água fervente, foi transferido 2 g de pó das cascas, do vegetal em estudo e em seguida submetida à fervura moderada por 30 min em chapa aquecedora. Após esse processo, a amostra foi filtrada e o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL. O resíduo retido no papel filtro foi reutilizado para novas extrações através da utilização de porções sucessivas de 10 mL de água fervente até completar o volume de 100 mL do balão volumétrico, distribuiu-se o decocto em 10 tubos de ensaio com tampa (1,6 cm de diâmetro x 15 cm de altura), em uma série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 mL, o volume de cada tubo com água destilada foi ajustado até completar 10 mL. Os tubos foram tampados e agitados com movimentos verticais com duas agitações por segundo. Após 15 min em repouso aferiu-se a altura da espuma, sendo considerado positivo a permanência de espuma igual ou maior que 1 cm. O resultado foi expresso pela média de três determinações (BRASIL, 2010).

4.2.3 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

4.2.3.1 Obtenção do extrato etanólico das cascas de *A. glabra*

O pó das cascas de *A. glabra* (1,395 kg) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (proporção 1:10), em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram utilizados 10 L de etanol e deixou-se em repouso por 48h, posteriormente a solução extrativa foi removida e adicionou-se mais 10L de etanol que ficou em repouso por 24h, esse procedimento foi repetido até que a solução extrativa ficasse incolor. Após esse período, a solução etanólica foi filtrada e concentrada em rota- evaporador sob pressão reduzida, até obtenção do resíduo. Este concentrado foi acondicionado em frasco de vidro, previamente pesado, e armazenado em estufa a 50 °C, até peso constante.

4.2.3.2 Fracionamento do extrato e análises cromatográficas

Cerca de 5,2025 g de extrato etanólico (EE) foi solubilizado em 50 mL de metanol em banho de ultrassom e submetido à partição líquido-líquido (1:1, 1000 mL) de hexano (500 mL) e metanol/aquoso 10% (450 mL e 50 mL, respectivamente), obtendo-se assim, a fração hexânica (FH) e metanólica (FM), as quais foram concentradas em rotaevaporador (Figura 5). A FM (2 g) foi submetida à um novo fracionamento em coluna de Sephadex (altura de 49 cm, diâmetro de 4 cm e volume de 615,44 mL) e como fase móvel foi utilizado metanol. Após a eluição, as subfrações foram concentradas, em evaporador rotatório, à pressão reduzida, até a secura e a massa do resíduo foi determinada (Tabela 1; Figura 5).

Visando detectar a presença de alcaloides, o EE, FH e FM foram submetidos a análise em cromatográfica em camada delgada (CCD) utilizando como fase móvel: acetato de etila/metanol/água (proporção 88%:11%:8%; adaptado de WAGNER et al. 1984). Como reveladores utilizou-se o reagente de

Dragendorff e Ultravioleta (360 nm). As subtrações foram ainda, submetidas a análise em CCD com o mesmo sistema de eluição proposto para alcalóides e revelados com ácido sulfúrico, reagente de Dragendorff e Ultravioleta (360 nm). As frações com mesmo perfil cromatográfico foram reunidas e as que não revelaram com Dragendorff e Ultravioleta e que apresentaram massa inferior a 50 mg, não foram submetidos às próximas etapas do estudo (Tabela 2; Figura 5).

Além disso, o extrato etanólico (EE), frações hexânica (FH) e metanólica (FM) e subfrações (Grupo 2, Grupo 3) obtido das cascas de *A. glabra* foram submetidos a análises em cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Como fase móvel, foi utilizado água (A) e metanol (B), sendo que as condições da eluição estão descritas na Tabela 1. A coluna utilizada foi a Coluna SunFire C18 (5µm, 4,6 x 150 mm) e a detecção no UV em λ 220 a 400 nm, com fluxo de 0,5 mL/min e temperatura de 40°C.

Tabela 1: Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD do extrato etanólico, frações e subfrações obtido da casca da *Annona glabra*.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Água (A) (%)	Metanol (B) (%)
0	0,5	90	10
20	0,5	90	10
40	0,5	0	100
50	0,5	0	100
60	0,5	90	10

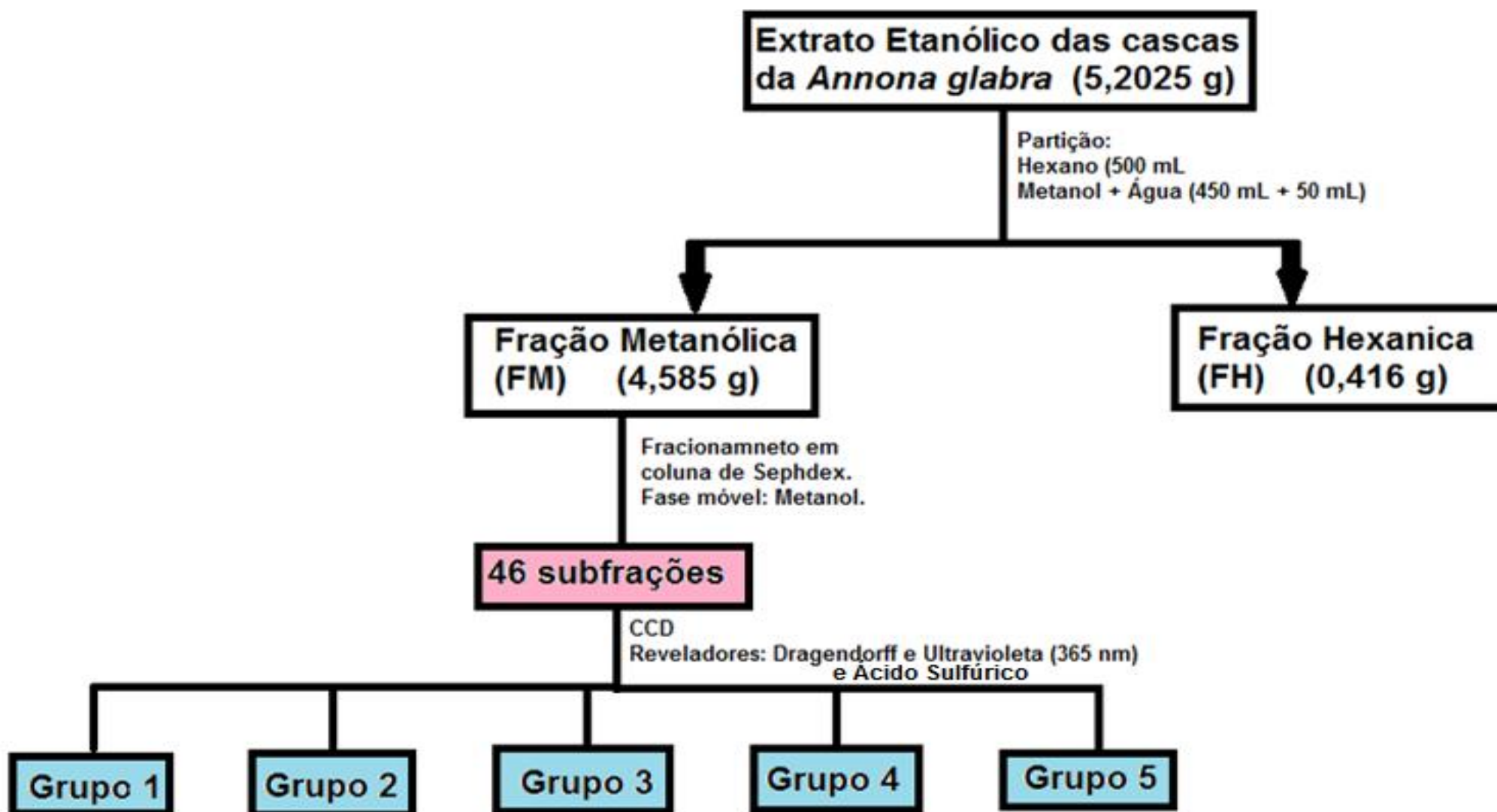


Figura 5: Esquema utilizado para o fracionamento do extrato etanólico obtido das cascas de *Annona glabra*.

Tabela 2: Frações resultantes da cromatografia em coluna de Sephadex da fração metanólica (FM) obtido do extrato etanólico da casca de *A. glabra* e agrupamento.

Fração	Massa (mg)	Frações Reunidas	Fração	Massa (mg)
1	10,2	-	23	35,6
2	12,4	-	24	25,9
3	10,4	-	25	26,8
4	20,2	-	6	25,7
5	28,3	-	27	24,9
6	21,6	Grupo 1	28	34,8
7	162,6	Grupo 2	9	35,6
8	26,5	Grupo 3	30	35,7
9	339,3		31	34,6
10	83,4		32	36,8
11	27,4	Grupo 4	33	27,9
12	38,2		34	33,2
13	30,2		35	26,5
14	44,2		36	33,8
15	23,8	Grupo 5	37	36,8
16	52,4		38	26,2
17	67,2		39	32,6
18	55,8		40	24,7
19	23,6		41	25,7
20	45,3		42	25,2
21	43,4		43	25,6
22	24,2		44	22,6
23	33,4		45	14,2
24	35,6		46	13,2

O grupo 3 (100 mg, Tabela 2) foi submetido a um novo fracionamento em cromatografia em camada delgada em escala preparativa para purificação, mostrando uma mancha amarela com fator de retenção (R_f) de 0,38 (Figura 6), a qual foi retirada com auxílio de uma espátula, extraída com metanol e concentrada. Este procedimento foi realizado 2 vezes, resultando na obtenção da substância G3-1 (12 mg; Figura 6) que foi submetida a análise CLAE-DAD e em espectroscopia de massas (MS) e de ressonância magnética nuclear (RMN) para identificação do composto.

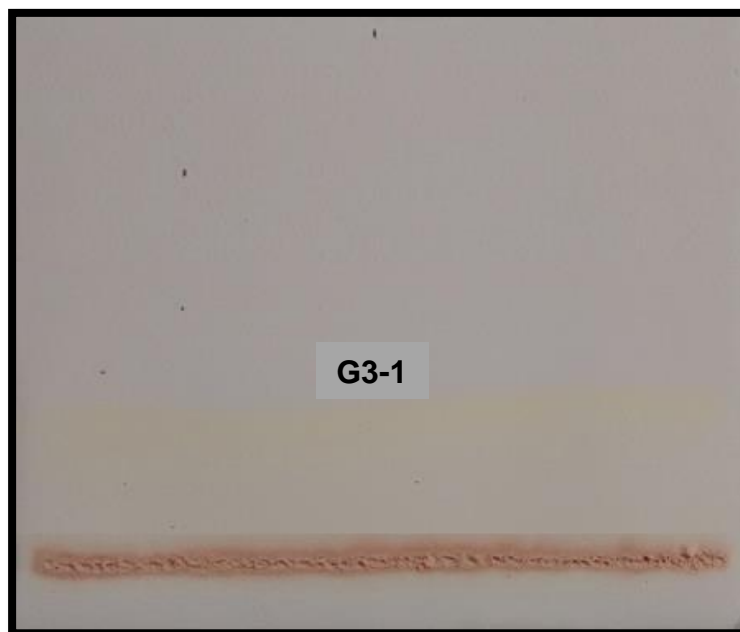


Figura 6: Cromatograma do Grupo 3 oriundo da fração metanólica obtido extrato etanólico das cascas da *A. glabra*.

Fase móvel: Acetato de etila – Ácido fórmico – Ácido acético – água (100:11:11:27) (WAGNER et al. 1984).

4.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

4.2.4.1 Teste de difusão em ágar

As cepas ATCC foram semeadas em meios de cultura específicos para cada microorganismo; sendo o Ágar Cetrimida para *Pseudomonas aeruginosa*, Ágar Manitol para *Staphylococcus aureus* e Ágar McConkey para *Escherichia coli*. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, para então serem utilizados nos experimentos.

Os inóculos dos microrganismos utilizados foram preparados a partir das cepas semeadas primeiramente em ágar específicos, as quais foram posteriormente semeadas em ágar Muller Hinton de 3 a 4 colônias isoladas, após cultivo de 24 horas e diluídos em caldo Muller Hinton até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland correspondendo aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL (unidade formadora de colônias/mL) de cada microorganismo (BAUER et al. 1966).

A suspensão de microrganismos foi semeada em triplicata, com auxílio de um swab descartável, em toda a superfície do meio Ágar Muller Hinton (esgotamento total). Em seguida foram adicionados discos de papel filtro com 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL das amostras na concentração de 500 µg/disco (BAUER et al. 1966). Depois foram adicionados discos impregnados somente com DMSO, controle negativo, e discos de clorafenicol 30 µg ou gentamicina 10 µg como controle positivo. Após a incubação das placas a 35°C por 24 horas, foi realizada a leitura com auxílio de paquímetro (CLSI, 2009). Na leitura dos controles foi verificado a presença de halo de inibição nos discos de controle positivo e ausência de halo de inibição nos discos do controle negativo para que o ensaio fosse considerado válido, sendo que foi considerado positivo quando observado halo de inibição em torno dos extratos e das frações e negativo na ausência de halo.

4.2.4.2 Método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Apenas as amostras que foram se ativos frente às cepas testadas, foram submetidas ao teste de microdiluição para a determinação do CIM (ELOFF, 1998), utilizando-se as seguintes concentrações: 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL por poço.

Foi preparada uma suspensão de cada cepa em caldo Muller Hinton, ajustando-se a turbidez com o tubo 0,5 da escala de MacFarland (CLSI, 2009). Em placas de 96 cavidades foram depositados 180 µL de caldo Müller Hinton, adicionando-se uma alíquota de 10 µL das amostras, e respectivas diluições, e 10 µL das suspensões bacterianas, totalizando 200 µL em cada poço. Como controle positivo foi utilizado clorafenicol nas mesmas concentrações das amostras. E como controle negativo foi utilizado 10 µL da suspensão bacteriana + 190 µL de caldo Müller Hinton em 3 poços e em outros 3 poços 10 µL da suspensão bacteriana + 10 µL de DMSO e 180 µL de caldo Müller Hinton para o controle negativo do solvente, como demonstra a figura 4. As amostras foram testadas em triplicata (CLSI, 2009).

Após o semeio, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 h. Após este período, foi acrescentado às placas 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL), e a placa foi novamente incubada por 3 h. O MTT é um sal de tetrazolio, cuja coloração inicial é amarela, no entanto, em células viáveis esse sal é reduzido a formazan, que apresenta coloração azul.

Após o período de incubação realizou-se a leitura, através da leitora de microplacas de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) com comprimento de onda de 490 nm, onde se verificou as características colorimétricas através dos resultados de densidade óptica, sendo que a cor azul indica crescimento bacteriano e a cor amarela indica que não houve crescimento bacteriano, logo a menor concentração do subgrupo em que não houve crescimento foi considerada a concentração inibitória mínima (MOSMANN, 1983; TAVEIRA, 2007).

Para classificação da atividade antibacteriana foram adotados os seguintes parâmetros: amostra com alta atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima (CIM) < 100 µg/mL; quando a CIM está entre 100 a 500 µg/mL foi considerada moderada; CIM entre 500 a 1000 µg/mL esta atividade foi considerada fraca e a amostra foi considerada inativa quando o CIM > 1000 µg/mL (HOLETZ et al. 2002).

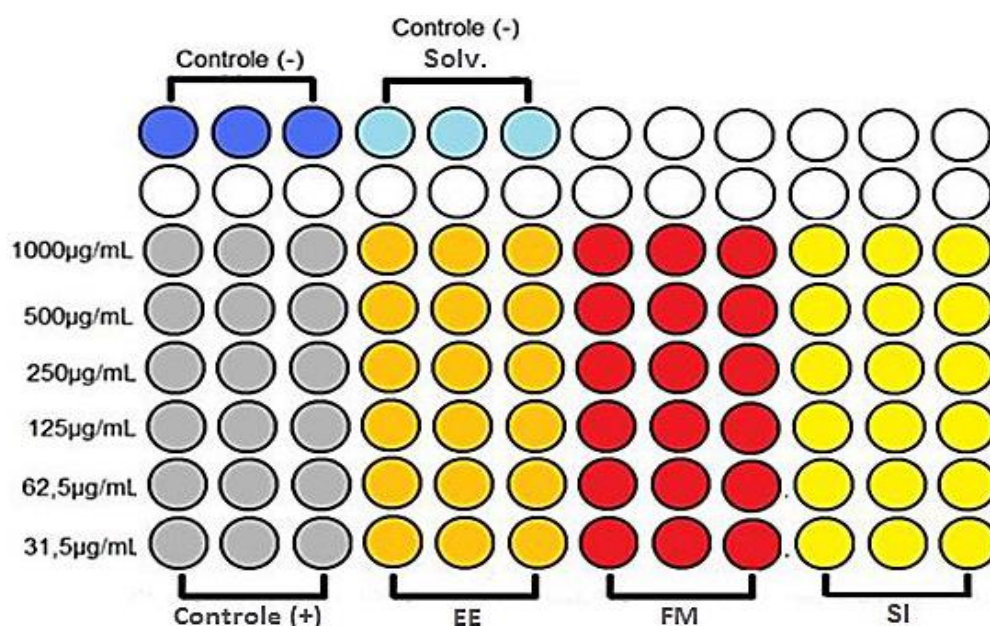


Figura 7: Atividade antimicrobiana de *A. glabra*.

Legenda: (EE) Extrato Etanólico, (FM) Fração Metanólica e (SI) Sem Inóculo.

Fonte: Adaptado de BRANDÃO, 2012.

4.2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

4.2.5.1 Ensaio da Atividade Antipromastigota

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas durante a fase logarítmica de crescimento, foram reunidas por centrifugação em meio RPMI completo 3500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi resuspendido em meio RPMI completo, as promastigotas foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração correspondente a 5×10^6 parasitas/mL. Esta suspensão foi distribuída em placas com culturas de células com fundo chato previamente dosificadas contendo o extrato vegetal, frações e subfrações em diferentes concentrações. Em seguida, as placas foram incubadas a 26°C por 24 horas.

O controle negativo consistiu de uma suspensão do parasita e meio de cultura, controle do solvente (metanol evaporado + suspensão do parasito + meio) e o controle positivo consistiu de uma suspensão de promastigotas adicionada de Anfotericina B (25,12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0,3906 μ /mL).

Após o período de incubação de promastigotas com as amostras e fármacos foram adicionados 10 μ L de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium) (5 mg/mL) em cada poço. A placa for recoberta com papel alumínio, sucedendo-se nova incubação por 4 horas em estufa a 26°C para que o MTT seja metabolizado e conseqüentemente fossem formados os cristais de formazan (MOTA et al. 2015).

Depois de 4 horas, foi adicionado 10 μ L de dimetilsufóxido (DMSO), para solubilizar os cristais de formazan gerados, através da agitação manual ate completa solubilização dos cristais. Posteriormente, realizou-se leitura da densidade óptica (D.O) das amostras em leitor de placas de ELISA sob comprimento de onda de 490 nm. A viabilidade das formas promastigotas foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada. A porcentagem de células (promastigotas) foi calculada pela seguinte fórmula, adaptada de Ngure et al. (2009):

$$\%viabilidade = \frac{\text{abs. Dos poços com amostra} - \text{abs. do reagente (branco)}}{\text{abs. Dos poços sem amostra} - \text{abs. do reagente (branco)}} \times 100$$

Abs - absorbância

A concentração inibitória de 50% (CI₅₀) é a concentração que causa a redução de 50% das células em crescimento (viáveis) e foi determinada pelo programa GraphPad Prism versão 5.04. Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado a leitura visual e para a CI₅₀ a leitura de placas de ELISA, adotando-se os seguintes critérios adaptados de Mota (2015):

Quadro 5: Interpretação dos resultados baseado na faixa do CIM e CI₅₀.

CIM/CI₅₀ µL	Resultados
Menor ou igual a 100	Ativo
Entre 101-200	Moderadamente ativo
Acima de 200	Inativo

4.2.5.2 Avaliação da atividade anti-amastigota

4.2.5.2.1 Indução da diferenciação celular e ensaio de viabilidade

Para promover a diferenciação das células THP-1 de monócitos para macrófagos (THP-1d) utilizou-se como agente indutor o éster de forbol – PMA. Inicialmente os monócitos foram plaqueados na densidade celular de 3×10^5 células/poço em placas de 96 poços, já em contato com o agente indutor (PMA) diluído no meio RPMI na concentração de 200 nmol/L. As placas foram

incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ durante 3 dias para aderência dos macrófagos aos poços. Posteriormente, as culturas foram visualizadas em microscópio invertido para observação dos macrófagos aderidos seguido de lavagem 3 vezes com meio RPMI 1640 para remover possíveis células não aderentes (TEMPONE et al. 2005; DAIGNEAULT et al. 2010).

Após as lavagens, às placas foram incubadas na presença dos extratos, frações e/ou substâncias puras, nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 µg/mL, diluídos em um volume final de 100 µL de meio RPMI 1640 completo seguido de incubação a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h. Como controle negativo utilizou-se uma suspensão de macrófagos e meio de cultura (RPMI completo). O controle positivo consistiu de uma suspensão de macrófagos adicionada de Anfotericina B (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,562 µg/mL).

Posteriormente foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço, protegida da luz, sucedendo-se de nova incubação por 4 h em incubadora de CO₂ a 37°C. Em seguida, foi adicionado 10 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), procedendo-se de agitação manual por 5 min. A leitura da densidade óptica (D.O.) das amostras foi realizada em leitor de placas de ELISA sob comprimento de onda de 490 nm.

A viabilidade das células foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada. A porcentagem de células viáveis (macrófagos) foi avaliada conforme fórmula adaptada de Ngure et al. (2009) conforme descrito no item 4.2.5.1.

4.2.5.2.2 Ensaio da atividade antiamastigota

As células THP-1 diferenciadas em macrófagos (THP-1d) aderidas em lamínulas circulares (13 mm) previamente colocadas em placas de 24 poços numa concentração de 3x10⁵ células por poço (50 µL), foram expostas a infecção com promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento

ajustadas numa concentração de 5×10^6 parasitas por poço (50 μ L) e incubadas por 4 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ (SILVA, 2005).

Após incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e adicionado 1 mL de meio RPMI 1640 a 37°C, contendo diferentes concentrações (250 μ g/mL, 125 μ g/mL e 62,5 μ g/mL) do extrato vegetal, frações, subtrações e substância isolada, concentrações essas que foram estabelecidas tendo como base os resultados do ensaio de viabilidade celular.

O controle negativo consistiu de macrófagos infectados com meio de cultura sem o fármaco. O controle positivo consistiu de Anfotericina B (50 μ g/mL, 25 μ g/mL e 12,5 μ g/mL), seguido de incubação por 72 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, os testes foram feitos em triplicata.

Posteriormente, as lamínulas foram retiradas dos poços, lavadas em PBS estéril, a temperatura ambiente, fixadas em metanol e coradas com o corante Giemsa durante 20 minutos. As lamínulas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x), onde foi determinado o número de amastigotas por 100 macrófagos em cada lamínula. A atividade antileishmania foi avaliada através da fórmula, segundo Silva (2005):

$$I = \frac{AT \times 100}{AC}$$

I = % de infecção de amastigotas/100 macrófagos em relação ao controle sem droga.

AT = número de amastigotas/100 macrófagos no grupo tratado.

AC = número de amastigotas/100 macrófagos no grupo não tratado (controle).

4.2.6 Determinação do Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade foi determinado pela seguinte equação adaptada de Reimão, (2009):

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ em macrófagos}}{CI_{50} \text{ contra o parasita}}$$

Para interpretação dos resultados do índice de seletividade, se considerou que um IS superior indica que o composto em estudo apresenta maior para o parasita do que para o macrófago. Já um IS inferior a 1 indicou um composto com maior toxicidade para o macrófago do que para o parasita. Quanto maior o valor numérico do IS, mais seletivo é o composto em estudo, ou seja, pouco tóxico para o macrófago e ativo para o parasita (REIMÃO, 2009).

4.2.7 Análises Estatística dos Dados

Os valores de CI_{50} (concentrações dos compostos que reduziram a resposta a 50% em relação ao grupo controle) e de CC_{50} (concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular) foram estimados a partir dos valores médios de dois experimentos independentes, realizados em triplicata, por interpolação gráfica utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.04.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS

O pó de *A. glabra* foi submetido à análise granulométrica, sendo observado que 96,4% do pó ficou retido no tamis 1,70 mm (Tabela 3). De acordo com a Farmacopéia Brasileira V ed. (BRASIL, 2010), o pó pode ser classificado como pó grosso, visto que quase a totalidade (96,4%) ficou retido no tamis de 1,70 mm.

As cascas de *A. glabra* são constituídas por material fibroso, isto dificulta o processo de pulverização (Figura 8). Pós grossos possuem uma menor superfície de contato com o solvente, diminuindo a eficiência do processo extrativo (PÉRTILE, 2007 apud COSTA et al. 2009a).

Visando melhorar a eficiência do processo extrativo, optou-se pela maceração exaustiva. Desta forma, obteve-se um rendimento de quase 9%. Siqueira, (2010) utilizou para o pó obtido da casca da *Annona coriácea* a maceração com etanol por 24 horas seguida de percolação a frio até exaustão com o mesmo solvente obtendo rendimento de 10,5%.

Tabela 3: Análise granulométrica.

Tamanho da malha	Média (%)	Desvio Padrão (±)
1,7mm	96,407	0,6251
710µm	0,252	0,1343
355µm	0,574	0,4849
250µm	0,939	0,1548
180µm	1,241	0,1195
125µm	0,328	0,2998
Tamis Coletor	0,052	0,0906



Figura 8: Pó das cascas de *A. glabra*.

Posteriormente foi determinada a densidade aparente, que expressa a relação entre a massa de material seco e o volume real ocupado por essas partículas, não incluindo o espaço ocupado pelos poros (ZORZETO et al. 2014). Nesta determinação, o pó mostrou-se baixa densidade ($0,343 \text{ g/cm}^3$; Tabela 4), quando comparada com o padrão para sólidos e líquidos (água= $1,0 \text{ g/cm}^3$), ou seja, menos densa (MONTANHEIRO et al. 1990), logo o pó ocupa um volume maior.

Outra análise realizada foi à perda por dessecação, que é o indicativo percentual de material volátil no pó do material vegetal, indiretamente, a umidade residual do pó das cascas de *A. glabra* apresentou média percentual de 9,21% (Tabela 4), a mesma encontra-se dentro dos limites estabelecidos (8-14%) pela Farmacopéia Brasileira V ed. (BRASIL, 2010). A determinação do teor de umidade residual presente nas drogas vegetais constitui um índice de qualidade de sua preparação e da garantia de sua conservação (COSTA, 2001). Este teor sugeri uma secagem eficiente da matéria prima vegetal, estabilidade microbiológica e química, uma vez que teores de umidade acima do estabelecido possibilitam o desenvolvimento de fungos e bactérias, e se tornam susceptíveis a processos de hidrólise e atividade enzimática com conseqüente deterioração de constituintes químicos (WHO, 1998).

Na avaliação do teor de cinzas totais a média percentual foi de 4,34% (Tabela 4), estando dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira V ed. em que limita em até 14% o teor de cinzas totais nos pós (BRASIL, 2010). O teor de cinzas totais estabelece a quantidade de substâncias residuais não voláteis, obtidas por incineração, representando a soma de

material inorgânico integrante da espécie (cinzas intrínsecas) com as substâncias aderentes de origem terrosa (cinzas extrínsecas; BRAGA et al. 2007). Estabelecendo, assim, um parâmetro importantíssimo no controle de qualidade do material vegetal, já que, estabelece certo grau de pureza desse insumo.

Na determinação do pH, verificou-se que o pH obtido foi de 8,45 (Tabela 4) sugerindo que o pó desta planta contém predominantemente substâncias básicas. Substâncias como os alcaloides, que estão presentes em outras espécies da família Annonaceae (FORMAGIO et al. 2010), possuem caráter básico, o que pode sugerir a presença desses compostos (HARBORNE, 1984).

O índice de espuma foi negativo (Tabela 4), sendo a altura da espuma menor que 1 cm nos tubos, sugerindo a ausência de saponinas na amostra. Estudos fitoquímicos de *A. glabra* levaram ao isolamento de diterpenos (CHEN et al. 2000), acetogeninas (CHANG et al. 1998; CHEN et al. 2004) alcaloides (CHEN et al. 2004; OLIVEIRA et al. 2002) e também saponinas (SIEBRA et al. 2009), no entanto, no presente estudo a presença deste metabólito não foi confirmado sendo necessário a utilização de métodos mais específicos.

Tabela 4: Análise farmacognóstica do pó das cascas de *A. glabra*.

Parâmetro	Resultados obtidos ± Desvio Padrão
Perda por dessecação	9,21 ± 0,2034
Teor de cinzas totais	4,34 ± 0,0374
pH	8,45 ± 0,0503
Índice de espuma	Negativo
Densidade do pó	0,343 ± 0,263

Estes parâmetros, determinação do teor de umidade, cinzas totais, granulometria, pH, densidade e índice de espuma, em conjunto, são essenciais para determinar a qualidade e eficácia do produto final a que se quer alcançar, consequência da complexidade de composição dos insumos vegetais ligadas as suas condições de cultivo e coleta, bem como, dos tratamentos empregados para promover sua estabilidade (BARNI et al. 2009).

5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

O processo de extração utilizado neste estudo forneceu uma massa de 124,642 g de extrato seco, cujo rendimento foi de 8,93%. O fracionamento do referido extrato gerou as frações hexânica (FH), cuja massa foi de 0,416 g e um rendimento de 8,007% e fração metanólica (FM) e 4,585 g (rendimento = 88,138%), respectivamente. Estes resultados sugerem que o extrato etanólico é constituído, principalmente, com substâncias de maior polaridade.

O pó das cascas de *A. foetida* foi submetido a extração sucessiva com hexano, diclorometano e metanol. O extrato etanólico foi submetido a análise em CCD, sendo detectados alcaloides (COSTA et al. 2006).

As sementes de *A. muricata* foram submetidas a extração com metanol. O extrato metanólico foi submetido ao fracionamento, sendo isolados as seguintes acetogeninas: muricina A-G, muricatetrocin A e B, longifolicina, corossolina e corossolona (CHANG e WU, 2001).

O pó da *A. glabra* foi submetido a extração com hexano. Este extrato foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica, sendo isolado o diterpeno: ácido cauer-16-em-19-oi (PADMAJA et al. 1995).

A premissa inicial foi que a fração hexânica deve conter diterpenos cauranicos, enquanto que a fração metanólica deva conter os alcalóides e acetogeninas. Estudos anteriores atribuem a atividade leishmanicida e antimicrobiana de *A. foetida* aos alcalóides pirimidia β -carbolínicos: annonmantina e liriodenina (COSTA et al. 2006). Já no estudo de Vila-Nova et al. (2011) atribuiu a atividade leishmanicida das sementes da *A. squamosa* as acetogeninas. Em outro estudo, atribuíram a atividade antimicrobiana a alcaloides aporfínicos e proaporfínicos, entre os alcaloides já isolados no gênero *Annona*, a anonaína e a estefarina apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Bacillus cereus*, a glaziovina apresentou atividades sobre *E. coli* (RIOS et al. 1988).

Então a premissa inicial deste trabalho é que se houver atividade leishmanicida e/ou antimicrobiana da *A. glabra*, estas devem estar relacionadas aos alcalóides e/ou acetogeninas. Visando detectar a presença destes

metabólitos, o extrato etanólico, suas frações foram submetidas às análises em CCD.

Tanto o extrato etanólico como a fração metanólica revelaram de forma positiva com o reagente de Dragendorff e ultravioleta (365 nm), sugerindo a presença de alcalóides e/ou acetogeninas. Então, a FM foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta utilizando como fase estacionária Sephadex e fase móvel metanol, sendo obtidas 46 frações. Todas as subfrações foram submetidas às análises em CCD sendo reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos (Tabela 5; Figura 9).

Tabela 5: Perfis cromatográficos, rendimento e reunião das frações resultantes do fracionamento em sephadex da fração metanólica obtido do extrato etanólico da casca da *A. glabra*

Fração	Dragendorff	UV	Frações reunidas	Massa (mg)	Rendimento (%)
6	+	+	Grupo 1	21,6	1,08
7	+	+	Grupo 2	162,6	4,51
8	+	+	Grupo 3	365,8	18,29
9	+	+			
11	+	+	Grupo 4	27,4	2,65
15	+	+	Grupo 5	23,8	2,65

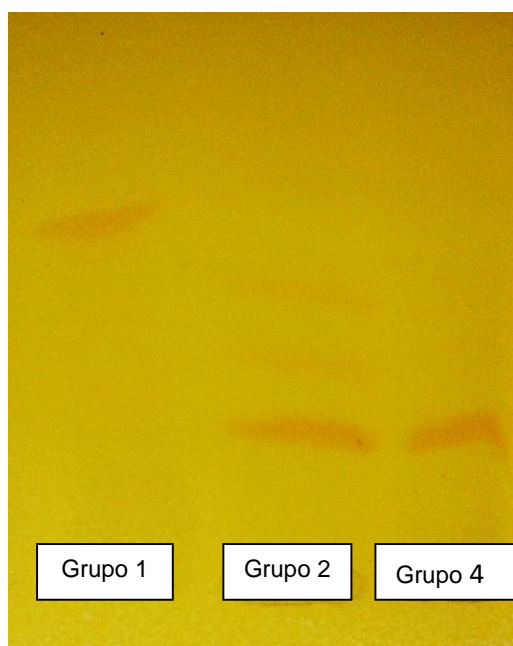


Figura 9: Cromatograma das subfrações obtidas em coluna de Sephadex provenientes da fração metanólica obtido das cascas da *A. glabra*.

Fase móvel: 81% de acetato de etila + 11% de metanol + 8% de água.

Revelador: Reagente de Dragendorff.

O extrato etanólico (EE) obtido das cascas de *A. glabra* e suas frações foram submetidas à análise em CLAE-DAD (Figura 8A). O cromatograma obtido do EE sugere a presença de compostos de baixa, média e alta polaridade. O sinal com maior intensidade (TR= 38,422 min.) apresentou um espectro em UV com λ de 256 e 356 (Figura 11A). O pico em 256 é sugestivo do da banda II (anel A, porção benzoil), enquanto que o pico em 356 nm pode estar relacionado com a banda I (anel B, porção cinamoil) do flavonóide (Figura 10) (MARBY et al. 1970; ALONSO-SALCES et al. 2004).

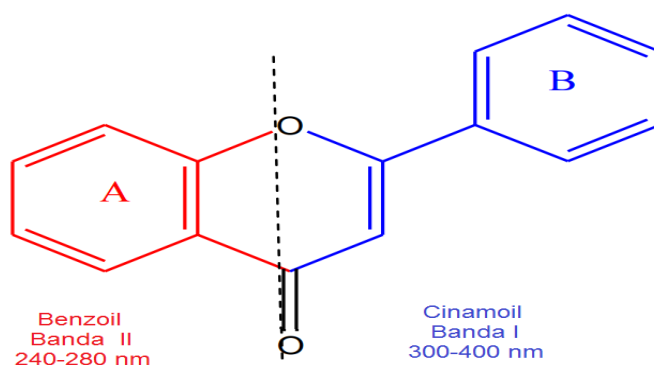


Figura 10: Estrutura química de um flavonóide com as partes que originam as bandas de absorção características no UV.

Extratos de outras espécies de *Annona* já foram isolados flavonóides. Os flavonoides glicosilados: Kaempferol-3-O-galactosídeo, kaempferol-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-arabinosídeo e quercetina-3-O-arabinosilgalactosídeo foram identificados por CG-MS nas folhas de *Annona crassiflora*. Os glicosídeos de quercetina, isoramnetina, kaempferol e luteolina foram detectados nas folhas de *Annona monticola*, *Annona warmingiana* e *Annona tomentosa* (SANTOS e SALATINO, 2000).

Além desta substância com TR= 38,422 min., o extrato possui outra substância com TR= 44,691 min., no espectro de UV desta observa-se absorvâncias com $\lambda = 256$ nm e 310,6 nm (Figura 11A). A absorvância em 256 nm pode estar relacionado a porção benzoil e a absorvância em 310,6 nm pode estar relacionada a porção cinamoil (Banda I; Figura 10; ANDERSON e MAIKHAN, 2009).

Esperava-se encontrar sinais cujos espectros fossem sugestivos de alcalóides e acetogeninas, entretanto, nenhum dos espectros em UV apresentaram absorvâncias características destes cromóforos. Acetogeninas e alcaloides podem estar presentes em concentrações muito reduzidas neste extrato e por isso não foram detectadas. Visando obter frações enriquecidas de acetogeninas adotou-se o método de partição proposto por Pimenta, (1995). Onde descreve que as acetogeninas são obtidas de frações hidroalcólicas advindas da partição entre hexano e metanol aquoso 10%.

De forma semelhante ao extrato etanólico, as frações hexânica (FH) e metanólica (FM), apresentaram sinais com TR de 38,422 e 44,691 min., sendo seus espectros em UV iguais aos do extrato. Logo, a FH e FM também devem conter flavonóides (Figura 11B e 11C).

Alguns flavonóides apresentam polaridade intermediária, como por exemplo os glicosídeos isovitexina, vitexina, isoorientina entre outros. Estes flavonóides são pouco solúveis em água, porém muito solúveis em etanol e metanol (MEDEIROS e KANIS, 2010). Logo, os flavonóides presentes no EE e FM, provavelmente, possuem polaridade intermediária.

Segundo Soares et al. (2000), alguns gêneros de Annonaceae são produtores de flavonoides relativamente pouco polares. Santos e Salatino (2000) isolaram e identificaram um total de 76 flavonas e flavonóis, a partir das folhas de espécies de Annonaceae, sendo a maior parte glicosídeos. Ainda segundo

estes, todos os fenóis encontrados foram glicosídeos de flavonas (apigenina, scutellareina, hispidulina e luteolina) ou flavonóis (canferol, ramnocitrina, 6-hidroxi ramnocitrina, quercetina, isoramnetina e ramnetina), com predominância deste último, sobressaindo-se a quercetina.

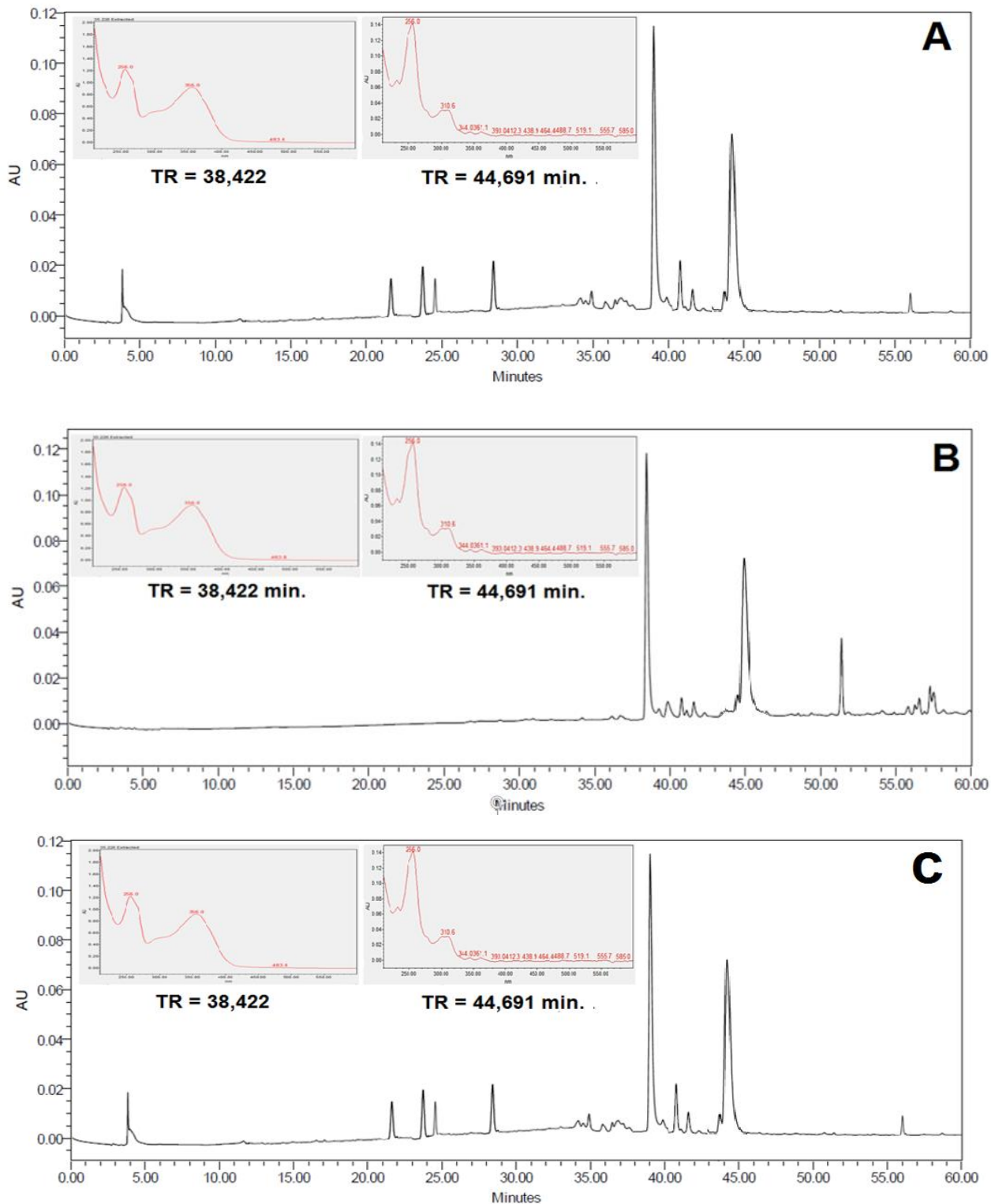


Figura 11: Perfis cromatográficos e espectros de UV do extrato e suas frações das cascas de *A. glabra*. $\lambda = 280$ a 400 nm.

Condição: Coluna Sunfire C18, $5 \mu\text{m}$ ($4,6 \times 150$ mm), fluxo= $0,5$ mL/min, temperatura 40°C ,
Fase móvel: $t = 0$ min: 90% água e 10% metanol, $t = 20$ min: 90% água e 10% metanol, $t = 40$ e 50 min: 0% água e 100% metanol, $t = 60$ min: 90% água e 10% metanol.

Legenda: A – Extrato etanólico (EE); B – Fração Hexânica (FH) e C – Fração Metanólica (FM).

Na análise de CCD do Grupo 2, verificou-se a presença de 3 bandas quando visualizadas no ultravioleta (365 nm) com fatores de retenção (Rf) de 0,5, 0,62 e 0,75, onde após revelação com o reagente de Dragendorff apresentaram coloração alaranjada sugerindo a presença de alcaloides (Figura 12).

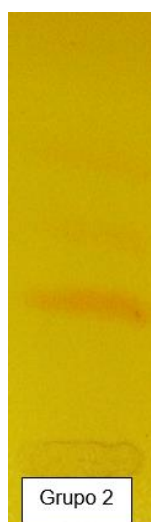


Figura 12: Cromatograma da subfração (Grupo 2) obtido em coluna de Sephadex proveniente da fração metanólica obtido das cascas da *A. glabra*.
Fase móvel: 81% de acetato de etila + 11% de metanol + 8% de água.
Revelador: Reagente de Dragendorff.

No entanto, quando este grupo foi submetido a análise em CLAE-DAD, verificou-se dois sinais de maior intensidade, o primeiro com tempo de retenção de 42,833 min., cujo espectro no UV apresentou absorções de $\lambda = 254,8$ nm e 309 nm. O segundo pico teve TR = 44,691 min. com absorções no UV de 256 e 310,6 nm (Figura 13), sendo este último é o mesmo encontrado no EE, FH e FM. Ambos os sinais são sugestivos de metabólitos pertencentes a classe dos flavonóides onde as absorções de 254,8 e 256 nm são características da banda II – porção benzoil, e as absorções em 309/310,6 nm características da banda I – porção cinamoil (MARBY et al. 1970; ALONSO-SALCES et al. 2004). Logo, sugere-se uma fração rica em flavonóides.

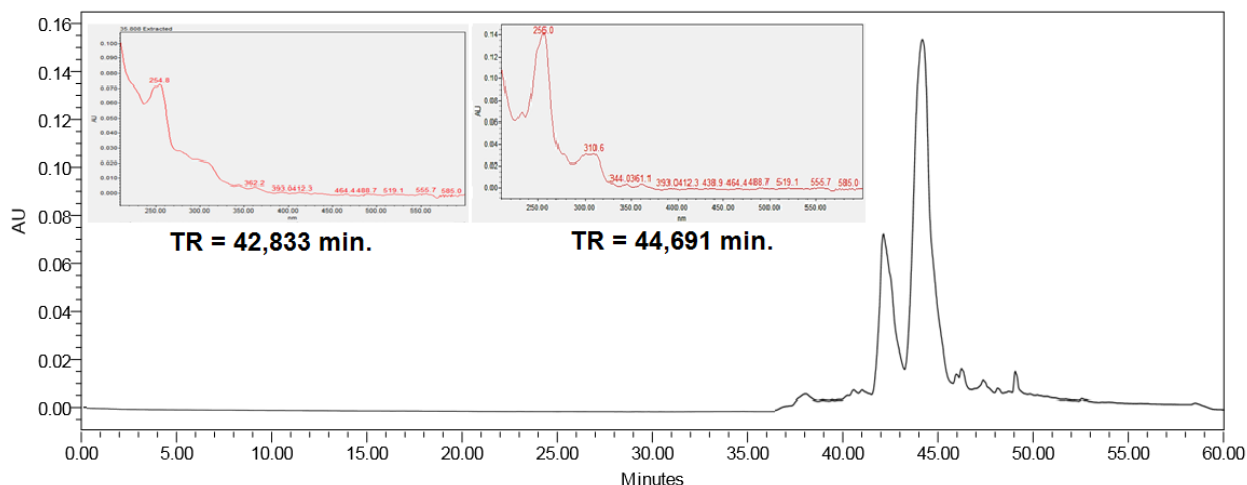


Figura 13: Perfil cromatográfico e espectros de UV do Grupo 2 proveniente da fração metanólica obtido do extrato etanólico das cascas de *A. glabra*. $\lambda = 280$ a 400 nm.

Condição: Coluna Sunfire C18, $5 \mu\text{m}$ ($4,6 \times 150$ mm), fluxo = $0,5$ mL/min, temperatura 40°C ,
Fase móvel: $t = 0$ min: 90% água e 10% metanol, $t = 20$ min: 90% água e 10% metanol, $t = 40$ e 50 min: 0% água e 100% metanol, $t = 60$ min: 90% água e 10% metanol.

O grupo 3, também apresentou em CCD um perfil cromatográfico sugestivo de alcaloides revelando positivamente frente ao reagente de Dragendorff e apresentando fluorescência no ultravioleta (365 nm). Porém, a análise em CLAE-DAD sugeriu apenas a presença de constituintes pertencentes a classe dos flavonoides, e dentre eles, a substância majoritária do EE, FH e FM com TR = $38,422$ min. Por esse motivo, adotou-se metodologia adaptada de Wagner et al. (1984) para isolamento desta substância, sendo esta chamada de G3-1.

A substância G3-1 (12 mg) advinda da fração metanólica, por eluição com metanol em coluna de Sephadex LH20[®] e purificada em CCD em escala preparativa, apresentou-se como um precipitado de coloração amarela, solúvel em metanol. A análise em CCD sugeriu tratar-se de um flavonóide, em função da coloração amarelada da mancha com $R_f = 0,38$ que, após revelação com cloreto de alumínio 2% em metanol apresentou intensa fluorescência no ultravioleta (365 nm) e quando comparada com o padrão utilizado, o flavonóide Rutina, apresentou o mesmo R_f , sugerindo que a presença deste metabólito (Figura 14).

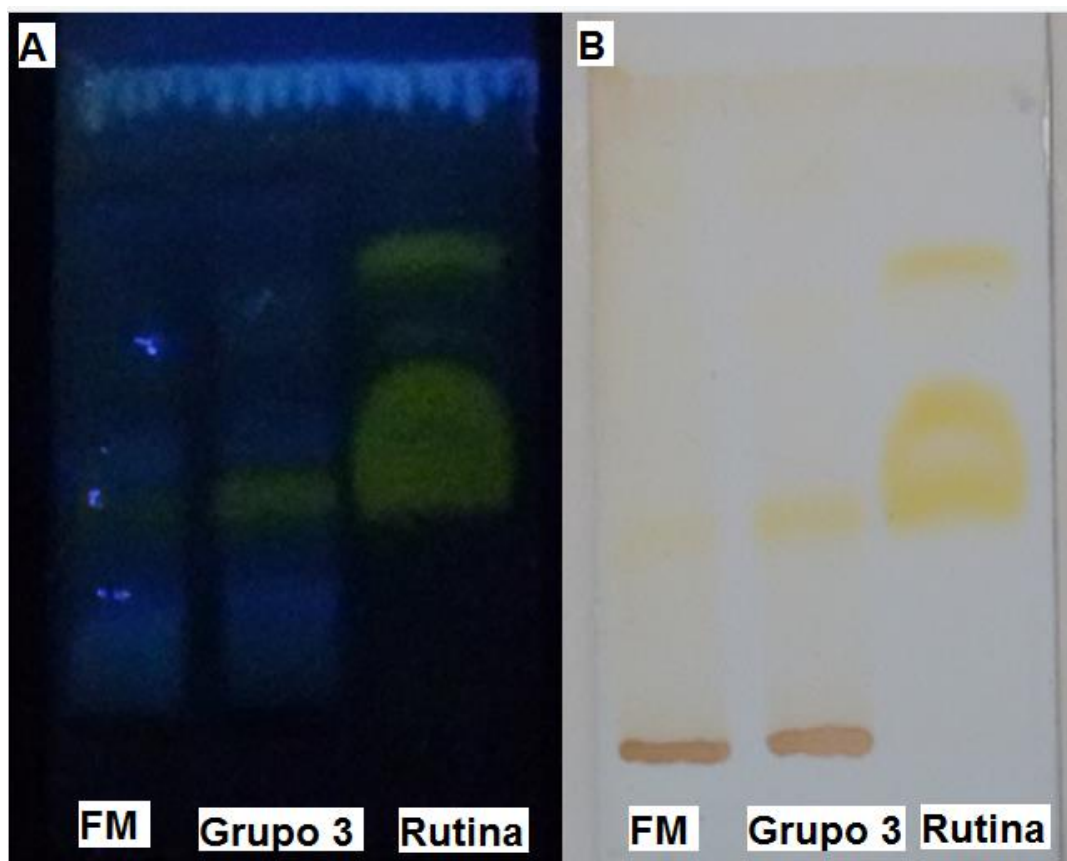


Figura 14: Cromatograma fração metanólica, Grupo 3 obtido do extrato etanólico das cascas da *A. glabra*.

Legenda: FM: Fração Metanólica; Rutina: Padrão de Rutina.

Fase móvel: Acetato de etila – Ácido fórmico – Ácido acético – água (100:11:11:27).

Reveladores: **A:** Ultravioleta (365 nm); **B:** Cloreto de Alumínio 2% em metanol.

Na análise em CLAE-DAD, o cromatograma apresentou apenas um sinal com tempo de retenção de 38,422 min., com espectro no UV de λ de 256 e 356 nm. Esses dados sugerem tratar-se de um flavonóide, sendo os valores compatíveis com os descritos para flavonas e flavonóis. A partir do valor do máximo de absorção da Banda I, é possível inferir sobre a natureza do flavonóide, especialmente entre flavonas (304-350 nm) e flavonóis (352-385 nm) (MARBY et al. 1970; MARKHAM e MARBY, 1975). Os máximos de absorção obtidos para substância G3-1 sugerem que este composto seja um flavonol (Figura 15; MARBY et al. 1970; MARKHAM e MARBY, 1975).

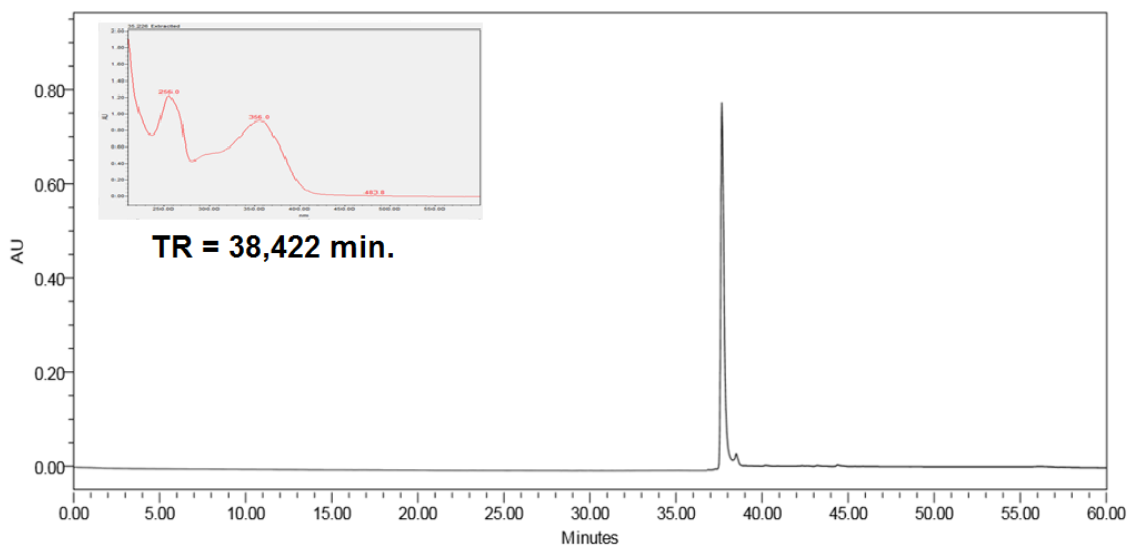


Figura 15: Perfil cromatográfico e espectros de UV da substância G3-1 proveniente da fração metanólica (FM) obtido das cascas de *A. glabra*. $\lambda = 250$ a 400 nm.

Condição: Coluna Sunfire C18, $5 \mu\text{m}$ ($4,6 \times 150$ mm), fluxo= $0,5$ mL/min, temperatura 40°C , **Fase móvel:** $t = 0$ min: 90% água e 10% metanol, $t = 20$ min: 90% água e 10% metanol, $t = 40$ e 50 min: 0% água e 100% metanol, $t = 60$ min: 90% água e 10% metanol.

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância G3-1, as atribuições dos sinais foram feitas baseadas na comparação com os dados relatados na literatura para flavonóis e heterosídeos flavônicos (Figura 16; Figura 17; Tabela 6).

O espectro de RMN do ^{13}C obtido para substância G3-1 (Figura 16, tabela 6), apresentou a presença de 27 sinais, dos quais 15 pertencem à unidade aglicona. Dentre esses, o sinal em δ 179,3 ppm, corresponde ao carbono carbonílico C-4 (COLLINS e FERRIER, 1995; NIASSY et al. 2004). Os sinais em δ 105,5 e 104,7 ppm são característicos para carbonos anoméricos de duas unidades glicosídicas. Verificou-se também um sinal de carbono metílico em δ 17,8 ppm (C-6'') que confirma a presença da unidade glicosídica de ramnose (NIASSY et al. 2004; ENDRINGER, 2007). O sinal em δ 68,5 ppm, de um carbono metilênico, indicou que a outra unidade glicosídica se trata da glicose. Os demais sinais na faixa de δ 69,6 a 78,1 ppm foram compreendidos como pertencentes às unidades glicosídicas (COLLINS e FERRIER, 1995; NIASSY et al. 2004; ENDRINGER, 2007).

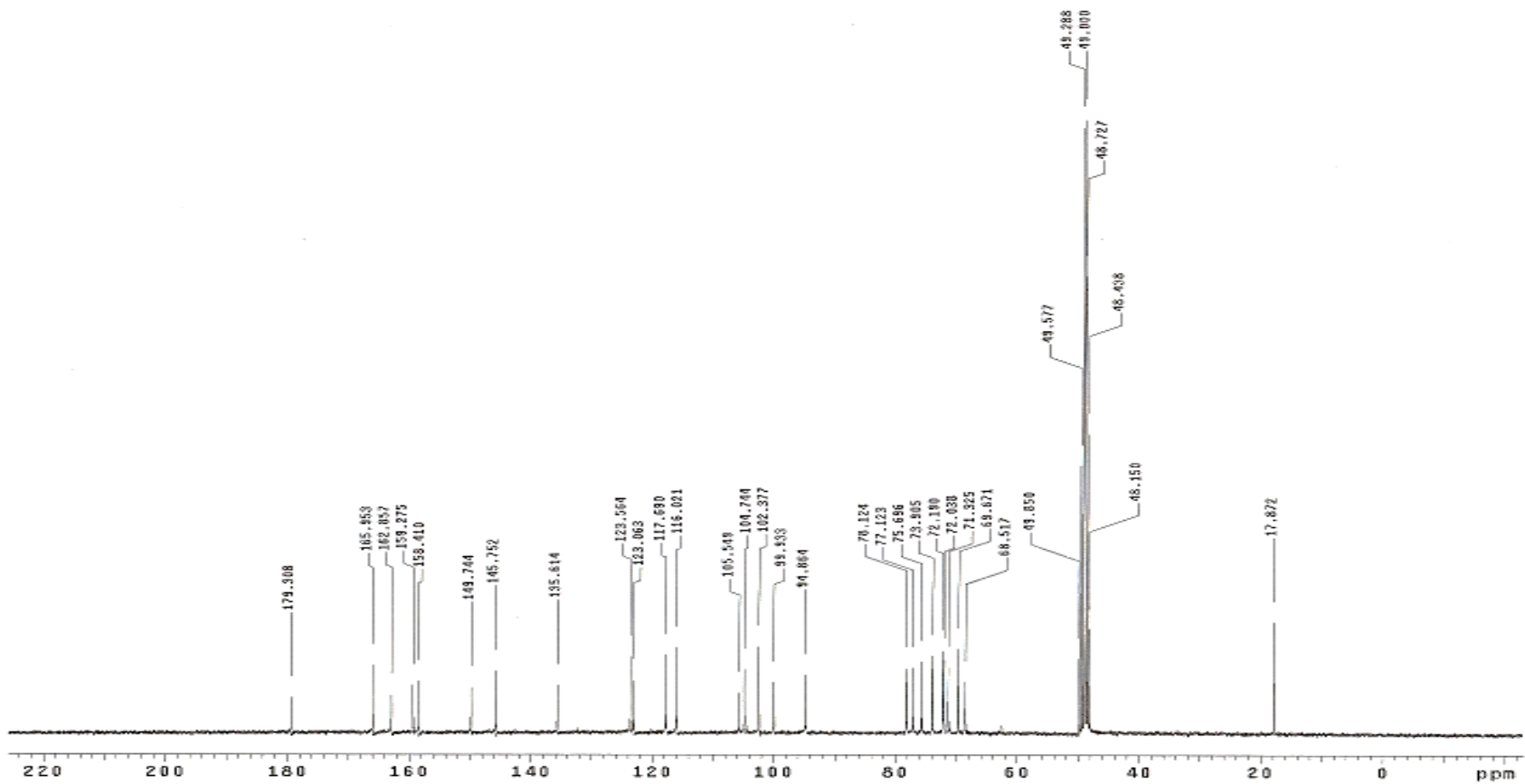


Figura 16: Espectro ressonância magnética nuclear de ¹³C da substância isolada (G3-1) a partir da fração Metanólica do extrato etanólico de *A. glabra* - 300 MHz, CD₃OD.

O espectro de RMN de ^1H da substância G3-1 (Figura 17, tabela 6) apresentou sinais para hidrogênios aromáticos em δ 7,62 (d, $J = 2,1$ Hz, H-2'); 7,66 (dd, $J = 2,1$ e 8,4 Hz, H-6'); 6,87 (d, $J = 8,4$ Hz, H-5'); 6,36 (d, $J = 1,8$ Hz, H-8) e 6,19 (d, $J = 2,1$ Hz, H-6). Observou-se ainda a presença de sinais que sugeriram a presença de duas unidades glicosídicas, pois apresentaram sinais múltiplos na faixa entre δ 3,29 a 3,81 combinados aos de dois hidrogênios anoméricos em δ 5,10 (d, $J = 7,2$ Hz, H-1'') e 4,52 (d, $J = 1,8$ Hz, H-1'''). De modo que, a primeira unidade foi identificada como glicose, pela presença de hidrogênios metilênicos em δ 3,81/3,39 (m, H-6''), sendo a segunda identificada como a ramnose, devido à presença de hidrogênios metílicos em δ 1,12 (d, $J = 6,0$ Hz, H6'''). Todos estes resultados coincidem com dados da literatura (NIASSY et al. 2004; ENDRINGER, 2007).

Na análise do espectro de massas para a substância G3-1 (Figura 18/), foi observado o íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 609. A fragmentação desse íon originou o íon de m/z 463 após perda de 146 unidades de massa referente à ramnose e o íon de m/z 301 com perda de 162 unidades de massa referente a glicose (FERRERES et al. 2004).

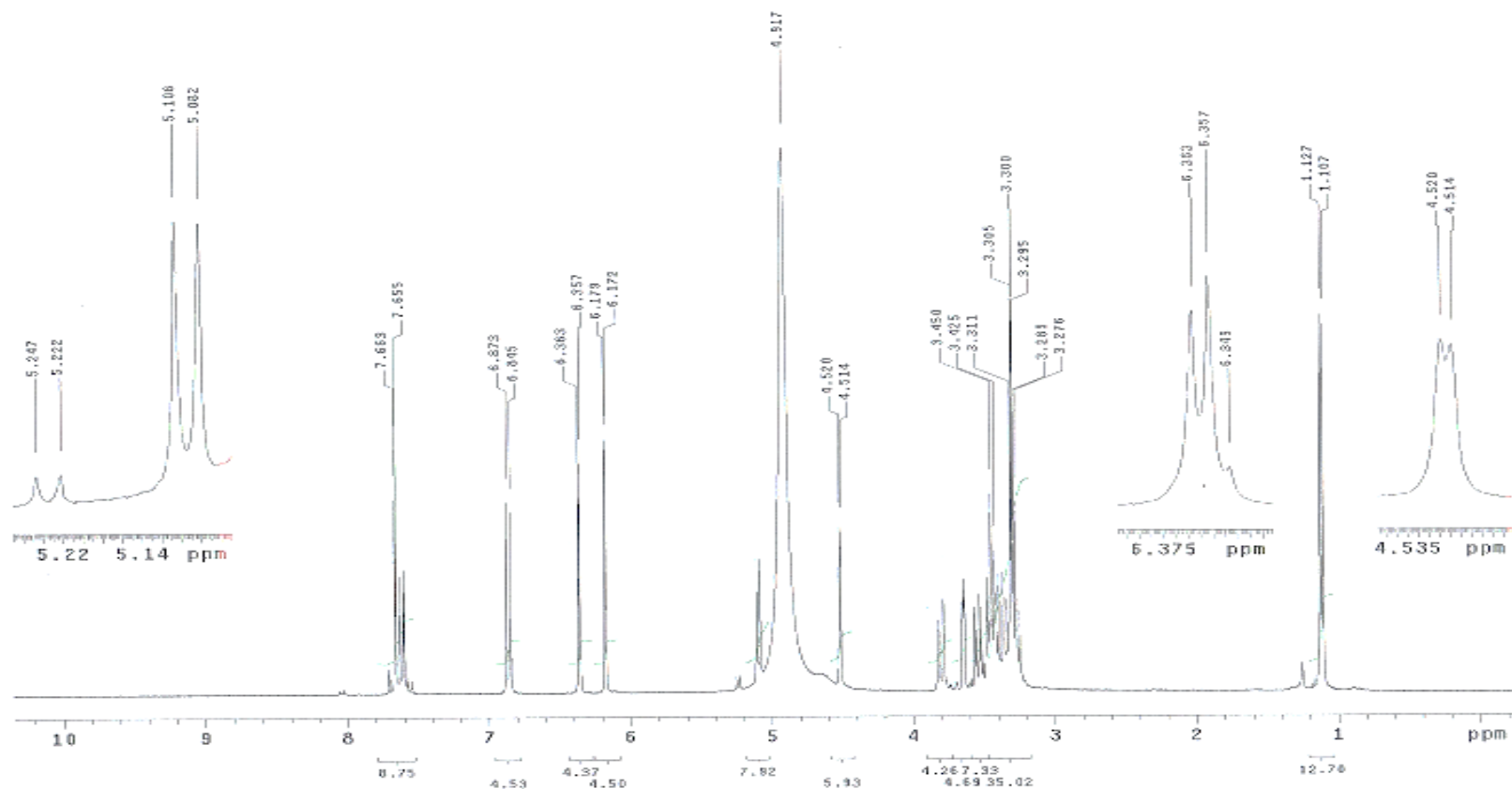


Figura 17: Espectro de Ressonância magnética nuclear de ^1H da substância isolada G3-1 da fração metanólica obtido do extrato etanólico de *A. glabra* – 300 MHz, CD_3OD .

Tabela 6: Dados das atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C da substância G3-1 isolada a partir da fração metanólica do extrato etanólico de *A. glabra* e dados da literatura.

Posição	Substância G3-1		Rutina ^a (Niassy et al. 2004)		Rutina ^b (Endringer, 2007)	
	δ H (ppm) (m, J em Hz)	δ C (ppm) (multiplicidade)	δ H (ppm)	δ C (ppm)	δ H (ppm)	δ C (ppm)
2	-	158,41	-	156,7	-	158,45
3	-	135,61	-	133,4	-	135,57
4	-	179,31	-	177,4	-	179,35
5	-	162,85	-	161,3	-	162,83
6	6,19 (d; 2,1)	99,93	6,19 (d; 1,9)	98,7	6,19 (d; 2;0)	100,0
7	-	165,95	-	164,1	-	166,04
8	6,36 (d;1,8)	94,86	6,38 (d; 1,9)	93,7	6,38 (d; 2,0)	94,97
9	-	159,27	-	156,5	-	159,38
10	-	105,54	-	104,0	-	105,58
1'	-	123,06	-	121,3	-	123,07
2'	7,62 (d; 2,1)	117,69	7,52 (d; 1,9)	116,4	7,65 (d; 2,0)	117,72
3'	-	145,75	-	144,8	-	145,78
4'	-	149,74	-	148,4	-	149,8
5'	6,87 (d; 8,4)	116,02	6,83 (d; 9,0)	115,2	6,86 (d; 8,4)	116,1
6'	7,66 (dd; 2,1; 8,4)	123,56	7,53 (dd; 2,2; 9,0)	121,7	7,61 (dd; 2,0 ;8,4)	123,6
1''	5,10 (d; 7,2)	102,33	5,34 (d; 7,1)	102,0	5,09 (d; 7,6)	104,66
2''	-	75,69	-	74,9	-	75,67
3''	-	78,12	-	77,4	-	78,10
4''	-	69,67	-	70,5	-	69,72
5''	-	77,12	-	76,0	-	77,11
6''	-	68,51	-	69,3	-	68,56
1'''	4,52 (d; 1,8)	102,86	4,38 (d; 1,1)	101,6	4,50 (d;1,2)	102,39
2'''	-	72,19	-	70,7	-	72,39
3'''	-	72,03	-	70,5	-	72,21
4'''	-	71,32	-	71,9	-	72,06
5'''	-	68,51	-	68,4	-	73,89
6'''	1,10 (d; 6,0)	17,87	0,98 (d; 6,3)	17,3	1,10 (d; 6,4)	17,9

Legenda: Substância G3-1 = dados obtidos no presente trabalho (300 MHz, CD₃OD). Rutina^a = dados relatados por Niassy et al. (2004) (200 MHz, CD₃OD). Rutina^b = Dados relatados por Endringer, (2007) (300 MHz, CD₃OD). d: duplete. dd: duplete duplo. m: multiplete. J: constante de acoplamento escalar, unidade Hertz.

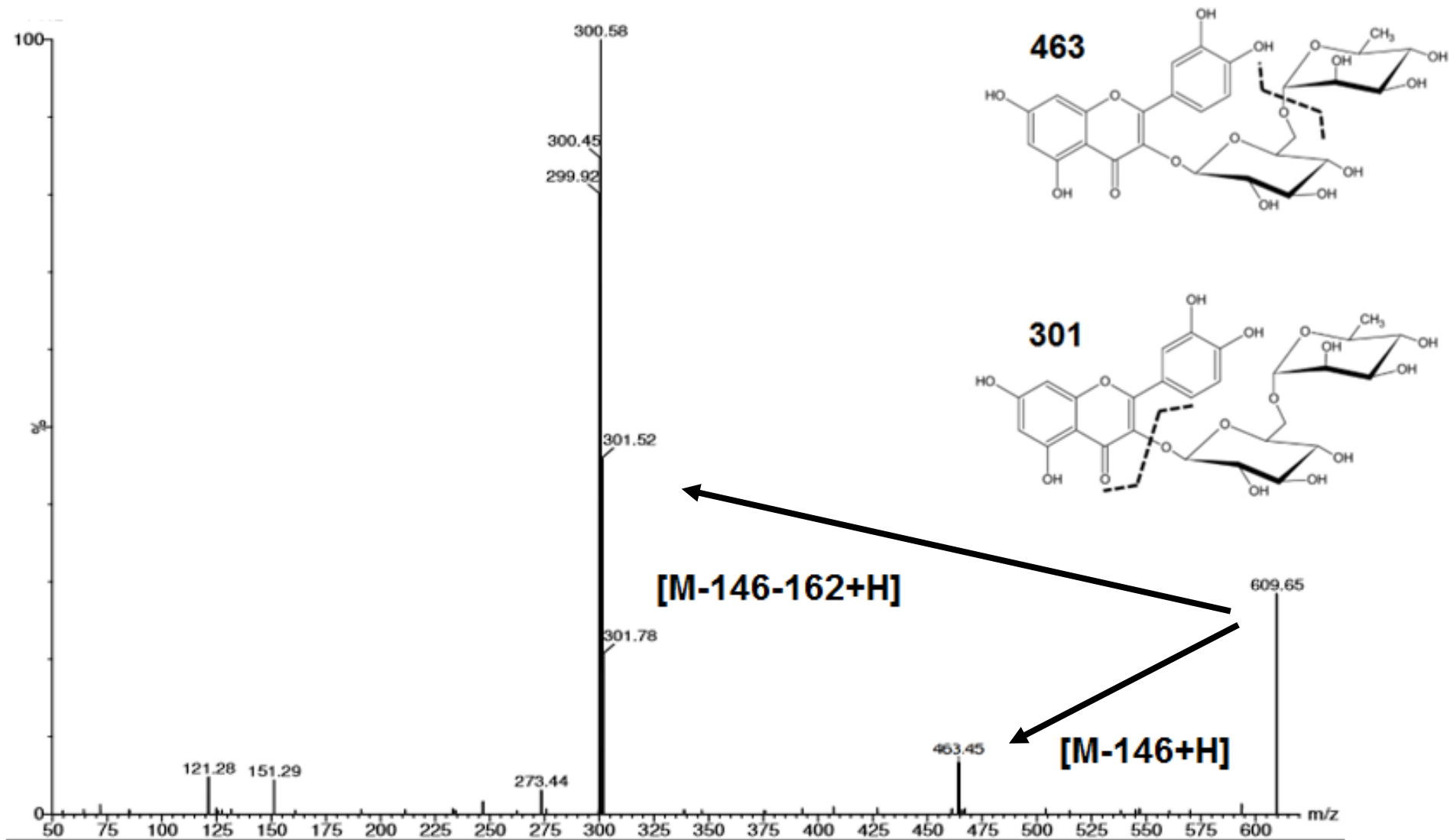


Figura 18: Espectro de massa de íons totais no modo negativo de ionização da substância G-1 obtida da fração metanólica do extrato etanólico da *A. glabra*.

Posteriormente, a partir dos dados obtidos através dos espectros e por comparação com a literatura, foi possível identificar a substância G3-1 como sendo a rutina (quercetina 3-O- α -L-raminopiranosil (1''' \rightarrow 6'')- β -glucopiranosídeo; Figura 19).

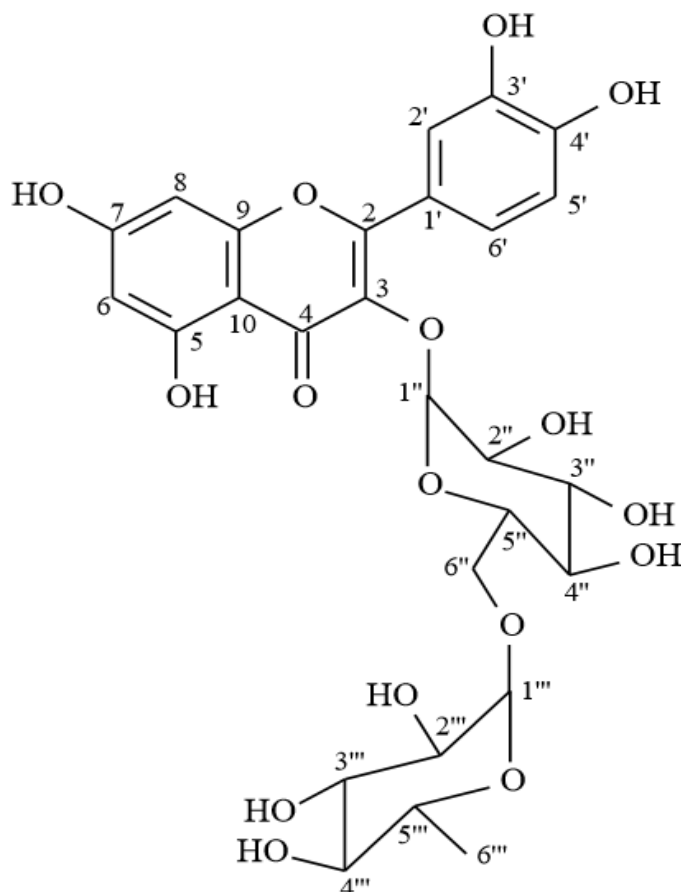


Figura 19: Estrutura química da substância G3-1.

A rutina é um flavonol que apresenta um dissacarídeo (glicose + ramnose) ligados na posição 3 do anel pirano, como se observa na Figura 18. Vários estudos relatam as propriedades biológicas desse composto, sendo que boa parte dos seus efeitos benéficos são similares às propriedades farmacológicas da quercetina (BECHO et al. 2009). Isso porque foi demonstrado que a rutina pode ser completamente hidrolisada por glicosidades produzidas por enterobactérias, além de sofrer hidrólise em pH estomacal, dando origem à

quercetina-3-glicosídeo e, posteriormente, a aglicona quercetina (ARAÚJO, 2013).

Este flavonóide é um dos mais estudados devido à diversidade de propriedades farmacológicas que esse composto possui (PEDRIALI, 2005). Entre as atividades terapêuticas da rutina, está a antioxidante, estando esse efeito provavelmente relacionado com as ações terapêuticas em patologias que envolvam radicais livres, sem promover toxicidade potencial (AFANAS'EV et al. 1989). Várias outras atividades da rutina vêm sendo elucidadas, como sua eficiência no tratamento da artrite e atividade antimicrobiana principalmente em infecções por *Candida albicans* (HAN, 2009), supressão da imunidade celular (MIDDLETON et al. 2000), atividade anticarcinogênica (MACHADO, 2005) e efeito anti-inflamatório (GUARDIA et al. 2001).

Araújo, (2013) também isolou a rutina das folhas na *Annona vepretorum*. Além disso, do extrato etanólico de folhas de *A. dioica* foram isolados os seguintes flavonoides glicosilados: 3-O-[3",6"-di-O-p-hidroxicinamoil]- β -galactopiranosil-canferol, 6"-O-p-hidroxicinamoil- β galactopiranosil-canferol e 3-O- β -galactopiranosil-canferol (VEGA et al. 2007).

5.3 Atividades Biológicas

Inicialmente, avaliou-se a atividade do extrato etanólico (EE) das cascas de *A. glabra* e suas frações (FH e FM) no ensaio de difusão em ágar frente as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gam-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

O EE, FH e FM não inibiram o crescimento das cepas de *P. aeruginosa* e nem da *E. coli* (Figura 20B e 20C). Portanto, foram considerados inativos frente a estes microorganismos.

A FH também foi inativa para a cepa de *S. aureus* (Figura 20A). No entanto, o EE e a FM inibiram o crescimento deste microrganismo apresentado halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos discos, evidenciado por setas vermelhas na Figura 9A, sendo considerado positivo. Em um estudo, o extrato metanólico das folhas de *A. squamosa*, contra esta mesma cepa de *S.*

aureus também apresentou halo de inibição sendo considerada positiva (AHER et al. 2012). A atividade antibacteriana vários extratos hidroalcolócos e aquosos (casca, folha e fruto) provenientes da *A. muricata* foi avaliada contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Verificou-se que nenhum destes mostraram-se ativos frente aos microrganismos testados (SILVA et al. 2011). A atividade antimicrobiana frente às bactérias *S. aureus* e *Streptococcus mutans* foi atribuída a flavonoides como quercetina e O-glicosídeos de quercetina (FEHLBERG et al. 2009),

Quando se compara o halo de inibição desta amostra ao do controle positivo (clorafenicol) verifica-se que o halo de inibição das amostras é visualmente inferior ao do controle. O teste de difusão em ágar é considerado um ensaio qualitativo, não podendo ser utilizado para comparação de extratos/frações/substâncias diferentes, visto que a difusão depende das propriedades físico-químicas do produto em avaliação (BUGNO et al. 2007). Logo, não se pode dizer que o EE e FM sejam menos ativos que o controle.

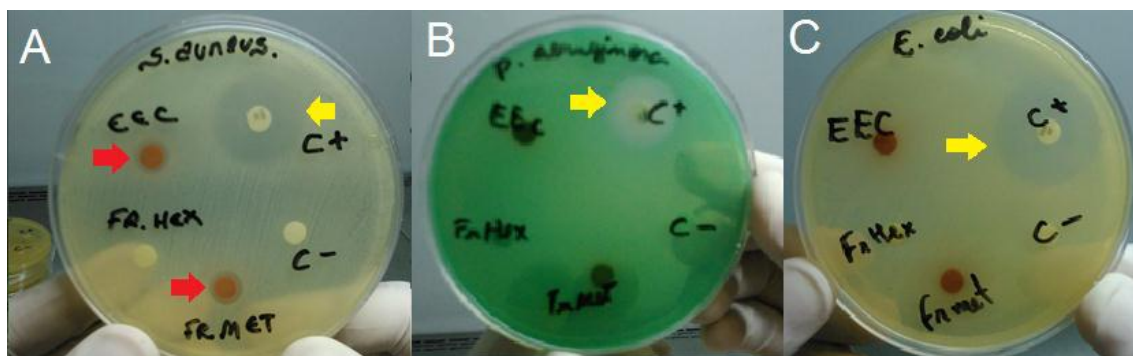


Figura 20: Difusão em ágar do pó das cascas de *A. glabra* e suas frações
Legenda: **A** - placa de *S. aureus*, **B** - placa de *P. aeruginosa* e **C** - placa de *E. coli*. halos de inibição do extrato etanólico e fração metanólica do pó das cascas de *A. glabra* indicados por setas vermelhas, e do controle positivo por setas amarelas (EEC) Extrato Etanólico, (FrHex) Fração Hexânica, (FrMet) Fração Metanólica, (C-) Controle negativo e (C+) Controle positivo.

Tendo em vista conhecer melhor a potencial da atividade antibacteriana do EE e FM contra a cepa de *S. aureus*, realizou-se o ensaio de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima. Esse método permite uma avaliação quantitativa (ELOFF, 1998), sendo um ensaio complementar ao teste de difusão em ágar. No presente estudo, o EE e FM obtidos a partir das cascas de *A. glabra*, não inibiram o crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas, pois as bactérias foram capazes de metabolizar o sal

de tetrazólio (Figura 21), logo estas amostras possuem um CIM muito elevado, sendo superior a 1000 µg/mL (Tabela 7), e por isso foram consideradas inativas de acordo com os critérios estabelecidos por Holetz et al. (2002), isto é, não possuem efeito bacteriostático. Os percentuais de inibição, em todas as concentrações, foram muito baixos, variando entre 0,5 a 35% para o EE, e 8,48 a 42,35% na FM.

O extrato etanólico e hidroalcólico provenientes das folhas da *A. classiflora* apresentaram atividade contra as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Bacillus cereus*), sendo o CIM < 250 µg/mL (LAGE, 2011), resultado que não corrobora com o presente trabalho.

Tabela 7: Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Extrato Etanólico e Fração Metanólica do pó das cascas de *A. glabra*.

Concentração (µg/mL)	% Inibição EE	% Inibição FM
1000	30,4	11,32
500	35	10,94
250	34,1	9,35
125	30,6	3,38
62,5	0,5	5,9
31,25	7,62	4,48

Legenda: (EE) Extrato Etanólico; (FM) Fração Metanólica.

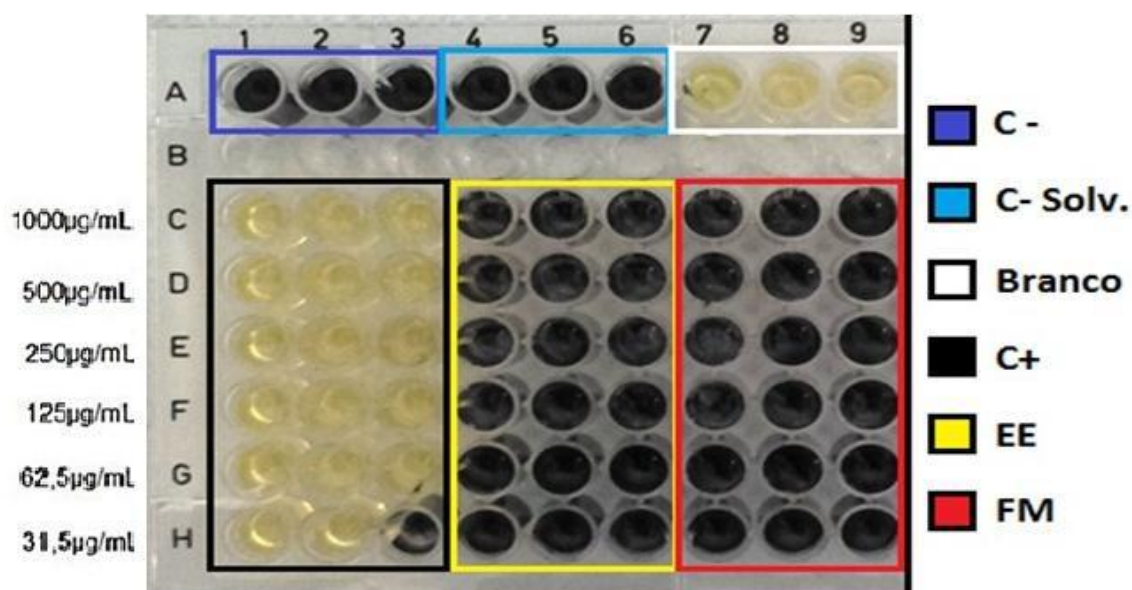


Figura 21: Microdiluição do pó das cascas de *A. glabra*.

Legenda: (C-) Controle negativo, (C- Solv.) Controle negativo do solvente, (C+) Controle positivo. (EE) Extrato Etanólico e (FM) Fração Metanólica.

5.3.1. Atividade antileishmania

5.3.1.1. Avaliação da atividade antipromastigota

O extrato etanólico obtido das cascas de *A. glabra*, nas concentrações testadas, não inibiu o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, apresentando uma viabilidade parasitária de 100% e com $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$, sendo considerado inativo (Tabela 8, Figura 24).

Análises fitoquímicas desta espécie a partir de extratos preparados das cascas (CHEN et al. 2000), folhas e frutos (CHANG et al. 1998) revelaram a presença de várias classes de metabólitos secundários, tais como alcaloides, flavonoides, diterpenos e acetogeninas. Alguns destes metabólitos foram ativos em *Leishmania*, a exemplo: Das sementes de *A. squamosa* as acetogeninas mostraram atividade leishmanicida frente formas promastigotas de *L. chagasi* (VILA-NOVA et al. 2011). Os alcalóides totais das folhas de *A. coriácea* mostraram atividade em formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (TEMPONE et al. 2005). Os alcaloides liriodenina e noraporfina isolados a partir das cascas e raízes de *A. spinescens* mostram-se ativas frente as formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* com morte de 100% nas concentrações de 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ (QUEIROZ et al. 1996). A ausência destes metabólitos pode explicar a falta de atividade.

Tais informações motivaram o fracionamento do extrato etanólico obtido das cascas de *A. glabra*, sendo que a hipótese foi que o fracionamento talvez contribuísse na atividade antipromastigota. Os extratos brutos obtidos das folhas e sementes de *A. mucosa* foram submetidos ao fracionamento originando frações: hexânicas e metanólicas. Os extratos e suas frações foram submetidos a avaliação da atividade antipromastigota de *L. amazonenses*. Observou-se que o fracionamento do extrato bruto obtido das folhas contribuiu para a atividade antipromastigota (fração metanólica CI_{50} de $24,24 \pm 1,51 \mu\text{g/mL}$; e hexânica CI_{50} de $28,32 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$). No caso do extrato bruto obtido das sementes, observou-se que o fracionamento contribuiu para atividade, sendo observadas

respostas similares entre a fração metanólica e hexânica (CI_{50} de 46.54 ± 4.95 $\mu\text{g/mL}$ e $44,22 \pm 5.56$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; LIMA et al. 2012).

A fração hexânica (FH) e fração metanólica (FM) obtido do fracionamento (partição) do extrato etanólico da casca de *A. glabra*, em *L. amazonensis*, apresentaram $CI_{50} > 200$ $\mu\text{g/mL}$, sendo consideradas inativas (Tabela 8, Figura 22). No entanto, observou-se que na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ da FM houve inibição de 20% da forma promastigota de *Leishmania*. A fração hexânica, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, houve inibição de 33,7% (Figura 22), mostrando que o fracionamento contribuiu para o aumento da atividade em aproximadamente 20%, o que sugere que substâncias ativas devem estar em baixos teores no extrato.

As subfrações Grupo 2 e substância G3-1 (rutina) provenientes da fração metanólica obtido do extrato etanólico da casca da *A. glabra*, apresentaram $CI_{50} > 200$ $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6), sendo consideradas inativas (Tabela 8), porém, na maior concentração testada (200 $\mu\text{g/mL}$), apresentaram frente as formas promastigotas de *L. amazonensis* inibição de 42% e 43,85% respectivamente (Figura 22), mostrando que a fracionamento contribuiu para o aumento da atividade. Em síntese, no presente estudo o fracionamento contribuiu de forma reduzida para atividade antipromastigota. Tal fato pode estar relacionado aos metabolitos secundários presentes nestas frações, flavonoides.

A atividade antiparasitária de flavonoides de acordo com os estudos realizados por Tasdemir et al. (2006), foi possível concluir que a quercetina e derivados (7,8 – dihidroxiflavona) são antiprotozoários potentes e eficazes. Ainda verificaram que a maioria dos compostos mais ativos que apresentam atividade leishmanicida têm uma estrutura típica de flavona. Araújo et al. (1998) testaram um isoflavonóide isolados de *Centrolobium sclerophyllum* (Leguminosae) sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. O isoflavonóide 7,3'-dihidroxi-4'-metoxi-isoflavona apresentou boa atividade antileishmania com CI_{50} de 77 $\mu\text{g/mL}$.

Outros estudos em que o fracionamento contribuiu para atividade antipromastigota de *Annona*, as frações em geral, continham alcaloides. Os alcalóides totais das folhas de *A. coriácea* apresentaram atividade em formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* ($CI_{50} = 41,6$ $\mu\text{g/mL}$; TEMPONE et al. 2005). O alcaloide liriodenina foi ativo em *L. guyanensis* ($CI_{50}: 21,5 \pm 0,4$ $\mu\text{g/mL}$;

COSTA et al. 2006), promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani* (100 µg/mL= 100% morte; QUEIROZ et al. 1996). A anomontina foi ativo em *L. brasiliensis* (CI₅₀: 34,8±1,5 µg/mL; COSTA et al. 2006), promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani* (50 e 24 µg/mL= 100% morte; QUEIROZ et al. 1996). A ausência destes metabolitos na *A. glabra* pode explicar a reduzida atividade antipromastigota.

Tabela 8 – CIM e CI₅₀ do extrato etanólico obtido da casca de *A. glabra* e suas frações testados em formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Amostras	<i>L. amazonensis</i>	
	CI ₅₀ (µg/mL)	
EE	>200	
FM	>200	
FH	>200	
Grupo 2	>200	
G3-1	>200	
Anfotericina B	<0,3906	

Legenda: CI₅₀ – Concentração Inibitória 50%; CIM – Concentração Inibitória Mínima; EE – Extrato Etanólico; FM – Fração Metanólica; FM – Fração Hexanica.

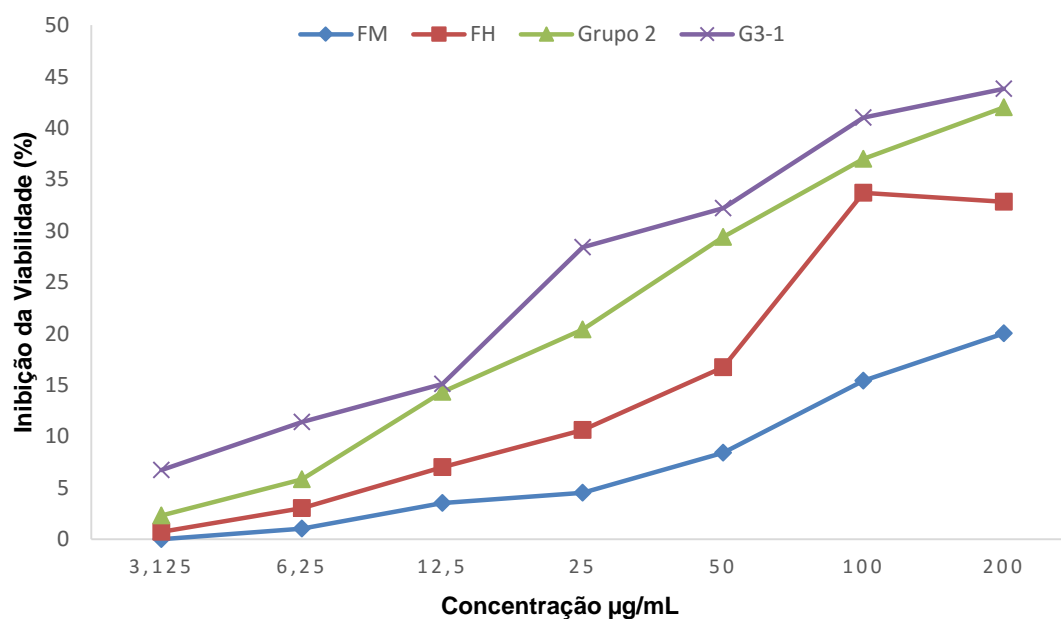


Figura 22: Efeito da Fração Hexânica (FH), Fração Metanólica (FM), Grupo 2 e substância G3-1(Rutina) obtidos do extrato etanólico das cascas de *A. glabra* frente formas promastigotas de *L. amazonensis*.

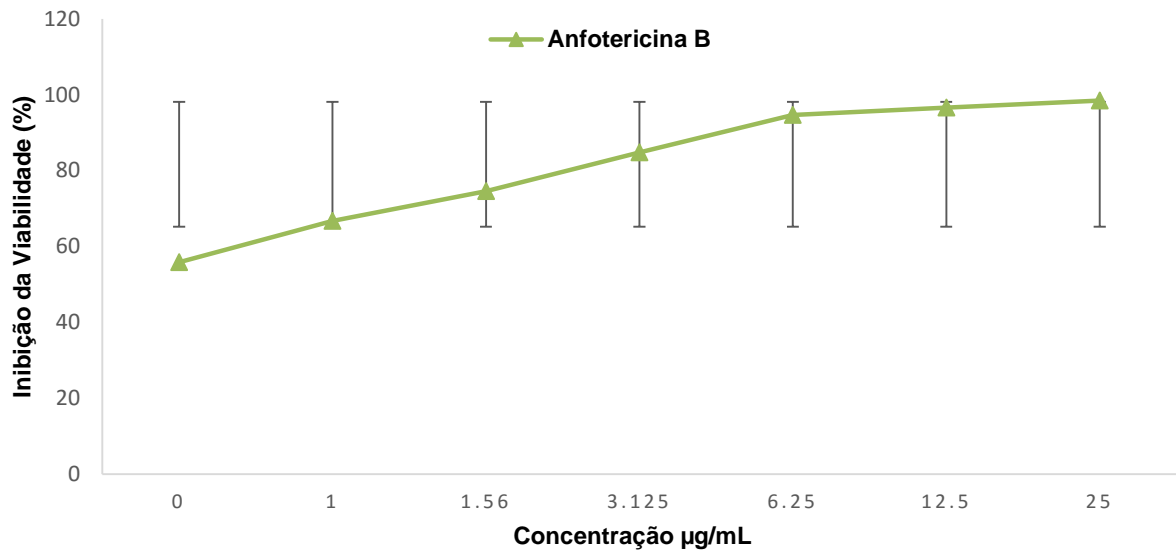


Figura 23: Efeito da Anfotericina B (controle positivo) sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.

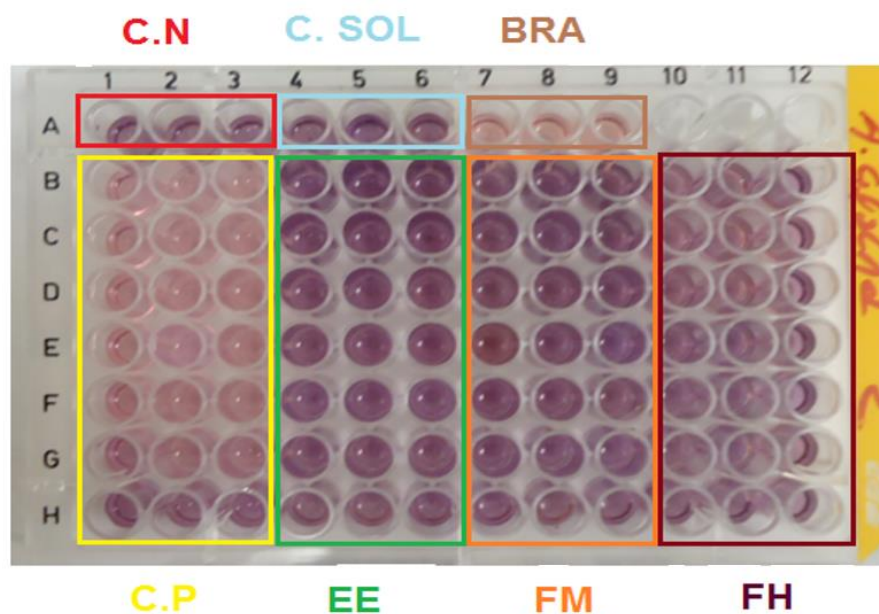


Figura 24: Atividade antipromastigota do extrato etanólico obtido das cascas de *A. glabra* e suas frações contra *L. amazonensis*.

Legenda: EE – Extrato etanólico; FM – Fração Metanólica; FH – Fração Hexânica nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL; CN – Controle Negativo; CSOL – Controle do Solvente (metanol); BRA – Branco; CP – Controle Positivo (Anfotericina B) nas concentrações de 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0,3960 µg/mL.

5.3.1.2. Avaliação da atividade anti-amastigota

Para o ensaio da atividade anti-amastigota, inicialmente o EE, FH, FM, Grupo 2 e substância G3-1 (rutina) foram avaliadas frente às células THP-1 diferenciadas (THP-1d), sendo determinadas as concentrações citotóxicas 50%. As células foram expostas aos tratamentos em diferentes concentrações por 48 horas.

A tabela 9 representa os resultados dos tratamentos sobre a viabilidade das células THP-1d. O EE juntamente com suas frações (FH e FM), grupo 2 e substância G3-1 não afetaram a viabilidade celular nas concentrações testadas, apresentando $CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ (Figura 26). Apenas a anfotericina B, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, apresentou diminuição da viabilidade das células em 14,5% e 30% respectivamente, apresentando $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (Figura 25 e 26). Dessa forma, como as amostras não afetaram a viabilidade celular, foram escolhidas para o ensaio anti-amastigota as concentrações de 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 9: CC_{50} e Índice de seletividade do extrato etanólico, frações, subfrações e substância isolada obtidas da casca da *A. glabra*

Amostras	Macrófagos (THP-1d)	<i>L. amazonensis</i>	Índice de Seletividade (IS)
	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
EE	>500	>200	>2,5
FH	>500	>200	>2,5
FM	>500	>200	>2,5
Grupo 2	>500	>200	>2,5
G3-1	>500	>200	>2,5
Anfotericina B	>100	>0,3906	256

Legenda: CC_{50} – Concentração citotóxica 50%; CI_{50} – Concentração inibitória 50%; EE – Extrato etanólico; FH – Fração Hexânica; FM – Fração metanólica; ND – Não determinado.

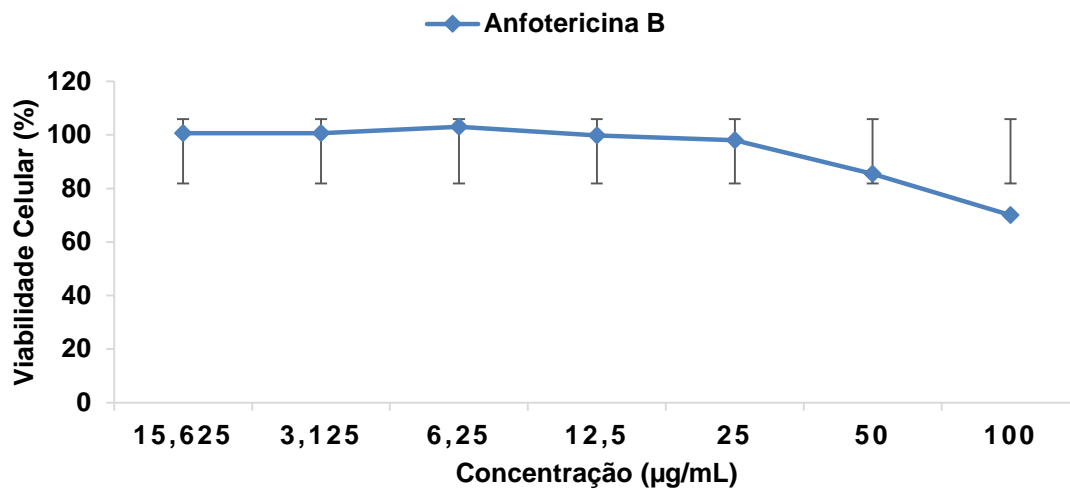


Figura 25: Efeito da Anfotericina B (controle positivo) sobre a linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana (THP-1d).

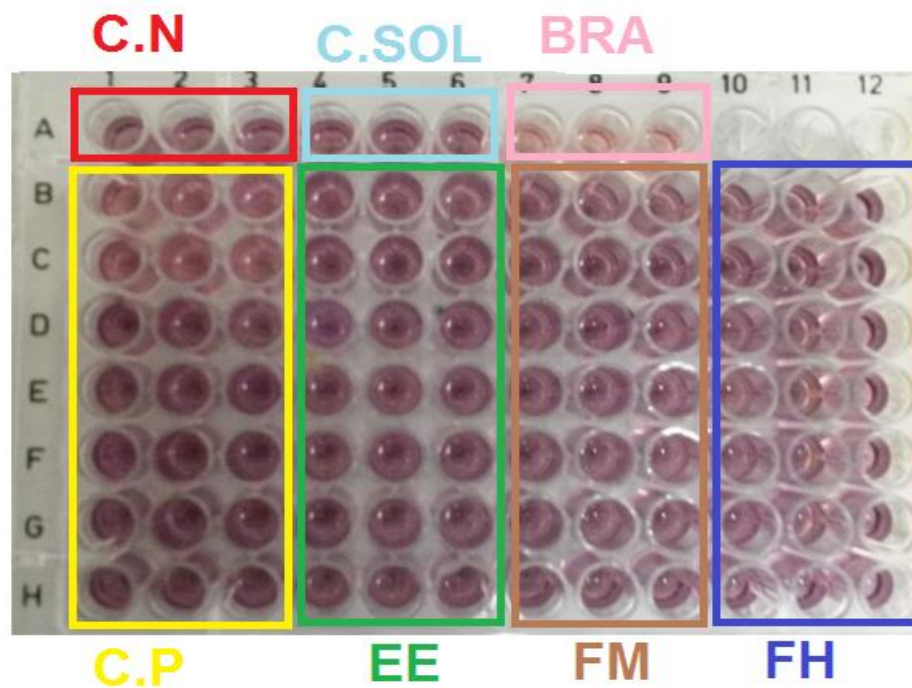


Figura 26: Ensaio de viabilidade celular do extrato etanólico e frações obtido das cascas de *A. glabra* frente a linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana (THP-1-d).

Legenda: EE – Extrato etanólico; FM – Fração Metanólica; FH – Fração Hexânica nas concentrações de 500, 250, 62,5, 31,625, 15,625, 7,8125 e 3,906 µg/mL; C.N – Controle Negativo; C.SOL – Controle do Solvente (metanol); BRA – Branco; C.P – Controle Positivo (Anfotericina B) nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 µg/mL.

Fonte: Acervo do autor

Na avaliação da atividade anti-amastigota, verificou-se o EE e a FM, em todas as concentrações (250, 125, 62,5 µg/mL), não ocasionaram reduções no número de amastigotas presentes nas células THP-1d infectadas quando comparadas com o controle sem fármaco (Tabela 9; Figura 29). Também observou-se a destruição dos macrófagos (THP-1), provavelmente ocasionada pelas formas intracelulares de promastigotas de *L. amazonensis*, pois conforme demonstrado anteriormente, as concentrações utilizadas no ensaio de viabilidade celular não ocasionaram destruição celular numa concentração superior (500 µg/mL) em relação ao utilizado neste ensaio (250 µg/mL).

Em extratos obtidos de outras espécies da família botânica da *A. glabra* (Annonaceae), já foram descritas atividades biológicas frente a forma amastigota de *Leishmania*. Tempone et al. (2005), avaliando a atividade antiprotozoários de extratos de plantas brasileiras produtoras de alcalóides, observaram índice de inibição de 86,1% e 27,2% na infecção de macrófagos por amastigotas intracelulares de *L. chagasi* no tratamento com 25 µg/ml de alcalóides totais das folhas da *A. crassiflora* e *A. coriacea*.

A atividade anti-amastigota de espécies de Annonaceas já foram atribuídas a alguns metabólitos a exemplo da *A. squamosa* onde do extrato etanólico proveniente das sementes de *A. squamosa* foi isolada uma acetogenina trihidroxilada com dois anéis tetraidrofurânicos e anel lactônico α,β -insaturada, esta substância mostrou ação leishmanicida frente forma amastigota de *L. chagasi* (VILA-NOVA et al. 2011). Em outro estudo, os alcalóides totais das folhas de *A. coriacea* Mart. revelaram atividade em formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, causando a morte de 27,2% dos parasitas, à concentração de 20 µg/mL. A ausência desses metabólitos pode justificar a falta de atividade no presente trabalho.

A FH, para as concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL, observou-se inibição das amastigotas presentes nas células quando comparada com o controle sem fármaco, apresentando inibição de 39,1%, 18,7% e 4,6% respectivamente, no entanto, foram consideradas inativas quando comparada com controle positivo (Anfotericina B) nas concentrações de 50, 25, 12,5 µg/mL que apresentou taxa de inibição de 86,7, 81,5 e 79,9% respectivamente (Tabela 9; Figura 28).

A inibição de 39,1%, 18,7% e 4,6% da FH nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL frente a avaliação da atividade anti-amastigota pode estar relacionado com a baixa polaridade dos constituintes presentes na amostra. Estudos preliminares (CLAE-DAD) demonstraram que os principais picos são sugestivos de flavonoides. No entanto, a FH não foi trabalhada para identificação dos compostos, necessita-se de uma análise mais criteriosa, a saber, quais substâncias que atuam, de forma eficaz, sobre o protozoário. A menor polaridade das substâncias pode ser um fator importante na atividade leishmanicida, isto é composto mais apolar, em geral, são mais ativos frente as formas promastigota e amastigota de *Leishmania* (PEREIRA et al. 2010). De modo geral, substâncias baixa polaridades são mais ativas em células (URZÚA et al. 2008).

O grupo 2 (fração rica em flavonóides) e a substância G3-1 (Rutina) também foram considerados inativas frente a forma amastigota de *L. amazonensis*, não apresentaram nenhuma taxa de inibição nas concentrações testadas. Além disso, foi observado intensa destruição celular (macrófagos) provavelmente causada pelo parasita tendo em vista que as amostras não foram tóxicas no ensaio de viabilidade celular (Tabela 9; Figura 29).

Metabólitos pertencentes a classe dos flavonóides podem ser encontrados em diversas plantas da família Annonaceae e também em outras famílias, no entanto, ainda há carência em estudos avaliando a atividade leishmanicida destes compostos. Muzitano et al. (2006), observaram que a quercetina isolada da *Kalanchoe pinnata*, exibiu atividade leishmanicida contra *L. amazonenses*. Ainda descreveram que a inibição da arginase pela quercetina pode ser um importante mecanismo de ação contra diversas espécies de *Leishmania*, pois a arginase sintetiza arginina em ornitina e uréia, e a ornitina é essencial na proliferação celular (SILVA et al. 2012).

A Rutina (G3-1), flavonóide isolado no presente trabalho, apresenta uma importância terapêutica variada como: anti-alérgico (SHEN et al. 2012); pró-carcinogênico, reduzindo os danos ao DNA em células hepáticas (MARCARINI et al. 2011); antioxidante (KIM et al. 2011) e anti-inflamatória (SELLOUM et al. 2003). Porém, a avaliação da atividade leishmanicida este composto também é carente. Todavia, estudos na procura de novas vacinas contra a leishmaniose

visceral vêm utilizando a rutina como adjuvante em sua composição com resultados promissores (OLIVEIRA-FREITAS et al. 2006).

Tabela 10 – Avaliação da atividade anti-amastigota do EE, suas frações, subtrações e substância isolada obtida das cascas de *A. glabra* em macrófagos (THP-1d) infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.

Amostras	Índice de Inibição (%)		
	Concentrações (µg/mL)		
	250	125	62,5
EE	0	0	0
FM	0	0	0
FH	39,1%	18,7%	4,6%
Grupo 2	0	0	0
G3-1	0	0	0

	Concentrações (µg/mL)		
	50	25	12,5
Anfotericina B	86,7	81,5	79,9

Legenda: EE – Extrato etanólico; FM – Fração metanólica; FH – Fração Hexânica.

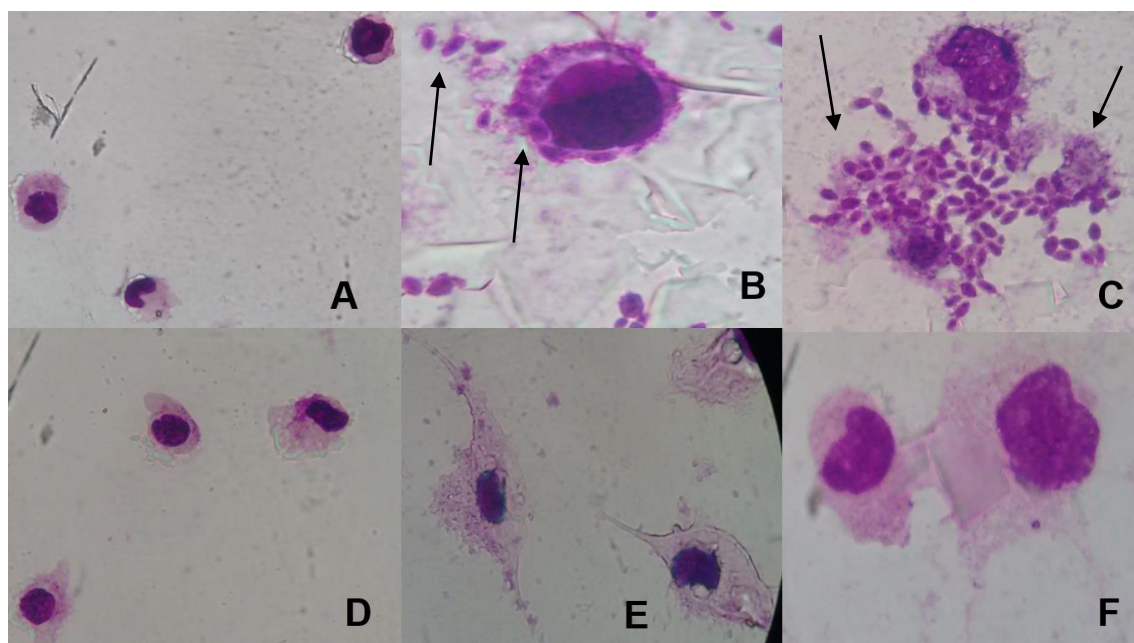


Figura 27: Ensaio da atividade anti-amastigota, mostrando macrófagos não infectados, infectados com amastigotas de *L. amazonensis* tratados com Anfotericina B.

Legenda: **A** – Controle de macrófagos não infectados (aumento de 100x); **B** – Controle negativo; **C** – Controle do solvente; **D** – Ação anti-amastigota da Anfotericina B na concentração de 50 µg/mL (aumento de 100x). – Ação anti-amastigota da Anfotericina B na concentração de 25 µg/mL (aumento de 100x); **F** – Ação anti-amastigota da Anfotericina B na concentração de 12,5 µg/mL (aumento de 100x). As setas indicam a presença de amastigotas.

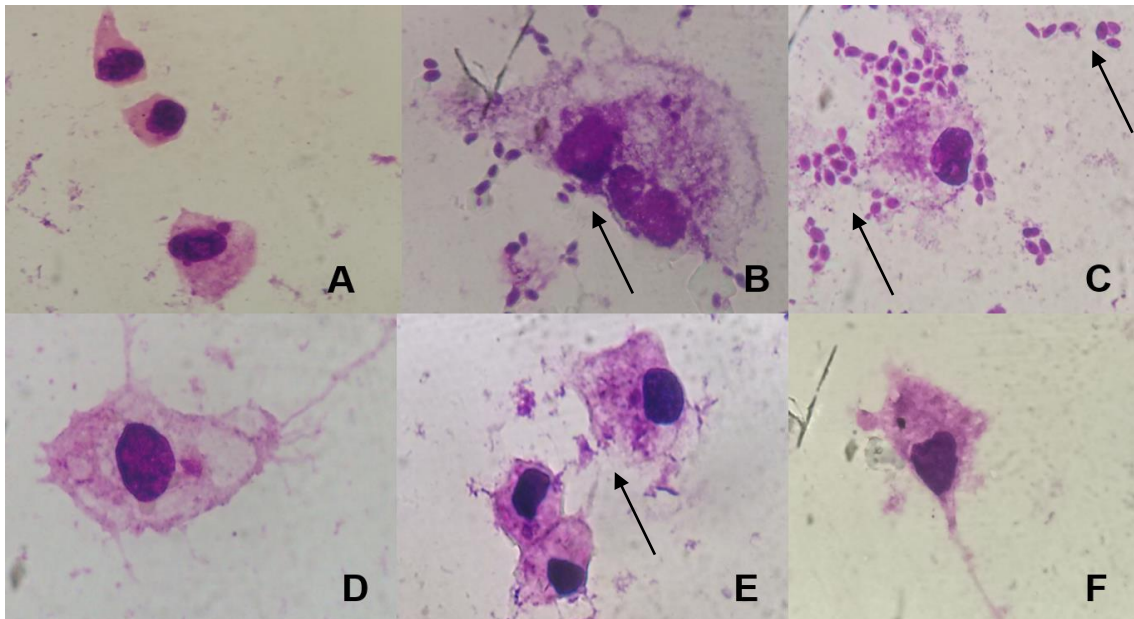


Figura 28: Ensaio da atividade anti-amastigota, mostrando macrófagos não infectados, infectados com amastigotas de *L. amazonensis* tratados com a fração Hexânica (FH) obtida do extrato etanólico da *A. glabra*.

Legenda: **A** – Controle de macrófagos não infectados (aumento de 100x); **B** – Controle negativo (aumento de 100x); **C** – Controle do solvente (aumento de 100x); **D** – Ação anti-amastigota da fração hexânica (FH) na concentração de 250 µg/mL (aumento de 100x). **E** – Ação anti-amastigota da Fração Hexânica (FH) na concentração de 125 µg/mL (aumento de 100x); **F** - Ação anti-amastigota da Fração Hexânica (FH) na concentração de 62,5 µg/mL (aumento de 100x). As setas indicam a presença de amastigotas.

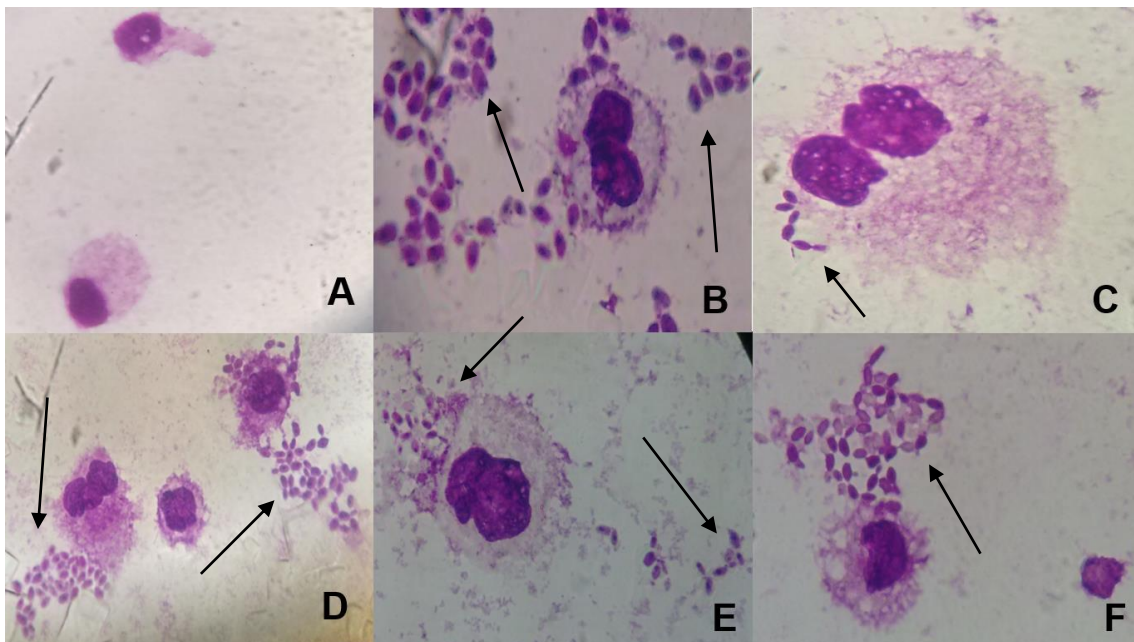


Figura 29: Atividade anti-amastigota, mostrando macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o extrato etanólico, frações e subfrações da *A. glabra*.

Legenda: **A** – Controle de macrófagos não infectados (aumento de 100x); **B** - Controle Negativo (aumento de 100x); **C** – Ação anti-amastigota do Extrato etanólico (EE) na concentração de 250 µg/mL (aumento de 100x); **D** – Ação anti-amastigota da Fração Metanólica (FM) na concentração de 250 µg/mL (aumento de 100x). **E** – Ação anti-amastigota do Grupo 2 na concentração de 250 µg/mL (aumento de 100x). As setas indicam a presença de amastigotas; **F** – Ação anti-amastigota da substância G3-1 na concentração de 250 µg/mL (aumento de 100x).

7 CONCLUSÃO

Os estudos farmacognósticos mostraram que o pó obtido das cascas de *A. glabra* está dentro dos parâmetros preconizados pela Farmacopéia Brasileira V ed. (2010). O EE, frações (metanólica e hexânica) e subfrações (Grupo 2 e 3) sugerem a presença de compostos pertencentes à classe de flavonóides quando analisados por métodos espectroscópicos. A amostra G3-1 foi isolada e identificada como sendo o flavonoide Rutina.

Na atividade antimicrobiana, o EE, FM e FH mostraram-se inativas frente as cepas testadas (*S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) ($CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$). Nos estudos de atividade antipromastigota o EE, FH, FM, grupo 2 e substância G3-1 mostram-se inativos frente *L. amazonensis* ($CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$). No ensaio anti-amastigota, verificou-se que todas as amostras (EE, FM, FH, Grupo 2 e G3-1) não apresentaram toxicidade para os macrófagos (THP-1d) ($CI_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$) e foram inativas frente a forma amastigota de *L. amazonensis*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, J. L. **Estudo da atividade anti-HSV-1 de terpenos isolados de algas pardas marinhas.** 2006, 75 p. Dissertação (Mestrado em neuroimunologia), Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

AFANAS'EV, J. B.; DOROZHKO, A. J.; BRODSKILL, A. V.; KOSTYUK, V. A.; PATAPOVITCH, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, p. 1763-1769, 1989.

AHER, P. S.; SHINDE, Y. S; CHAVAN, P. P. *In vitro* evaluation of antibacterial potential of *Annona squamosa* L. against pathogenic bacteria. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 5, p. 1457-60, 2012.

AKENDENGUE, B.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. **Parasite**, v. 6, p. 3-8, 1999.

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, E. J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Product**, v. 62, n. 3, p. 504- 540, 1999.

ALEGRE, J. L. Infecciones nosocomiales en niños Antecedentes en hospitales del tercer nivel de atención. **Rev. Med. IMSS**, v. 38, n. 6, p. 497-505, 2000.

ALEIXO, J. A.; NASCIMENTO, E. T.; MONTEIRO, G. R.; FERNANDES, M. Z.; RAMOS, A. M. O.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; JERONIMO, S. M. B. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Trans Royal Soc of Trop Med and Hyg**, v. 100, p. 79-82, 2006.

ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANEO, A.; ABAD, B. BERMUTE, L. A.; GALLO, B.; VIATE, F. Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 52, p. 2938-2552, 2004.

ALVARENGA, D. G.; ESCALDA, P. M. F.; COSTA, A. S. V.; MONREAL, M. T. F. D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados a letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 194-197, 2010.

ALVES, T. M.; CHAVES, P. P.; SANTOS, L. M.; NAGEM, T. J.; MURTA, S. M.; CERAVOLO, I. P.; ROMANHA, A. J; ZANI, C. L. A Diterpene from *Mikania obtusata* Active on *Trypanosoma cruzi*. **Plantas Mediciniais**, v. 61, p. 85-87, 1995.

ANDERSON, A.; MAIKHAN, C. Flavonoides chemistry, and applications, nurse proof, **Chemistry, Biochemistry and Applications** v. 11, 1197.p, 2009.

ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. Ocorrência de Bactérias Multirresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. **RBTI - Revista Brasileira Terapia Intensiva**. v. 18, n. 1, p. 27-33, 2006.

ANDRADE, E.; NAVARRO, P.; RODRIGUÉZ, J.; RODRIGUEZ, P.; VILLARROEL, E. Evaluación bacteriológica de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiot. infecc.**, v. 10, n. 1, p. 29-32, 2002.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbor *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 392-401, 1998.

ANURADHA, S. D.; SIMIT, H. K.; SUJATA, M. B. Prevalence of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in intensive care areas in a tertiary care hospital. **Indian J. Crit. Care Med.**, v. 14, n. 4, p. 217-219, 2010.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Projeto Hospitais sentinela**. Brasil. 2010 Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/sentinela/>. Acesso em Abril de 2015.

AQUINO, F. G.; WALTER, B. M. T.; RIBEIRO, J. F. Espécies Vegetais de Uso Múltiplo em Reservas Legais de Cerrado - Balsas, MA. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 147-9, 2007.

ARAUJO, C.A.C, ALEGRIO, L.V, LEON, L.L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**,; v. 49, n. 3, p. 751-4, 1998.

ARAÚJO, C.S. **Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae)**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Vale do São Francisco. 2013, 198p.

AZEREDO-COUTINHO, R. B.; CONCEICAO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLILLO, E.; QUINTELLA, L. P.; MADEIRA, M. F.; PACHECO, R. S.; VALETE-ROSALINO, C. M.; MENDONCA, S. C. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**, v. 101, n. 7, p. 735-737, 2007

BARBER, M. Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strain. **British Medical Journal**, v. 2, p. 863-865, 1947.

BARBER, M.; ROZWADOWSKA-DOWZENKO, M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. **Lancet**, v. 2, p. 641-4, 1948.

BARNI, S. T.; FILHO, V. C.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 865-70, 2009.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MECMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO, J. A.; ALMEIDA R.; BADARO, R.; Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Trans Royal Soc of Med and Hyg**, v. 44, p. 536-546, 1991.

BARRET, T. V.; SENRA, M. S. Leishmaniasis in Manaus Brazil. **Parasitology Today**, v. 5, n. 8, p. 255-257, 2004.

BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bio-guiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.) N. E. Brown**. 2008. 162p. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2008.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-6, 1966.

BECHO, J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.O. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ADORNO, N. Infectious diseases – a global challenge. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 179-185, 2006.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I. Acetogenesis from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action, **Natural Products Reporter**, v. 22, p. 269-303, 2005.

BERQUIÓ, L. S. Utilização de medicamentos para tratamento de infecções. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 528-234, 2004.

BHAKUNI, D. S.; TEWARI, S.; DHAR, M. M. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1819-22, 1972.

BHAKUNI, D. S.; TEWARI, S.; DHAR, M. M. Aporphine alkaloids of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1584-1586, 1979.

BLOCK, L. C.; SANTOS, A. R. S.; SOUZA, M. M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, M. A.; MONACHE, F.; CECHINEL, V. Chemical and Pharmacological Examination of Anti-conceptive Constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal Ethnopharmacy**, v. 61, p. 85-9, 1998.

BOHLMANN, F.; RAO, N. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

BOSCOLO, O. H. Para comer, para beber ou para remédio? Categorias de uso múltiplo em Etnobotânica. **Cadernos UniFOA**, ed. especial, maio, 2013.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Série Botânica**, v. 63, n. 2, p. 263-77, 2008.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E M.; DIGNART, S. L. Luz natural e sistemas de vedação na propagação *in vitro* de *Dendranthema grandiflora*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 371-374, 2007.

BRAGA, T. V.; OLIVEIRA, OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES. R. G. R.; NAGGEM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson e C. E. Jarvis subsp. *Verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista Ciência Farmacêutica Básica**, v. 28, n. 3, p. 287-90, 2007.

BRASIL, 2007. **Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. 2 ed.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_ita_2ed.pdf> Acesso em abril de 2015.

BRASIL, 2011. **Postal da Saúde – Glossário – Leishmaniose Tegumentar.** Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454> Acesso em abril de 2015.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira.** 5 ed. v. 1. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV.** Série A. normas e manuais técnicos. 1ª edição., Brasília-DF: MS, 2013. 105 p. disponível em: <<http://ftr2013.saude.gov.br/editora/produtos/livros/generos/00a.htm>> Acesso em maio de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos-Formulário Terapêutico Nacional: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS **RENISUS**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/bvs>>. Acessado em junho de 2015.

BRINGMANN, G.; RUCKERT, M.; MESSER, K.; SCHUPP, O.; LOUIS, A. M. Acetogenic isoquinoline alkaloids CXXI. Use of on-line high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry coupling in phytochemical screening studies: rapid identification of metabolites in *Dioncophyllum tholloni*. **Journal of Chromatography A**, v. 837, p. 267-272, 1999.

BRITO, A.; LANDAETA, J.; ROLDÁN, Y. Resistencia da *Pseudomonas aeruginosa* a la gentamicina, tobramicina amikacina em Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 20, n. 1, p. 42-45, 2000.

BUGNO, A.; BUZZO, A. A.; NAKAMURA, C. T.; PEREIRA, T. C.; MATOS, D.; PINTO, T. J. A. Avaliação da Contaminação Microbiana em Drogas Vegetais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 491-7, 2005.

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, F. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v. 72, p. 599-618, 2001.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 540-546, 2003.

CAVALIERI, S. J.; BOHACH, G. A.; SNYDER, I. S. *Escherichia coli* α -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. **Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 326-343, 1985.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M.; Plant products with leishmanicidal activity. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 674-678, 2001.

CHANDA, S. & RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**, v. 1, n. 13, p. 520-529, 2011.

CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; HSIEH, T. J.; CHO, C. P.; WU, Y. C. Chemical constituents from *Annona glabra*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 47, p. 913-920, 2000.

CHANG, F. R.; WU, Y. C. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal Natural Product**, v. 64, n. 7, p. 935-31, 2011.

CHANG, F. R.; YANG, P. Y.; LIN, J. Y.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Product**, v. 61, p. 437-439, 1998.

CHATROU, L. W. The *Annonaceae* and the *Annonaceae* Project: a brief overview of the state of affairs. **Acta Horticulturae**, v. 497, p. 43-9, 1999.

Chen, C.Y., F.R. Chang, C.P. Cho, e Y.C. Wu. ent-Kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal Natural Product**. V. 63, p. 1000-3, 2000.

CHEN, C. H.; HSIEH, T. J.; LIU, T. Z.; CHERN, C. L.; HSIEH, P. Y.; CHEN, C. Y. Annoglabin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annonacin from the fruits of *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, n. 67, p. 1942-1946, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**: approved standard. 8 ed. CLSI document M07-A8, v. 29, n. 2, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing**. CLSI document M100-S19. Wayne, P.C.L.S.I., 2009.

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1-2, p. 95-106, 1998.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. **Monosaccharides**. Chichester: John Willey e Sons, 574p. 1995.

CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDÓN, A. J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect in the host. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 603-610, 1972.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3 ed. v. III. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2001.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B., XAVIER, C. M.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P. A pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity, **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 292-294, 2006.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; DUARTE, M. C. T.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 78-81, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M.; FARIAS, P. A.; VIANA, G. S.; CUNHA, K. M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. The Cytotoxic and Embryotoxic Effects of Kaurenoic Acid, a Diterpene Isolated from *Copaifera langsdorffii* Oleo-Resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-4, 2002.

COUVREUR, T. L. P.; MAAS, P. J. M.; MEINKE, S.; JOHNSON, D. M.; KEBLER, P. J. A. Keys to the genera of Annonaceae. **Botanical Journal of Linnean Societ**, v. 169, p. 74-83, 2012.

CROAT, T. **Flora of Barro Colorado Island**. Stanford: Stanford University Press, 1978.

CROFT, S.; COOMBS, G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 502-508, 2003.

CRUZ, P. E. O.; COSTA, E.V.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; VENDRAMIN, M. E.; BARISON, A.; FERREIRA, A. G.; PRATA, A. P. N. Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 872-5, 2011.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002.

DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J. A.; MARRIOTT, H. M.; WHYTE, M. K. B.; DOCKRELL, D. H. The Identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and Monocyte-Derived Macrophages. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. 8668, 2010.

DARABAS, A. M; MOREIRA, J; ROSSATO, A. E; CITADINI-ZANETTE, V. AMARAL, P. A. *Casearia sylvestris* SW. (SALICACEAE) e *Jacaranda puberula*

CHAM. (Bignoniaceae): uso popular versus literatura científica. **Visão acadêmica**, v. 10, n. 1, p. 518-519, 2009.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiências**, v. 7, 2006.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the sPread of leishmaniases: towards integrated monitoing. **Trends Parasitol**, v. 22, p. 4-6, 2006.

ELOFF, J. N. A. Sensitive an quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-3, 1998.

ENDRINGER, D. C. **Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa gomes* (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (eca) e efeito na quimioprevenção de câncer**. 2007. 259p. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

FEHLBERG, I.; OLIVEIRA, R. A.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. **Atividade antibacteriana de flavonóides e triterpenos de *Myrcia guianensis***. 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Fortaleza- CE, 2009.

FERRERES, F; LLORACH, R.; GIL-IZQUIERDO, A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosilated flavonois and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Sptrometry**. v. 39, n.3, p. 312-321, 2004.

FILLIPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p.167-194, 2006.

FLECKENSTEIN, J. M.; KOPECKO, D. J.; WARREN, R. L.; ELSINGHORST, E. A. Molecular characterization of the tia invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Immunology and Infection**, v. 64, p. 2256-65,1996

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenza. **British Journal of Experimental Pathology**, v.10, p. 226-236,1929.

FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 177-90, 2004.

FORMAGIO, A. S. N; MASETTO, T. E.; BALDIVIA, D. S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; PEREIRA, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 8, n. 4, p. 349-54, 2010.

FOURNET, A.; ARIAS, A. R.; FERREIRA, M. E.; NAKAYAMA, H.; ORTIZ, S. T.; SCHININI, A.; SAMUDIO, M.; BILÃO, N. V.; LAVVAULT, M.; BONTÉ, F. Efficacy of the bisbenisoquinoline alkaloids in acute and chonic *Trypanossoma cruzi*

murine model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 189-195, 2000.

FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Annonacea essential oils: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 131-142, 1999.

GIL, L. H. S.; BASANO, S. A.; SOUZA, A. A.; SILVA, M. G. S.; BARATA, I.; ISHIKAWA, E. A.; CAMARGO, L. M. A.; Recent observations on the sandfly (Díptera: Psychodidae) fauna of the state of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 751-75, 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRABIN, C. S.; UCHOA, F. D.; BERNARDES, L. S. C., CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Antiprotozoal agentes: an overview. **Anti-infective agentes in medicinal chemistry**, v. 8, p. 345-336, 2009.

GRANDIC, S. R.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P.M. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomedical. and Pharmaceutical**, v 58, p. 388 - 392, 2004.

GRIMALDI JUNIOR, G. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 2, p. 195-215.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B.; McMAHON PRATT, D. A. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. Q.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties os plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Pharmacology**, v. 56, p. 683-687, 2001.

HAGBERG, L.; JODAL, U.; KORHONEN, T. K.; LIDIN-JANSON, G.; LINDBERG, U.; SVANBORG-ÉDEN, C. Adhesion, hemagglutination and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Immunology and Infection**, v. 31, n. 2, p. 564-70, 1981.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current satatus and future directions. **Molecular Biology International**, v. 8, p. 67-90. 2011.

HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 207-211, 2009.

HARBORNE, J. B. **Plant Chemosystematics**. London: Academic Press, 1984.

HIRAMATSU, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 40, p. 135-6, 1997.

HOET, S.; STÉVIGNY, C.; BLOCK, S.; OPPERDOES, F.; COLDON, P.; BALDEYROU, B.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; QUÉTIN-LECRERCQ, J. Alkaloids from *Cassyth filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. **Planta Medica**, v. 70, p. 407-413, 2004.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-31, 2002.

HSIEH, T. J.; WU, Y. C.; CHE, S. C.; HUANG, C. S.; CHEN, C. Y. Chemical Constituents from *Annona glabra*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 51, p. 869-76, 2004.

IBRAHIM, M. E.; BILAL, N. E.; HAMID, M. E. Increased multi-drug resistant *Escherichia coli* from hospitals in Khartoum state, Sudan. **African Health Sciences**, v. 12, n. 3, 2012.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 383-404, 2005.

JOHNSON, J. R.; SANNES, M. R.; CROY, C. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 838–46, 2007.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, K. H. S.; COLE, J. R.; Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, v. 47, p. 3151-3153, 1982.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, v. 2, p. 123-40, 2004.

KENN, J. E.; WITTUM, T. E.; DUNN, J. R.; BONO, J. L.; DURSO, L. M. Shigatoxigenic *Escherichia coli* O157 in agricultural fair livestock United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 780-785, 2006.

KENNEDY, K. J.; ROBERTS, J. L.; COLLIGNON, P. J. *Escherichia coli* bacteremia in Canberra: incidence and clinical features. **The Medical Journal of Australia**, v. 188, p. 209–13, 2008.

KIM, G.; KWON, Y.; JANG, H. Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride or Cu²⁺-induced oxidative stress in HepG2 cells. **Toxicology**, v. 25, p. 138-144, 2011.

KUO, R. Y.; CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; TENG, C. M., YEN, H. F.; WU, Y. C. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 421-425, 2001.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e ioprosecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart.** 2011, 132 p. Dissertação (Mestrado), Departamento de Química, ICEX, UFMG.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; RYAN, L.; PÓVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A. Y. A Leishmania e as Leishmanioses. **Instituto Evandro Chagas**, v. 1, p.83-124, 1986.

LAUTENBACH, E.; FISHMAN, N. O.; METLAY, J. P.; MAO, X.; BILKER, W. B.; TOLOMEO, P.; NACHAMKIN, I. Phenotypic and genotypic characterization of fecal *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to fluoroquinolones: results from a large hospital-based surveillance initiative. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 1, p. 79-85, 2006.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, c.; CAVEE, A.; DESCONCLOIS, J. F.; FORGACS, P. Anomurine et anomuricine, deux nouveaux alcalóides isoquinoleiques de *Annona muricata*. **Planta Medica**, v. 39, n. 3, p. 204-205, 1982.

LEBOEUF, M. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, New York, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LEHMAN, D. C.; THOMAS, J. G. Biofilms: Architects of disease. Textbook on diagnostic microbiology. 3rd ed. St Louis: **Saunders Elsevier**, p. 884-95, 2007.

LEON, L. L.; MACHADO, G. M.; PAES, L. E.; GRIMALDI, Junior G. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84, n. 5, p. 678-680, 1990.

LEVY, S. B. Antibiotic resistance – the problem intensifies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1446-1450, 2005.

LI, X. Z.; LIVERMORE, D. M.; NIKAIDO, H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 38, p. 1732-1741, 1994.

LIMA, J. P. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. S.; SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; SILVA-JARDIM, I.; COSTA, E. V. *In Vitro* Atoleishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 692-702, 2012.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their Antioxidant Capacity. **Food Chemistry Reading**, v. 122, n. 4, p. 1129-38, 2010.

LIPORACCI, H. S. N.; SIMÃO, D. G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nos quintais do Bairro Novo Horizonte, Ituiutaba, MG. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.15, n. 4, p. 529-40, 2013.

LIU, X.X., PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Two novel acetogenins, annoglaxin and 27-hydroxybullatacin, from *Annona glabra*. **Journal of Natural Product**, v. 62, p. 848-852, 1999.

LOBÃO, A. Q.; ARAUJO, D. S. D.; KURTZ, B. C. Annonaceae das Restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 85-96, 2005.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

MAAS, P. J. M. Neotropical *Annonaceae*. In: MILLIKEN, W.; KLITGARD, B.; BACARAT, A. **Neotropikey**: interactive key and information resources for flowering plants of the neotropics. 2009. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Annonaceae.htm>>. Acesso em: março de 2015.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. *Annonaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB117159>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 40-4, 2004.

MACHADO, H. **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich "in vivo"**. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado) – Programa de PósGraduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

MAHIO, v.; ROBLLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Gualteria boliviana*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 709-716, 2000.

MAHIO, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. New aporphine alkaloids from *Gualteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n.7, p. 890-895, 1994.

MALAUGHLIN, J. L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1311-1321, 2008.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Springer-Verlag, 354p. 1970.

MARKHAM, K. R.; MARBY, T. J. Ultraviolet and próton magnetic resonance spectropy of flavonoids. In: HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. (Ed.) **The flavonoids**. New York: Academic Press, p. 45 - 77. 1975.

MARCARINI, J. C.; TSUBOY, M. S. F.; LUIZ, R. C.; RIBEIRO, L. R.; HOFFMANNCAMPO, C. B.; MANTOVANI, M. S. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. **Experimental and Toxicology Pathology**, v. 63, p. 459-465, 2011.

MARRA, R. A.; BAR, K.; BEARMAN, G. M. L.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Syste mic inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial blood of infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of infection**, v. 53, p. 30-35, 2006.

MARTINS, S. T.; MOREIRA, M.; FURTADO, G. H. C.; MARINO, C. G. J.; MACHADO, F. R.; WEY, B. S.; MEDEIROS, E. A. S. Application of control measures for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria in intensive care unit patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 331-334, 2004.

MATSUMOTO, R. S.; RIBEIRO, J. P. N.; TAKAO, L. K.; LIMA, M. I. S. Allelopathic Potential of Leaf Extract of *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botanica Brasílica**, v. 24, n. 3, p. 631-5, 2010.

MEDEIROS, J.; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 796-802, 2010.

MELLON, M.; BENBROOK, C.; BENBROOK, K. L.; HOGGING, I. T. **Estimates of antimicrobial abuse in livestock**. Cambridge: UCS Publications, 2001.

MELO, G. M. de A. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and majorpiperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 277–281, 2014.

MENDONÇA, F. A. C. D.; DA SILVA, K. F. S.; SANTOS, K. K.; RIBEIRO JUNIOR, K. A. L.; SANTANA, A. E. G. Activites of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, n. 76, p. 629-636, 2005.

MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Bras. Anal Clin.**, v. 39, n. 2, p. 147-50, 2007.

MIDDLETON, E .J. R.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 673-751, 2000.

MONTANHEIRO, M. N. S. Determinação da densidade de sólidos e líquidos pelo princípio de Arquemedes. Publicado no **Caderno Catarinense de Ensino de Física**, v. 7, n. 2, p. 120, 1990.

MONTELES, R.; PINHEIRO, C. U. B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, p. 38-48, 2007.

MOORE, N. M.; FLAWS, M. L. Antimicrobial resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin. Lab. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 47-51, 2011.

MOREIRA, R. C. R.; REBÊLO, J. M. M.; GAMA, M. E. A.; COSTA, J. M. L. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e o uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil, **Cad Saúde Pub**, v. 18, p. 187-195. 2002.

MOSMAMM, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, E. F.; ROSARIO, D. M.; VEIGA A. S. S.; BRASIL; D. S.; SILVEIRA, F. T.; DOLABELA M. F. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. **Pharmacogn.** v,11, n.43, p.601-606, 2015.

MUZITANO, M.F.; TINOCO, L.W.; GUETTE, C.; KAISER, C.R.; ROSSIBERGMANN, B.; COSTA, S.S. The antileishmanicidal activity assessment of usual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2071-2077, 2006.

NKUNYA, M.H.H.; WAIBEL; R.; ACHENBACH, H. Three flavonoids from the stem bark of the antimalarial *Uvaria dependens*. **Phytochemistry**, n. 34, p. 853-856, 1993.

NGURE, P. K.; TONUI, W. K.; INGONGA, J. MUTAI, C.; KIGONDU, E.. RUKUNGA, G.; KIMUTAI, A. *In vitro* antileishmanial activity of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 2, p. 61-66, 2009.

NIASSY, B.; UM, B.H.; LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; KONÉ, M.; ANTON, R. Flavonóides de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. **Comptes. Rendus. Chimie**, v. 7, p. 993 - 996, 2004

NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA; M. A. B; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; MENZ, I.; PARRA, L. E.; XU, Z.; CHU, H. J.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; LUVIZOTTO, M. C. R. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v. 23, p. 4805-4819, 2005.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. L. P.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 05- 08. 2003.

NUNES, C. S., YOSHIZAWA, J. K., OLIVEIRA, R. Z.; LIMA, A. P., OLIVEIRA, L. Z., LIMA, M. V. N. Leishmaniose mucosa: considerações epidemiológicas e de tratamento. **Revista Brasileira de Medicina Familiar e Comunitária**, v. 6, n. 18, p. 52-56, 2011.

OLIANI, J. **Estudo químico e avaliação das atividades antiprotozoária e antimicobacteriana in vitro dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)**, 2012, 228 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

OLIVEIRA, B. H.; SANT'ANA, A. E.; BASTOS, D. Z. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. **Phytochem Anal**, n.13, p. 368-371, 2002.

OLIVEIRA-FREITAS, E.; CASAS, C. P.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; NICO, D.; SOUZA, L. O. P.; TINOCO, L. W.; SILVA, B. P.; PALATNIK, M.; PARENTE, J.P.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Acylated and deacylated saponins of Quillaja saponaria mixture as adjuvants for the FML-vaccine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 24, p. 3909-3920, 2006.

OLIVEIRA, M. C.; AMAORIN, R. F. B.; FREITAS, R. A.; COSTA, A. L. L. Óbito em caso de leishmaniose cutaneomucosa após o uso de antimônio pentavalente. **Ver Soc Brasil Med Trop**, v. 38, p. 258-260, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2005.

OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; ALOUFA, M. A. I.; DE CASTRO, E. M.; DE SANTANA, J. R. F.; NOGUEIRAI, R. C. Efeitos de Citocininas sobre a Anatomia Foliar e o Crescimento de *Annona glabra* L. Durante o Cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, 2008.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana, opções de ação**, 2012. Núcleo de Inovação, Informação, Evidência e Pesquisa. Disponível em: 1. http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf. Acesso em novembro de 2014.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SAÚDE (OMS). **Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra 2002. 67p.** Disponível em: http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/trm_strat_spam.pdf.>. Acesso em janeiro, 2015.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological Activities of *Annona glabra*. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 48, p. 21-4, 1995.

PAHO (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION). **Leishmaniasis: última atualização 2 de mar 2012.** Disponível em: [HTTP//new.paho.org/HQ/index.php?option=com_content&&task=blogcategory&iid=835&itemid=4098&Lang=em](http://new.paho.org/HQ/index.php?option=com_content&&task=blogcategory&iid=835&itemid=4098&Lang=em). Acesso em abril de 2015.

PAIVA, L.A.; GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; TOME, A.R.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory Effect of Kaurenoic Acid, a Diterpene from *Copaifera langsdorffii* on Acetic Acid-Induced Colitis in Rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 303-7, 2002.

PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5087-96, 2003.

PAULA, C. D. R.; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo da eficácia do isotionato de pentamidina administrada em três doses Durante uma semana e de N-metil-glucamina 1- mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea de leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Brasil Med Trop**, v. 36, p. 365-371, 2003.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.** 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PELLISARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L.; LIMA JUNIOR, F. E. F. Tratamento da Leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PEREIRA, I. O.; MARQUES, M. J.; PAVAN, A. L. CODONHO, B. S. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v.17, p. 339–345, 2010.

PESSANHA, R. P.; GONTIJO FILHO, P. P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, 2001.

PIMENTA, L. P. S. **Estudo químico bio-monitorado das sementes de *Annona crassiflora* objetivando o isolamento de acetogeninas tetra-hidrofurânicas.** Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX – UFM. Tese de doutorado, 1995.

PRADO, M. S. A.; BRITO, H. O.; NORONHA E. P.; FRANCA, L. M.; BRITO, L. M. O.; Phitochemical analysis composition from *Annona squamosa* (ATA) leaf ethanolic extract, **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 3, p. 180-184, 2008.

QUEIROZ, E. F.; ROBLOT, F.; CAVE, A.; PAULO, M. D.; FOURNET, A. Pessoine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Product**, v. 59, p.438-440, 1996.

RABELO, S. V.; COSTA, M. M.; LIBÓRIO, R. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de Atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, 2014.

RATH, S., TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento de leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIMÃO, J. Q. **Estudo da atividade anti-leishmania de compostos de invertebrados marinhos brasileiros**. 2009. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado de São Paulo, São Paulo, 2009.

REITHINGGER, R. DUJARDIN, K. C., LOUZIR, H. E.; PIRMEZ, C., ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 581-596, 2007.

REYNOLDS, R. Antimicrobial resistance in the UK and Ireland. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 64 n. 1, p. 19-23, 2009.

RIBEIRO, J. M. Vector salivation and parasite transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 1-3, 1987.

RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 1079-81, 2008.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 23, p. 127-149, 1988.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O, BARBOSA FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514-535, 2005.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais no Domínio do Cerrado na Região do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-23, 2001.

RUBEGLIO, E. A.; TESONE, SILVIA. *Escherichia coli* O157 H7: presença em alimentos no cárnicos. **Archivos argentinos de pediatría**, v. 105, n. 3, 2007.

SACKS, D. L.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p.453-483, 2001.

SAITO, M.L. **Fitoquímica de *Annona cacans* Warming e Quimiossistemática de *Annonaceae* JUSSIEU**. São Paulo, 1990. 222 p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

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

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar Flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SANTOS, K. F. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; OLIVEIRA, M.G.A. Hypolipidaemic effects of neringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. **Pharmacology Research**, v. 40, n. 6, p. 493-496, 1999.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCHIFF, P. L. Jr. Bisbenzylisoquinoli alkaloids, **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 3, p. 645-749, 1991.

SCOPEL, M. **Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies Sambucus nigra L. e Sambucus australis Cham. & Schltdl. e Avaliação Preliminar da Estabilidade**. 2005. 227 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre. 2005.

SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; WHITTAM, T. S. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In: NEIDHARDT, F.; INGRAHAM, J.L.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H.E. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, 1987.

SHEN, S.; H. S. U, W.; LEE, C.; CHANG, W.; WU, S. Buckwheat extracts (*Fagopyrum tataricum*) and rutin attenuate Th2 cytokines production and cellular allergic effects in vitro and in vivo. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 793-799, 2012.

SHI, G.; MacDOUGAL, J. M.; McLAUGHLIN, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 719-723, 1997.

SIEBRA, C. A.; NARDIN, J. M.; FLORÃO, A.; ROCHA, F. H.; BASTOS, D. Z.; OLIVEIRA, B. H.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Potencial Antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, 2009.

SILVA, A. A. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; VIEIRA, I. G. P.; RIBEIRO, L. M.; VIANA, S. M. Activity of cycloartane-type triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum chagasi*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1419– 1423, 2014.

SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. C.; MAGALHÃES, P.P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercetri target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 183-188, 2012.

SILVA, F. R.; ANTUNES, R.M.P.; RAISSA, M. R. C. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Annona muricata* L. (annonaceae). **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 6, n. 2, 2011.

SILVA, F. S. **Avaliação *in vitro* da azitromicina nas espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2005. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de doenças infecciosas e parasitárias) – Centro de pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2005.

SILVA, M. A. B.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; DA SILVA, R. M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 549-62, 2010.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 39- 251, 2004.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. v. 5, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis, Ed. da UFSC, 2004.

SIQUEIRA, C. A. T. **Aspectos químicos e atividade antiprotozoária *in vitro* de *Annona coriácea* Mart. (Annonaceae)**. São Paulo, 2010. 178 p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

SIQUEIRA, C. A. T.; OLIANI, J.; SARTORATTO, A.; QUEIROGA, C. L.; MORENO, P. R. A.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q.; FISCHER, D. C. H.; Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriácea* Mart., Annonaceae, and *in vitro* antiprotozoal activity, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n.1, p. 33-40, 2011.

SIQUEIRA, L. C. **Levantamento florístico e etnobotânico do estrato arbóreo em sistemas naturais e agroflorestais, Araponga, Minas Gerais**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

SOARES, G. L. G.; ISAIAS, R. M. S.; GONÇALVES, J. M. R.; CHRISTIANO, J. C. S. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea, Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae). **Rev. Bras. de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 2, n. 1, p.103- 133, 2000.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 135-42, 2006.

STEPHEN, B. Horticulture Agent Susan Mark, AARP Administrative Assistant Lee County Extension, Fort Myers, Florida (239) 533-7513, 2013.

STRATTON, C. W. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant gram-positive organisms. **Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter**, v. 18, p. 57-64, 2000.

TALEBIYAN, R.; KHERADMAND, M.; KHAMESIPOUR, F.; RABIEE-FARADONBEH, M. Multiple Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens in Iran. **Veterinary Medicine International**, v. 101155, p. 4914-18, 2014.

TASDEMIR, D., KAISER, M., BRUN, R., YARDLEY, V., SCHMIDT, T.J., TOSUN, F., RUEDI, P. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: *In Vitro*, *In Vivo*, Structure – Activity Relationship and Quantitative Structure – Activity Relationship Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50(4), pp. 1352 – 1364, 2006.

TAVEIRA, C. C. **Ação antimicrobiana de extrato de plantas do Cerrado e isolamento de substâncias ativa de Kielmeyera coriácea**. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas no Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas)- Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; GUALDA, N. C.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families, **Phytomedicine**, v. 12, p. 382-390, 2005.

TIRAPELLI, C. R.; AMBROSIO, S. R.; COSTA, F. B.; COUTINHO, S. T.; OLIVEIRA, D. C.; OLIVEIRA, A. M. Analysis of the Mechanisms Underlying the Vasorelaxant Action of Kaurenoic Acid in the Isolated Rat Aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, p. 233-41, 2004.

TIUMAN, T.S., SANTON, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 525-532, 2011.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; MEIRELLES, M. N.; BERGMANN, B. R. Selective effect of 2,6-dihydroxy-4-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, p. 1234-1241, 1999.

UMAKANTI, S.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v 47, p. 412-423, 2009.

URDAPILLETA, A. A. A. **Atividade de substâncias isoladas de líquens sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis***. 2006. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília-DF. 2006.

URZÚA, A.; ECHEVERRÍA, J.; REZENDE, M.C.; WILKENS, M. Antibacterial properties of 3 H-Spiro [1-benzofuran-2, 10-cyclohexane] derivatives from *Heliotropium filifolium*. **Molecules**, v. 13, p. 2385–2393, 2008.

VASQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 44, p. 457-72, 2014.

VEGA, M. R. G.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZFILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dióica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 8, p. 1554-1559, 2007.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial Ent-Kaurene from Brazilian Propolis of Native Stingless Bees. **Fitoterapia**, v. 71, p. 693-6, 2000.

VIANNA, G. O. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminar). **Brasil Médico**, p. 25-411, 1911.

VIEIRA, G. H. F.; MOURÃO, J. A.; ÂNGELO, A. M.; COSTA, R. A.; FERNADES, R. H. S. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* AND *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 3, p. 129-32, 2010.

VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. Novel Derivatives of ent-17,19-dihydroxy-16betaH-kaurane Obtained by Biotransformation with *Verticillium lecanii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3704-7, 2002.

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; MACHADO, L. K. A.; BEVILAQUA, C. M. L.; COSTA, I. R. S.; BRASIL, N. V. G. P. S.; ANDRADE, H. F. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 567-571, 2011.

WAFU, P.; NYASSE, B.; FONTAINE, C. A. 7,8-dihidro-8- hydroxypalmatine from *Enantia chlorantha*. **Phytochemistry**. V. 50: 279-281. 1999.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis**. Institut fur Pharmazeutische Biologie der Universitat Muchen, 307 p.1984.

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 e Medicinal Chemistry**, 10, 561-565, 2002.

WHO (WORD HEALTH ORGANIZATION). **The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/> consultado em 22/03/2015. 2002.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Control of the Leishmaniasis**. Report of meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva:WHO, n. 949, 2010. 202 p. Disponível em:

<http://apps.who.int/bookordes/anglais/detard1.jsp?codlan=1&codcol=10&codcoch=949>. Acesso em fevereiro de 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Drug resistance: Public Health Importance of Antimicrobial Resistance**. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/>. Acesso em: Abril de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. Geneva: WHO, p.3, 1998.

YANG, B.; YANG, H.; LI, X.; TANG, Y.; ZHANG, N.; CHEN, J. Upercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona genus* plant seeds by HPLC-DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 1, p. 140-144, 2009.

ZHANG, Y. H.; PENG, H. Y.; XIA, G. H.; WANG, M. Y.; HAN, Y. Anticancer Effect of Two Diterpenoid Compounds Isolated from *Annona glabra* Linn. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, p. 937-42, 2004.

ZORZETO, T. Q.; DECHEN, S. C. F.; ABREU, M. F.; FERNADES JÚNIOR, F. Caracterização física de substratos para plantas. **Bragantia**, v. 73, n. 3, 2014.