



Universidade Federal do Piauí
Rede Nordeste de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
-Ponto Focal-

**Potencial biotecnológico e farmacológico de *Annona coriacea* Mart.
(Annonaceae)**

Claucenira Bandeira da Silva

Teresina-PI

2019

CLAUCENIRA BANDEIRA DA SILVA

**Potencial biotecnológico e farmacológico de *Annona coriacea* Mart.
(Annonaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia e ponto focal na Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: **Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior.**

Co-orientadora: **Dr. Chistiane Mendes Feitosa.**

Teresina –PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

S586p Silva, Claucenira Bandeira da.
Potencial biotecnológico e farmacológico de *Annona coriacea*
Mart. (Annonaceae). / Claucenira Bandeira da Silva. – 2019.
129 f.: il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de
Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
“Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior”.

1. Arboviroses. 2. *Aedes aegypti*. 3. Fluoroquinolonas.
4. Acetilcolinesterase. 5. *Staphylococcus aureus*. I. Título.

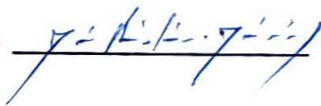


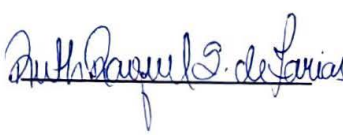

CDD 583.115

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: CLAUZENIRA BANDEIRA DA SILVA

TÍTULO DO PROJETO: “Potencial biotecnológico e farmacológico de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae).”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva - UFPI (Examinador)	<u>SATISFEITO</u>	
Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Ruth Raquel Soares de Farias – SEDUC-PI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Suely Moura Melo - FACID (Examinadora)	<u>SATISFATÓRIO</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 17 de maio de 2019.

HORÁRIO: 14:30h

LOCAL: Auditório do Curso de Farmácia - UFPI



Dedicatória

Dedicatória

Dedico aos meus pais, por todos os valores que me transmitiram.



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

“Não é sobre ganhar, é sobre não desistir. Não é sobre quantas vezes você foi rejeitado, caiu e teve que levantar. É quantas vezes você fica em pé, levanta a cabeça e segue em frente” (Lady Gaga).

Houve muitos dias difíceis, esses dias aumentaram a minha **FÉ** e me deram a certeza de que Ele está sempre no comando.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém” (Dalai Lama).

A **Deus** por me conceder saúde, coragem, determinação e serenidade para percorrer esse longo caminho e por me permitir chegar tão longe. A presença de Deus em nossas vidas torna a nossa fé maior do que os nossos medos, e a nossa determinação maior do que qualquer obstáculo.

A minha **Nossa Senhora** (de Fátima, do Perpétuo Socorro, do Carmo, da Conceição...) que sempre me protegeu, me guardou com seu manto divino, me fortaleceu e acalmou meu coração.

Ao **Divino Espírito Santo** e aos **Espíritos de Luz** por me inspirarem nos momentos difíceis, por me guiarem e iluminarem sempre a minha mente, o meu caminho e a minha vida.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá” (Ayrton Senna).

Aos meus pais, (**Carlos e Lenira**) que desde sempre, acreditaram nos meus sonhos, nos meus ideais, me incentivando, me apoiando e orado por mim. Sem o apoio de vocês eu não teria chegado até aqui. Como sou feliz por ter escolhido vocês como pais. Obrigada por me fazerem uma pessoa de bem, com caráter e dignidade. Os honrarei eternamente!

Aos meus irmãos (**Claudinha, Lauro, Demi e Lucas**) por apoiarem minhas decisões, por torcerem sempre por mim e se alegrarem com minhas conquistas. Vocês fazem são essenciais à minha vida!!

A minha irmãfilha **Claudete** (que sempre compartilha comigo minhas lágrimas e sorrisos) e minha sobrinhaneta **Isabela** pelo amor, carinho e dedicação, por serem “presente” e presentes em minha vida, por todas as alegrias, todos os abraços e por entenderem minha ausência nesse período.

Aos meus amados sobrinhos (**Laura, Yara, Izadora e Carlos Alfredo**) por agregarem maior valor a minha vida, por serem a extensão do nosso amor, nosso melhoramento genético. Por me fazerem acreditar num mundo melhor e lutar para que ele exista para vocês. Amo infinitamente.

Ao meu cunhado **Diego** pela torcida, apoio e amizade e as minhas minhas cunhadas **Nice e Vera** pelo carinho.

Ao meu amigo e companheiro **Luis Fernando**, pela paciência e carinho, por acreditar em mim, me apoiar, me incentivar e me acalmar. Por aguentar durante todo esse tempo os meus estresses e os meus medos e minhas lágrimas, por repetir inúmeras vezes: “calma, vai dá tudo certo” e por me fazer uma pessoa melhor. Obrigada por cruzar meu caminho e me fazer feliz!!

Obrigada Senhor por me permitir unir todos vocês em uma **FAMÍLIA** na qual podemos compartilhar tantas provações e bênçãos. Amo vocês, desde sempre e para sempre!

Ao meu orientador **Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior** que acreditou no meu potencial, que sempre me encorajou. Serei sempre grata pela oportunidade concedida e pela credibilidade.

A minha co-orientadora **Dra. Chistiane Mendes Feitosa** pelo apoio e atenção, por disponibilizar o LAPPNEX e toda sua equipe para me auxiliar.

Aos anjos, em forma de seres humanos, que Deus me permitiu encontrar no LAPPNEX: minha querida **Layana** que se tornou minha “orientadora” e viabilizou a realização desse trabalho, sem você, meu braço farmacêutico, minha “flor de cacto”, tudo seria mais difícil. Você foi essencial nessa conquista; e a **Alyandra**, a pessoa mais tranquila que conheci, minha “co-orientadora”, meu braço químico, minha companhia de laboratório aos sábados. Meu MUITO OBRIGADA a vocês pela paciência, por todo sofrimento e dificuldades compartilhadas, pelos cappuccinos e principalmente pela amizade. Do doutorado para a vida!! Para sempre no meu coração, nas nossas inúmeras fotos, nas minhas orações e na minha gratidão. Amo vocês!

Aos demais amigos do **LAPPNEX: Felipe**, que me auxiliou na obtenção dos extratos, **Ariane**, pela ajuda nos testes larvicida, **Denise e Bruna** nos testes microbiológicos e a **Hilda, Suyane, Juliana, Pedro, Ronaldo, Antonio e Laíres** por todos os momentos bons e de aprendizagem vividos no laboratório.

Ao seu **Ary** e seu **Francisco** sempre disponíveis quando precisei ficar até mais tarde no laboratório. A **D. Ivelta** pelo carinho e cafezinho.

A toda equipe do **LAPES**, professora **Dr. Veruska Cavalcanti Barros, Lucas, Carneiro** e **Sr. Antônio**, onde realizei os testes larvicidas.

A professora **Dr. Girlene Soares de Figueirêdo**, ao professor **Dr. Humberto Medeiros Barreto** e a minha doce **Andressa** do Laboratório de Microbiologia pelo apoio para realização dos testes antimicrobiano e de modulação.

Ao professor **Dr. Carlos Humberto A. Mota Filho** (CCA) e ao **Matheus** (LABCANCER) pelas análises estatísticas.

A minha amiga e professora **Dr. Ruth Raquel Soares de Farias**, por ser minha amiga, por “puxar minhas orelhas”, por auxiliar na elaboração do projeto, na coleta e determinação do material botânico, por está sempre pronta para ajudar (mesmo sendo a pessoa mais ocupada do mundo) e por contribuir significativamente na qualificação e na defesa da tese. O mundo precisa de mais pessoas como você que faz ciências 365 dias no ano!

A professora **Dra. Maria Rita de M. C. Santos** pela orientação sobre patentes.

A professora **Dra. Mariana Helena Chaves** e ao **Renato**, do departamento de Química, onde realizei a trituração do material vegetal.

Ao meu amigo e professor **Dr. Adalberto Socorro da Silva**, uma das mentes mais incríveis que conheço, obrigada pelas contribuições na qualificação e na defesa.

Aos professores: **Dr. Lívio César Cunha Nunes** por participar da minha qualificação.

As professoras **Dra. Rita de Cássia M. Oliveira** e **Dra. Suely Moura Melo** por participarem da minha defesa de tese contribuírem com meu trabalho.

Ao **Maelson** (ELETROQUÍMICA) por toda contribuição concedida na realização das atividades anticorrosivas.

A **Lara** (LABCANCER) que auxiliou na realização dos testes de citotoxicidade.

A **Das Dores** (IFPI- Campus Teresina Central) pela contribuição nas atividades do HPLC.

Ao **Dr. Jurandi** (IFPI-Campus Teresina Sul), meu colega de doutorado, pelo apoio para realização dos testes antioxidantes.

Ao **Raney** pelas ilustrações biológicas.

A toda equipe docente do **RENORBIO**, pelo conhecimento adquirido.

Aos meus **colegas de doutorado** pelo aprendizado, carinho e amizade. Eterna admiração por cada um de vocês. Somos guerreiros, somos vencedores!

A **Deusilene** e **Eliane** pela competência e educação com que sempre me atenderam.

A toda equipe do **IFPI Campus Pedro II** (diretores, coordenadores, professores, funcionários e alunos) onde eu realizei meu estágio a docência. Obrigada a todos pela acolhida, carinho, respeito e pela amizade, que levarei para a vida inteira!

Ao **IFPI – Campus Teresina Central e Campus Teresina Sul**- pela liberação dos laboratórios para realização das atividades com HPLC e antioxidante, respectivamente.

A Secretaria de Educação e Cultura do Estado do Piauí (**SEDUC**), minha bolsa de fomento, pela liberação das minhas atividades didáticas para realização do doutorado.

Ao Educandário Santa Maria Goretti em nome da sua diretora **D. Tércia**, e das colaboradoras **Elda, Raquel e Dorinha** pela compreensão quando precisei deixar algumas turmas e quando precisei me ausentar.

A professora **Teresa Lapa**, um anjo de luz que Deus colocou na minha vida! Aquela que é amiga, conselheira, mãe, instrutora espiritual. Como sou grata a Deus por tê-la colocado no meu caminho. E eu sei que não foi por acaso. Meu infinito OBRIGADA pelo carinho, pela preocupação, pelas orações...

As minhas amigas e companheiras de trabalho: **Jéssica**, que sempre me passou boas energias através do seu abraço caloroso e carinhoso nas manhãs em que eu mais precisava; **Renata**, que também está nessa jornada de doutorado, e conhece bem as as dores e as alegrias desse processo; **Mariana**, por assumir minha sala de aula na minha ausência. **Carminha, Anita e Elinalva** pelo carinho e amizade. E **D. D’Paz** pela conversa alegre e o melhor cafezinho.

As minhas amigas **Érica Graziela** e **Mariana** pela torcida, amizade e carinho.

Aos meus queridos alunos, com quem eu aprendo todos os dias. Vocês são minha fonte de inspiração. É para vocês e por vocês que eu procuro melhoramento profissional.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” (Cora Coralina)

As minhas queridas: **tia Chagas e D. Jovem (in memoriam)** que em vida sempre torceram por mim e agora, mesmo em outro plano espiritual, sempre estiveram presentes comigo nos momentos mais difíceis.

A todos aqueles que sempre oraram por mim, fortalecendo minha fé e minhas forças.

Então fazer valer a pena cada verso daquele poema sobre acreditar” (Ana Carolina Vilela).

RESUMO

A espécie *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) distribui-se por todo Brasil e apresenta importância significativa na descoberta de novos fármacos. O presente trabalho teve como objetivo analisar as características biológicas, químicas e farmacológicas da espécie *Annona coriacea* Mart., frente a diversos ensaios. O material vegetal foi coletado no Piauí (Cerrado Setentrional), município de Campo Maior. As folhas foram desidratadas à temperatura ambiente e moídas para a posterior extração dos extratos hexânico de *Annona coriacea* (EHAC 15,96g; 7,98%) e extrato etanólico de *Annona coriacea* (EEAC 19,43g; 9,71%). A investigação fitoquímica mostrou, para ambos os extratos, a presença de taninos, flavonoides, alcaloides, triterpenos/esteroides e cumarinas, característicos do gênero *Annona*. O conteúdo de fitoquímicos, obtido por curvas de calibração, revelou um conteúdo aproximado de 52,16 mg de fenóis; 99,6 mg de flavonoides; 17,78 de taninos hidrolisados e 18,17 mg de proantocianidinas por grama do EEAC. O EHAC apresentou 13,8 mg de fenóis; 15,2 mg de flavonóides; 5,64 de taninos hidrolisados por grama do extrato. Nos ensaios de eliminação de radicais livres o EEAC reduziu metade dos radicais DPPH com uma concentração de 77,1 µg/mL e apresentou uma capacidade antioxidante equivalente ao Trolox de 144,8 mM por grama de amostra. O EHAC foi menos efetivo nesses ensaios e reduziu em apenas 1058 µg/mL o DPPH e o efeito antioxidante sobre o ABTS foi de apenas 27,8 mM/g de amostra. Os extratos apresentaram excelente atividade larvicida, as concentrações de 20 µg/mL do EEAC e 40 µg/mL do EHAC causaram uma letalidade de 100% das larvas de *A. aegypti*, após 48h de exposição com uma CL50 de 0,84µg/mL e 0,90 µg/mL, respectivamente. Os EEAC e EHAC também demonstraram elevada toxicidade sobre *Artemia salina* não sendo possível calcular a DL 50. O EEAC mostrou-se um potente inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) com inibição >50% e CI₅₀ = 6,966 mg/mL. A atividade de inibição do EHAC foi menor que 50%, e sua CI₅₀ não foi determinada. Os extratos foram inativos contra bactérias gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis* newprow 0128), gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* HUT001) e fungos (*Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida krusei* ATCC 34135) com MIC ≥1024. Contra a cepa resistente a múltiplas drogas de *S. aureus* (SA1199-B) que superexpressa a bomba de efluxo NorA, o EEAC em concentrações subinibitórias foi capaz de reduzir em até 4 vezes a CIM da norfloxacin, enquanto a EHAC em apenas 2 vezes. Quando os extratos foram associados ao brometo de etídio, um substrato da bomba de efluxo NorA, observou-se uma queda da CIM do corante em 8 e 2 vezes com o EEAC e com o EHAC, respectivamente. Esses resultados são promissores e sugerem que os extratos possuem fitoquímicos que inibem a bomba de efluxo NorA, e tornam a cepa mais sensível ao antibiótico, possuem potencial inseticida biodegradável contra *A. aegypti*, boa inibição da AChE e também toxicidade contra *A. salina* fornecendo subsídios para futuros ensaios de atividade antiproliferativa.

Palavras-chave: Arboviroses. *Aedes aegypti*. Fluoroquinolonas. Acetilcolinesterase. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The species *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) is distributed throughout Brazil and presents significant importance in the discovery of new drugs. The present work had as objective to analyze the biological, chemical and pharmacological characteristics of the species *Annona coriacea* Mart., in front of several tests. The plant material was collected in Piauí (Northern Cerrado), municipality of Campo Maior. The leaves were dehydrated at room temperature and milled for the subsequent extraction of hexane extracts of *Annona coriacea* (EHAC 15.96g, 7.98%) and ethanolic extract of *Annona coriacea* (EEAC 19.43g, 9.71%). Phytochemical research showed, for both extracts, the presence of tannins, flavonoids, alkaloids, triterpenes / steroids and coumarins, characteristic of the genus *Annona*. The content of phytochemicals, obtained by calibration curves, revealed an approximate content of 52.16 mg of phenols; 99.6 mg flavonoids; 17.78 hydrolysed tannins and 18.17 mg proanthocyanidins per gram of EEAC. The EHAC presented 13.8 mg of phenols; 15.2 mg flavonoids; 5.64 tannins hydrolyzed per gram of extract. In the free radical scavenging assays the EEAC reduced half of the DPPH radicals at a concentration of 77,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and had an antioxidant capacity equivalent to Trolox of 144.8 mM per gram of sample. EHAC was less effective in these assays and reduced DPPH by only 1058 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and the antioxidant effect on ABTS was only 27.8 mM / g of sample. The extracts showed excellent larvicidal activity, the concentrations of 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of the EEAC and 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of the EHAC caused a lethality of 100% of *Aedes aegypti* larvae, after 48h of exposure with an LC50 of 0.84 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 0.90 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. EEAC and EHAC also showed high toxicity on *Artemia salina*, it was not possible to calculate DL 50. EEAC proved to be a potent inhibitor of acetylcholinesterase enzyme (AChE) with > 50% inhibition and IC 50 = 6,966 mg / mL. The HBV inhibition activity was less than 50%, and its IC50 was not determined. The extracts were inactive against gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis* newprow0128), gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* HUT001) and fungi (*Candida albicans* ATCC 10231 and *Candida krusei* ATCC 34135) with MIC ≥ 1024 . Against the *S. aureus* multiple drug resistant strain (SA1199-B) overexpressing the NorA efflux pump, the EEAC at subinhibitory concentrations was able to reduce the MIC of norfloxacin by up to 4 times, whereas the HACA only by 2-fold. When the extracts were associated with ethim bromide, a substrate of the NorA efflux pump, a decrease of the MIC of the dye was observed 8 and 2 times with the EEAC and with the HACA, respectively. These results are promising and suggest that the extracts have phytochemicals that inhibit the NorA efflux pump, make the strain more sensitive to the antibiotic, have a biodegradable insecticidal potential against *A. aegypti*, good inhibition of AChE and also toxicity against *A. salina* providing subsidies for future antiproliferative activity assays.

Keywords: Arboviroses. *Aedes aegypti*. Fluoroquinolones Acetylcholinesterase. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Mapa 1 Distribuição geográfica mundial da família Annonaceae.....	22
Mapa 2 Distribuição geográfica de <i>Annona coriacea</i> Mart. no Piauí.....	23
Figura 1 <i>Annona coriacea</i> Mart.	24
Organograma 1 Representação gráfica da tese.....	26

REVISÃO DE LITERATURA

Gráfico 1 Incidência de casos de Dengue no Brasil 2017-2018.....	35
Gráfico 2 Incidência de Dengue no Piauí- triênio 2016-2018.....	36
Figura 1 Fêmea do mosquito <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus.	39
Figura 2 Ciclo Biológico do <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus.	40
Figura 3 Aparelho digestório das larvas de <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus.	41
Figura 4 Mecanismos de aquisição de material genético exógeno.....	46
Figura 5 Principais mecanismos bioquímicos de resistência aos antimicrobianos.....	47

CAPÍTULO I

Gráfico 1 Número de publicações científicas sobre atividade biológicas e farmacológicas da espécie <i>Annona coriacea</i> Mart. no período 2009-2019.....	61
Gráfico 2 Atividades Biológicas e Farmacológicas descritas para <i>Annona coriacea</i> Mart.	61

CAPÍTULO III

Gráfico 1 Percentual de inibição de AChE dos extratos etanólico (EEAC) e hexânico (EHAC) de <i>Annona coriacea</i> Mart.	92
Figura 1 Larva de <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus.	95

CAPÍTULO IV

Figura 1 Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMS) da Norfloxacina (Nor) e do Brometo de Etídio (EtBr).....	112
---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 01 Publicações científicas nos bancos de dados PubMed, Science Direct, Web of Science e Periódicos Capes.....	60
Tabela 02 Publicações tecnológicas nos bancos de dados INPI, Web of Science, EPO, USPTO.....	64

CAPÍTULO II

Tabela 1 Massa das folhas, massa e rendimento dos extratos etanólico (EEAC) e hexânico (EHAC) de <i>Annona coriacea</i> Mart.	76
Tabela 2 Composição fitoquímica dos extratos etanólico (EEAC) e hexânico (EHAC) de <i>Annona coriacea</i> Mart.	76
Tabela 3 Teor de Fenóis (TPC), Flavonoides (TFC), Taninos Hidrolissáveis (THC) Taninos Condensados (TCC) dos extratos etanólicos (EEAC) e hexânico (EHAC) das folhas de <i>Annona coriacea</i> Mart.	77
Tabela 4 Concentração eficaz para inibir 50% do radical DPPH* (CE ₅₀) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox®.....	79

CAPÍTULO III

Tabela 1 Resultados do <i>screening</i> fitoquímico das folhas de <i>Annona coriacea</i> Mart.	91
Tabela 2 Percentual de mortalidade de larvas de 3º e 4º estágio de <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, após 48h de exposição às diferentes concentrações (100 – 1 µg/mL) do EEAC e EHAC.....	92

CAPÍTULO IV

Tabela 1 Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do extrato etanólico (EEAC) e hexânico (EHAC) de <i>Annona coriacea</i> Mart. contra diferentes cepas microbianas.....	110
Tabela 2 <i>Screening</i> fitoquímico das folhas de <i>Annona coriacea</i> Mart.	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

AChE	Enzima acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APG	Angiosperm Phylogeny Group
CDB	Convenção da Diversidade Biológica
CHIKV	Chikungunya vírus
CL50	Coefficiente de Letalidade 50%
CL90	Coefficiente de Letalidade 90%
DENV	Dengue vírus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EEAC	Extrato etanólico <i>Annona coriacea</i>
EHAC	Extrato hexânico <i>Annona coriacea</i>
FA	Febre amarela
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
LAPES	Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária
NINTEC	Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNH	Epizootias em primatas não humanos
SE	Semana Epidemiológica
SESAPI	Secretaria de Saúde do Piauí
YFV	Vírus da Febre amarela
ZIKV	Zika vírus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
	Referências.....	27
2	OBJETIVOS	31
2.2	GERAL.....	31
2.3	ESPECÍFICOS.....	31
3	REVISÃO DE LITERATURA	33
3.1	ARBOVIROSES.....	33
3.2	ARBOVÍRUS.....	33
3.2.1	Dengue (dengue vírus DENV).....	34
3.2.2	Zika vírus (ZIKV).....	36
3.2.3	Febre Chikungunya (CHIKV).....	37
3.2.4	Febre amarela FA - (YFV).....	37
3.3	BIOLOGIA DO <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	38
3.4	COMBATE AO <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	42
3.4.1	Inseticidas sintéticos.....	42
3.4.2	Inseticidas fitoquímicos.....	43
3.5	RESISTÊNCIAS AOS ANTIMICROBIANOS.....	45
3.5.1	Mecanismos bioquímicos de resistência aos antibióticos.....	46
3.5.2	Atividade Moduladora em Bactérias.....	48
	Referências.....	49
4	CAPÍTULOS	
	CAPÍTULO I: As Potencialidades da espécie <i>Annona coriacea</i>	
	Mart. (Annonaceae): uma prospecção científica e tecnológica	55
	Resumo.....	56
	Abstract.....	57
1	INTRODUÇÃO.....	58
2	METODOLOGIA.....	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1	PROSPECÇÃO CIENTÍFICA.....	60
3.2	PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA.....	64
4	CONCLUSÃO	65

REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO II: Estudo comparativo da composição fitoquímica e atividade antioxidante dos extratos etanólico e hexânico de <i>Annona coriacea</i> Mart. (Annonaceae)	69
Resumo.....	70
Abstract.....	71
1 INTRODUÇÃO.....	72
2 METODOLOGIA.....	73
2.1 PREPARO DOS EXTRATOS.....	73
2.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	73
2.3 CONTEÚDO FITOQUÍMICO.....	73
2.3.1 Determinação do Conteúdo de Fenóis (TPC).....	74
2.3.2 Determinação do Conteúdo de Flavonóides (TFC).....	74
2.3.3 Determinação do conteúdo de Taninos Hidrolisáveis (THC).....	74
2.3.4 Determinação do conteúdo de Proantocianidinas / Taninos Codensados (TCC)	74
2.4 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	74
2.4.1 Ensaio de DPPH.....	74
2.4.2 Ensaio ABTS.....	75
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
3.1 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	75
3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	75
3.3 EFEITO DA EXTRAÇÃO DE SOLVENTE NO CONTEÚDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS.....	76
3.4 EFEITO DA EXTRAÇÃO DE SOLVENTE NAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DOS EXTRATOS.....	78
4 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
CAPÍTULO III: Eficácia larvicida dos extratos de <i>Annona coriacea</i> Mart. (Annonaceae) sobre <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1972) (Diptera: Culicidae)	84
Resumo.....	85

	Abstract.....	86
1	INTRODUÇÃO.....	87
2	MATERIAL E MÉTODO.....	88
2.1	MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	88
2.2	TESTE FITOQUÍMICO.....	88
2.3	INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	88
2.3.1	Análise qualitativa de inibição de AChE.....	88
2.3.2	Quantificação da inibição enzimática in vitro.....	89
2.4	BIOENSAIOS.....	89
2.4.1	Atividade larvicida sobre <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus.....	89
2.4.2	Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> Leach.....	90
3	RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	90
3.1	TESTE FITOQUÍMICO.....	90
3.2	INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	91
3.3	BIOENSAIO LARVICIDA.....	93
3.3.1	Atividade larvicida sobre <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus.....	93
3.3.2	Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> Leach.....	95
4	CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	CAPÍTULO IV: Efeito modulador de <i>Annona coriacea</i> Mart. sobre a resistência à norfloxacina em <i>Staphylococcus aureus</i>	104
	Resumo.....	105
	Abstract.....	106
1	INTRODUÇÃO.....	107
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	108
2.1	MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO.....	108
2.2	SCREENING FITOQUÍMICO.....	108
2.3	CEPAS E DROGAS.....	108
2.4	AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INTRÍNSECA.....	109
2.5	ENSAIO DA MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA ÀS FLUOROQUINOLONAS.....	109
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	109
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110

4	CONCLUSÃO.....	114
	REFERÊNCIAS.....	115
	CAPÍTULO V: O uso do extrato das folhas da espécie <i>Annona coriacea</i>	
	Mart. (Annonaceae) em formulação com ação larvicida, sobre <i>Aedes</i>	
	<i>aegypti</i>, e moduladora da ação antibiótica das fluoroquinolonas	120
	Resumo.....	121
	Reivindicações.....	122
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	124
6	PERSPECTIVAS.....	127
7	ANEXOS.....	129



Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde os primórdios. A busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais (VIEGAS JR *et al.*, 2006). As propriedades terapêuticas das plantas foram evidenciadas pela observação dos povos primitivos, e propagadas de geração em geração (REIS TUROLLA; SOUSA NASCIMENTO, 2006).

Nos últimos anos, o crescente interesse pelo uso de metabólitos de plantas para tratar doenças em humanos e outros animais e a alta demanda por produtos de saúde oriundos de fontes naturais, ao invés de sintéticos, reavivaram a pesquisa sobre a biodiversidade de plantas para identificar novas moléculas bioativas (AVATO; ARGENTIERI, 2018; RAO; HODGKING, 2002).

A biodiversidade em ambientes tropicais e equatoriais oferece um potencial particularmente rico em compostos biologicamente ativos que podem ser usados como modelos para a química medicinal e descoberta de novas drogas (VALLI *et al.*, 2018; BOLZANI *et al.*, 2012). A diversidade biológica vegetal representa um patrimônio valioso para ser protegido com cuidado e ser apreciado por suas inúmeras implicações ecológicas, bem como por sua importância em várias aplicações industriais (AVATO; ARGENTIERI, 2018; RAO; HODGKIN, 2002).

As plantas sintetizam e acumulam em seus órgãos um grande número de metabólitos (metabólitos secundários) altamente especializados e específicos, que possuem diferentes estruturas químicas resultados da sua evolução (VIEGAS JR *et al.*, 2006). Esses metabólitos são responsáveis pelas propriedades ecológicas e são necessários para as interações planta-ambiente (proteção contra herbívoros, microrganismos, insetos, UV, atração de polinizadores ou dispersores de sementes) e também às condições de adaptação e regulação, além disso, muitos deles apresentam importantes atividades farmacológicas (AVATO; ARGENTIERI, 2018).

Neste cenário destaca-se a família Annonaceae que possui relevante papel nas indústrias alimentícia, madeireira, cosmética e farmacêutica (CORRÊA *et al.*, 2008). As plantas pertencentes a esta família se caracterizam por sua grande variedade de esqueletos químicos com múltiplas propriedades farmacológicas. Dentre os metabólitos secundários ativos descritos, evidenciam-se as acetogeninas (CABEDO *et al.*, 2011) substâncias naturais bioativas, inerentes apenas a esta família presentes em praticamente todas as partes da planta (MIAO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2014) que apresentam uma gama de atividades biológicas dentre

elas a bioatividade contra diversas espécies de insetos, atividade citotóxica, antitumoral e pesticida (CHEN *et al.*, 2012; ALALI *et al.*, 1999).

Annonaceae é a maior família da ordem Magnoliales (APG III, 2009) sendo formada por 135 gêneros e 2.500 espécies com distribuição pantropical – a América Central, a América do Sul, a África e a Ásia são os principais centros de diversidade desse grupo (CHATROU *et al.*, 2004) (**Mapa 1**).

Mapa 1 - Distribuição geográfica mundial da família Annonaceae.



Fonte: Missouri Botanical Garden 2015 – *apud* RODRIGUES (2016).

No Brasil são registrados 29 gêneros e 392 espécies distribuídas nos biomas Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado. No Cerrado são encontrados apenas 10 gêneros, nenhum deles endêmico, e 47 espécies (MAAS *et al.*, 2013).

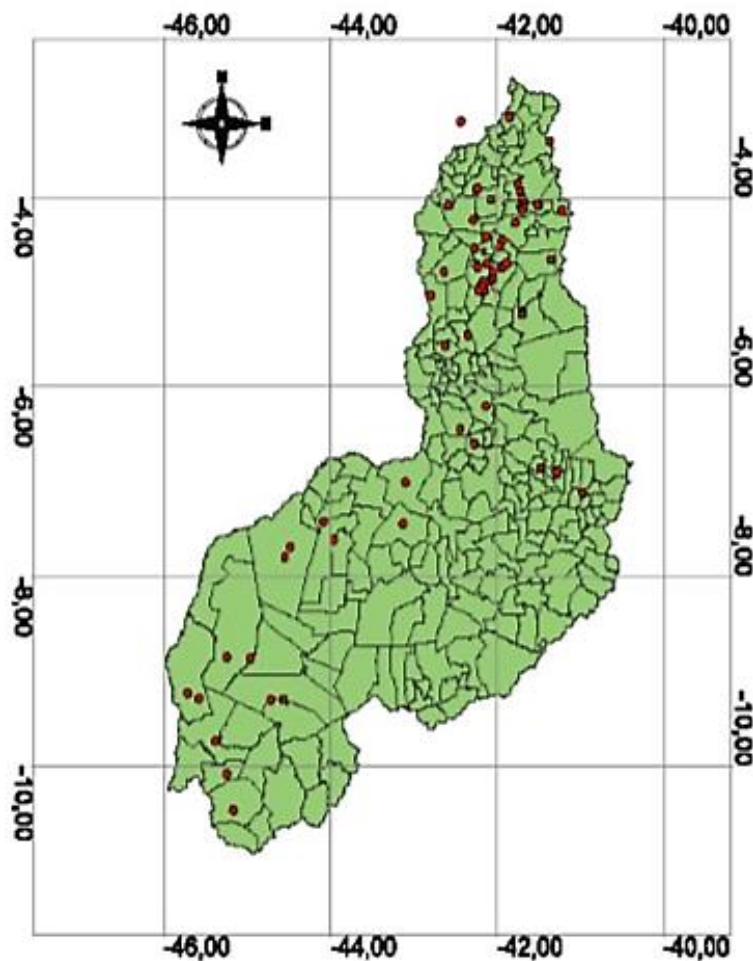
Na flora brasileira, o gênero *Annona* é um dos mais representativos (MAAS, 2009) destacando-se devido aos seus frutos comestíveis, com alto valor comercial e propriedades nutricionais (LORENZI, 2006) e por apresentar importância significativa na descoberta de novos fármacos e cosméticos (ALMEIDA; SANTOS, 2018).

Esse gênero possui cerca de 200 espécies dos trópicos das Américas e da África (MAAS, 2009) e atualmente inclui as 44 espécies que antes eram classificadas no gênero *Rollinia*

(RAINER, 2007). No Brasil, ocorrem 82 espécies distribuídas na Caatinga, Cerrado, Mata Amazônica, Mata Atlântica e Pantanal. (MAAS *et al.*, 2015).

A espécie *Annona coriacea* é conhecida popularmente como araticum e se distribui por todo o Brasil ocorrendo no Cerrado, Caatinga e Pantanal. No Piauí, segundo Sousa (2016) são descritos 973 indivíduos dessa espécie, distribuídos principalmente nos Cerrados Setentrionais do Estado (Norte). A região de Campo Maior apresenta 143 espécimes, concentrando a maior parte dos organismos descritos nos levantamentos (**Mapa 2**).

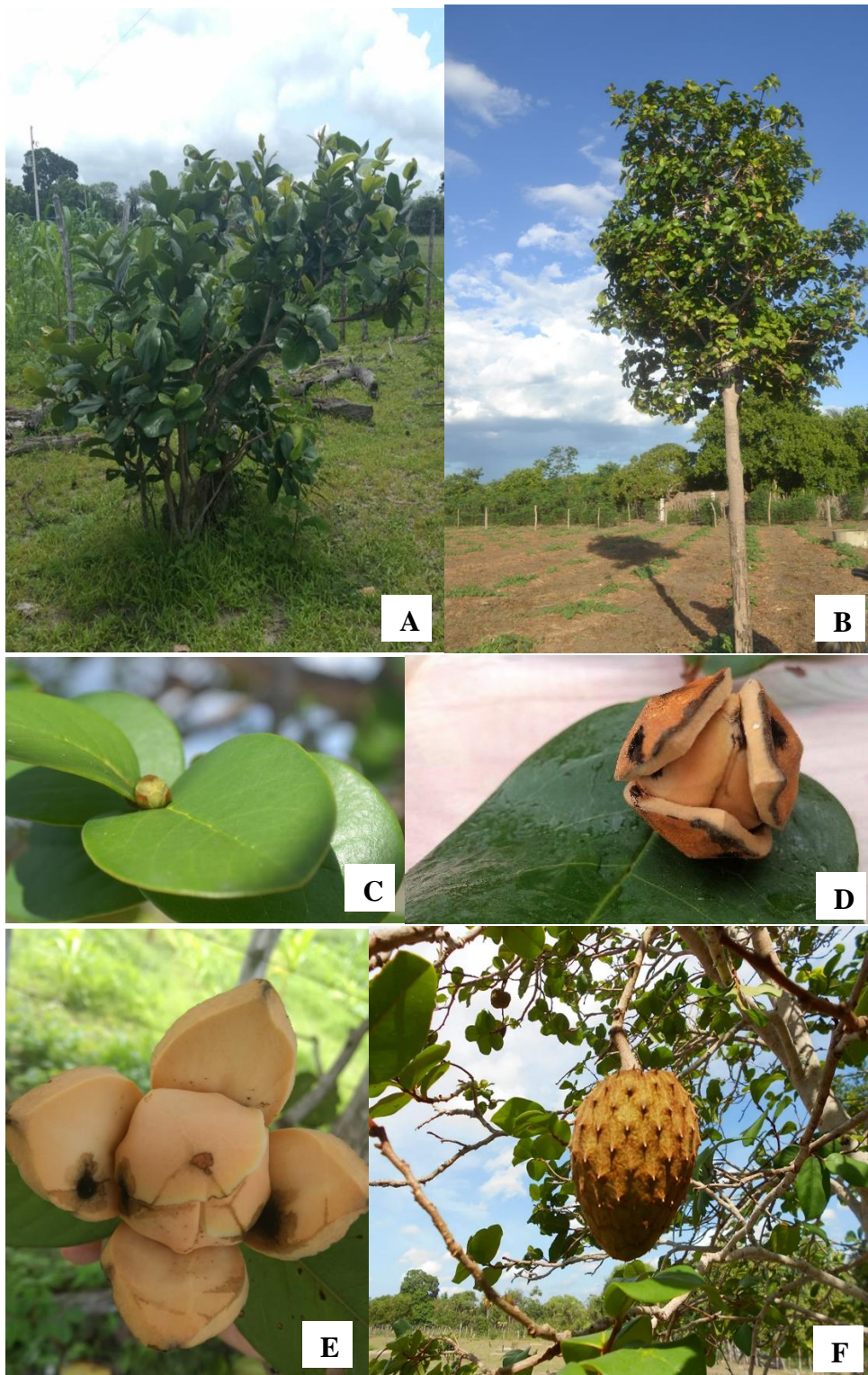
Mapa 2 - Distribuição geográfica de *Annona coriacea* Mart. no Piauí.



Fonte: Sousa (2016).

Segundo Lopes e Melo (2014), no Cerrado ela se destaca por possuir frutos grandes e comestíveis com polpa fibrosa, adocicada, de aroma forte, contendo várias sementes. Apresentam porte arbóreo com até 6 m de altura, com folhas simples e coriáceas com a face superior brilhosa, as flores são carnosas e solitárias de cor creme, amarelada ou amarela-laranja (**Figura 1**).

Figura 1 - *Annona coriacea* Mart.



1A- Arbusto jovem. 1B- Arbusto adulto. 1C- Folhas jovens. 1D- Botão floral. 1E- Flor. 1F. Fruto.

Créditos: Autor (2017) e FARIAS, R. R. S. (2017).

Fonte: Autor (2019).

Estudos tem mostrado que extratos de *Annona coriacea* Mart. possuem atividade inseticida (COSTA *et al.*, 2012), larvicida (FREITAS *et al.*, 2014) e atividade anti-tripanosoma (CARNEIROL *et al.*, 2013; TEMPONE *et al.*, 2005), dentre outras.

A investigação da diversidade botânica, juntamente com a conservação da informação etnofarmacológica permite a descoberta de novos compostos ativos com fins terapêuticos e medicinais (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001). Várias publicações reafirmam a importância dos produtos naturais como fonte de fármacos, uma vez que a maioria deles, em uso clínico, ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Considerando que os metabólitos secundários das plantas são ferramentas importantes para a compreensão da biossíntese e desenvolvimento de novos fármacos e, em face das atividades descritas para plantas da família Annonaceae, a espécie *Annona coriacea* Mart. foi selecionada para a avaliação do seu potencial fitoquímico, na busca por constituintes bioativos que possam comprovar seu uso terapêutico e farmacológico, contribuindo assim para uma maior valoração dessa espécie dentro do Bioma Cerrado.

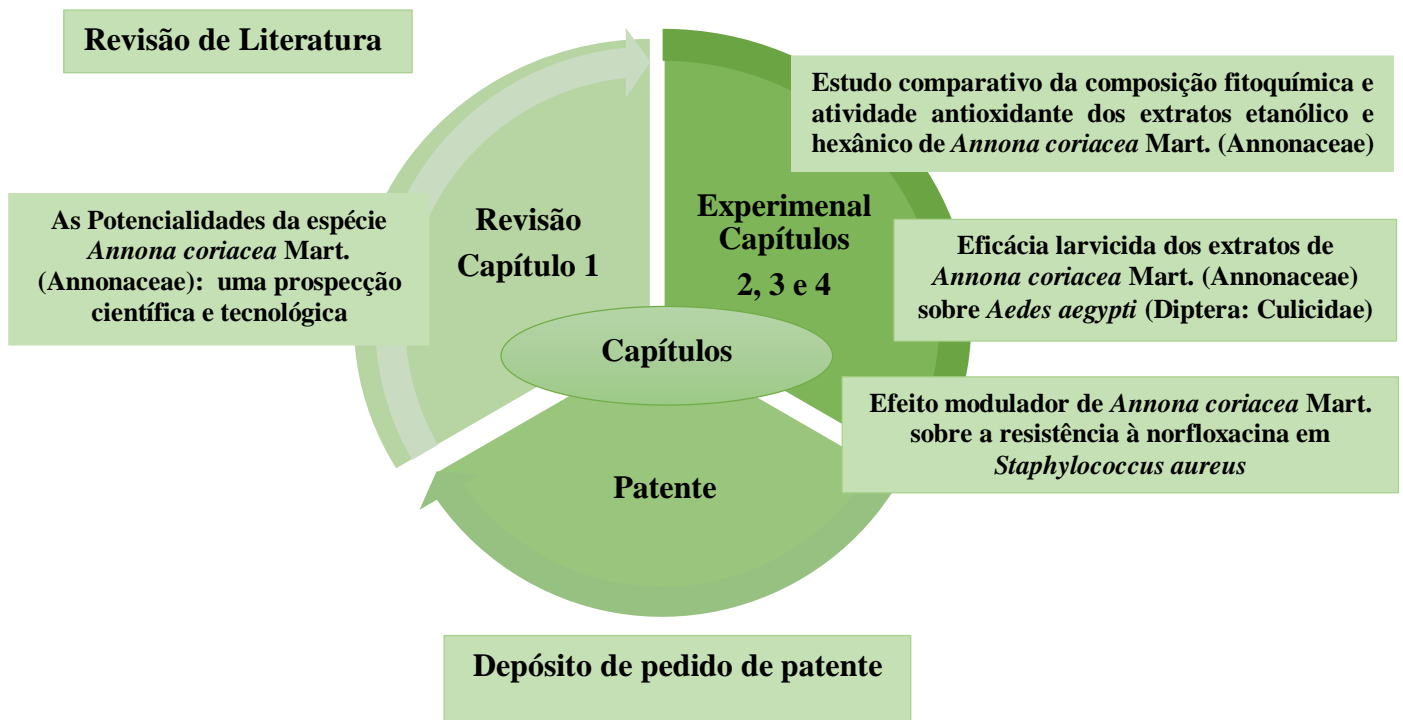
Diante do exposto, o trabalho de tese intitulado **“Potencialidades Biotecnológicas e Farmacológicas de *Annona coriacea* Mart.”** foi dividido em capítulos baseados em artigos científicos e patentes (**Organograma 1**).

O primeiro capítulo apresenta uma prospecção científica e tecnológica, a fim de conhecer o estado da arte e apresentação tecnológica da espécie *Annona coriacea* Mart., objetivando destacar sua relevância biológica e farmacológica. O capítulo dois apresenta a composição fitoquímica dos extratos hexânicos e etanólicos das folhas de *A. coriacea* Mart. O capítulo três e quatro descrevem a atividade larvicida dos extratos sobre *Aedes aegypti* Linnaeus e sobre microrganismos patogênicos (bactérias e fungos), respectivamente.

Por fim, o capítulo cinco expõe o depósito de pedido de patente referente ao uso do extrato das folhas da espécie *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) em formulações com ação larvicida, sobre *Aedes aegypti*, e moduladora da ação antibiótica das fluoroquinolonas”.

O depósito de pedido de patente foi submetido ao Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia (NINTEC) da Universidade Federal do Piauí junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) com o intuito de facilitar a interação com o setor industrial por meio de estímulo do binômio Universidade-Empresa.

Organograma 1 – Representação gráfica do trabalho de tese.



Fonte: Autor (2019).

REFERÊNCIAS

- ALALI, F. Q.; LIU, X.X; MCLAUGHLIN. J. L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.
- ALMEIDA. A. S; SANTOS, A. F. Flavonoids of the genus *Annona*. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 475-485, 2018.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009.
- AVATO. P; ARGENTIERI, M. Plant Biodiversity: phytochemicals and health. **Phytochem Revist.** 17: 645,2018. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9549-1>
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BOLZANI. S. *et al.* Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, 84(9), 1837-1846, 2012. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-12-01-11>
- CABEDO, N. *et al.* Las anonáceas: fuente de inspiración para la obtención de nuevos medicamentos. In: GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. *et al* (Org.). **Anonáceas Plantas Antiguas, estudios recientes**. México: Unicach. Cap. 2. p. 37-59, 2011.
- CARNEIROL, A. P. *et al.* Biocide activity of *Annona coriacea* seeds extract on *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 61, n. 1, p. 419-427, 2013.
- CHATROU, L. W. *et al.* Annonaceae. In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S. V (Ed.). **Flowering plants of the neotropics**. New York: Princeton University Press. p. 18-20, 2004.
- CHEN, Y. *et al.* Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 462-466, 2012.
- CORRÊA, P. G. *et al.* Caracterização morfoantômica foliar de *Annona crassiflora* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 816-818, 2008.
- COSTA, M. S. *et al.* Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 311-314, 2012.
- FABRICANT. D. S; FARNSWORTH. N. R. O valor das plantas usadas na medicina tradicional para a descoberta de drogas. **Perspectivas de saúde ambiental**, 109 (supl 1), 69-75, 2001. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s169>

FREITAS, A. *et al.* Effects of methanolic extracts of *Annona* species on the development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 446-452, 2014.

LIU, Y. *et al.* Biological evaluation of new mimetics of annonaceous acetogenins: alteration of right scaffold by click linkage with aromatic functionalities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 78, p. 248-258, 2014.

LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R. Diversity and characterization of Annonaceae from Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPE1, p. 125-131, Fev, 2014.

LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 44, 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.

MAAS, P. J. M.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Q. Annonaceae. *In*: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil>. Acesso em: 20 de janeiro de 2019.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae *In*: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB117067>. Acesso em: 18 de janeiro de 2019.

MIAO, Yun-Jie *et al.* Three cytotoxic Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 92-96, 2016.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L.(Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A. ST.-HIL. **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie**, v. 108, p. 191-205, 2007.

RAO. V. R.; HODGKIN. T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant cell, tissue and organ culture**, 68(1), 1-19, 2002.
<https://doi.org/10.1023/A:1013359015812>

REIS TUROLLA, M. S.; SOUZA NASCIMENTO, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

RODRIGUES, C. M. S. de C. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Annona leptopetala* (R.E.F.Fr.)**. 2016. 209 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE, 2016.

SOUSA, S. R. **Distribuição morfogeográfica e diversidade em frutos de *Annona cariacea* Mart.** 2016. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

TEMPONE, A. G. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005.

VALLI, M. *et al.* The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, AHEAD, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>.

VIEGAS JR, C. *et al.* Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.



Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar as características biotecnológicas e farmacológicas da espécie *Annona coriacea* Mart.

2.2 Específicos

- Realizar a prospecção científica e tecnológica da espécie *Annona coriacea* Mart.
- Caracterizar a diversidade química da espécie *Annona coriacea* fornecendo subsídios fitoquímicos.
- Avaliar as atividades dos extratos etanólico e hexânico das folhas da espécie *Annona coriacea* Mart. (EEAC) e (EHAC) frente a ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) e da atividade antioxidante (DPPH, ABTS).
- Investigar a atividade larvicida e a concentração letal (CL₅₀) dos EEAC e EHAC contra larvas de *Aedes aegypti* em 3º e 4º instar em condições de laboratório.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos EEAC e EHAC sobre microrganismos (fungos e bactérias).
- Verificar a interação moduladora dos (EHAC) e (EEAC) associados a antimicrobianos.
- Averiguar a toxicidade dos EEAC e EHAC em *Artemia salina* L. em condições de laboratório e determinar a dose letal (DL₅₀).



Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com a OMS, a resistência antimicrobiana e a dengue estão entre os dez principais problemas globais de saúde pública que irão demandar mais atenção da organização e de seus parceiros neste ano de 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

No Brasil, Dengue, Chikungunya e Zika estão presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública (BRASIL, 2017). Todas essas arboviroses, incluindo também a Febre Amarela (FA), são transmitidas pelas fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e estão causando um impacto negativo na saúde pública e na economia em todo o mundo.

De acordo com os números de casos observados no último Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, pode se afirmar que, no Brasil, essas arboviroses têm alcançado proporções gigantescas com relevante aumento de casos em todo país.

3.1 Arboviroses

As arboviroses são viroses emergentes por natureza, já que nenhuma delas é originalmente uma doença humana. Elas só se tornam importantes quando ocorre alguma modificação ecológica significativa que altere seu habitat natural, levando a modificações de reservatórios, vetores e até mesmo virulência (KNIPE *et al.*, 2013).

Algumas arboviroses são consideradas reemergentes, pois sua incidência na espécie humana tem aumentado nas últimas décadas, ou por existir a ameaça de aumentar num futuro próximo. Segundo Casseb *et al.* (2013), a emergência e reemergência de arboviroses são consideradas fenômenos naturais e apontadas como processo de evolução e adaptação de espécies, pois durante a infecção de diferentes organismos o vírus pode adquirir maior viabilidade de infecção no hospedeiro gerando estirpes mais virulentas ou melhor adaptadas.

A maioria dos reservatórios de arboviroses são mantidos em ambiente silvestre, mas o homem em sua constante expansão acaba por ter contato com focos enzoóticos. Aumentando o risco de infecção, entretanto, algumas vêm surgindo em áreas urbanas sob forma epidêmica (KNIPE *et al.*, 2013) como é o caso da dengue.

3.2 Arbovirus

O termo “arbovírus” se origina da expressão inglesa arthropod-borne viroses (ARthropod - BOrne vírus = ARBOvírus), que se refere a um grupo de vírus transmitidos por artrópodes, e segue alguns requisitos para sua correta classificação: infectar vertebrados e invertebrados;

iniciar viremia em hospedeiro vertebrado por tempo e quantidade suficientes para permitir infecção do vetor invertebrado e iniciar uma infecção produtiva; habitar a glândula salivar do invertebrado a fim de fornecer vírus para infecção de outros hospedeiros vertebrados; o meio de transmissão de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode através da via transovariana ou venérea (CASSEB *et al.*, 2013).

Os primatas humanos e os não humanos são reconhecidos como hospedeiros primários dos arbovírus, os vertebrados como roedores, pássaros e pequenos mamíferos são os hospedeiros secundários (PADBIDRI; GNANESWAR, 1979).

A distribuição geográfica é ampla, abrangendo quase todos os continentes (com exceção da Antártida), tanto em regiões temperadas como tropicais, predominando nessas últimas, pois certamente oferecem condições ecológicas mais favoráveis (CASSEB *et al.*, 2013; KNIPE *et al.*, 2013).

No Brasil, os arbovírus apresentam uma ampla distribuição geográfica, com predomínio nas regiões tropicais, que oferecerem condições ecológicas favoráveis. Alguns constituem sério problema, global ou regional, de saúde pública devido a expressiva morbidade e/ou mortalidade que ocasionam dentre os quais podemos destacar o Zika vírus (ZIKV); o Dengue vírus (DENV) e o vírus Febre amarela (YFV), ambos da família Flaviviridae e o Chikungunya vírus (CHIKV) da família Togaviridae (WÖLWER-RIECK *et al.*, 2014) todos transmitidos através da picada das fêmeas do mosquito *A. aegypti*.

3.2.1 Dengue (dengue vírus DENV)

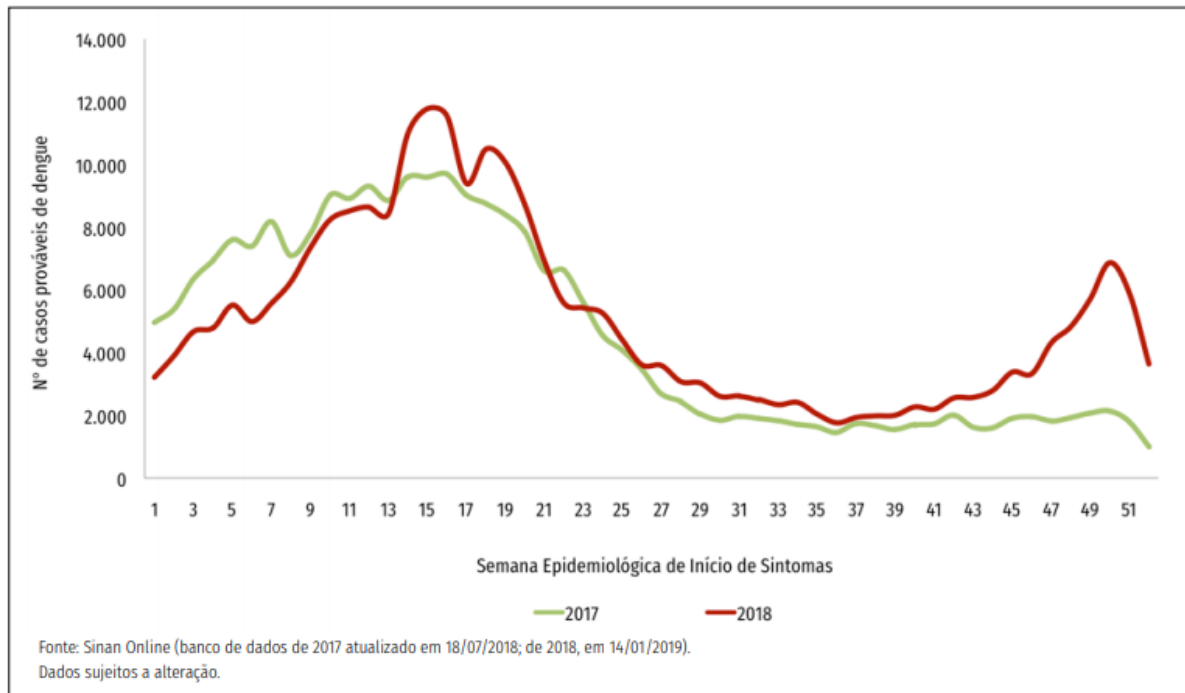
Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a dengue é um dos principais agravantes da saúde pública no mundo, onde, anualmente, estima-se que ocorrem 50 a 100 milhões de casos produzidos pelos 4 sorotipos diferentes, em mais de 100 países, de todos os continentes, com exceção da Europa (WHO, 2009).

As primeiras infecções pelo vírus da dengue datam da década de 1920 na África do Sul, que rapidamente se alastrou pelo mundo, e em meados de 1990 a infecção afetou fortemente o sudoeste da Ásia e países da América Central e do Sul (RATTAN, 2010).

A primeira epidemia de dengue documentada no Brasil, ocorreu em 1981-1982 no estado de Roraima, causada pelos soros tipos virais (DEN-1e DEN-4) (BRASIL, 2009).

De acordo com dados divulgados pelo Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde até a 52ª Semana Epidemiológica (SE) de 2018, ocorreu um aumento dos casos de dengue, em comparação com igual período do ano de 2017. Em 2017, foram registrados 239.389 casos prováveis de dengue. Em 2018, foram registrados 247.393 (**Gráfico 1**).

Gráfico 1 - Incidência de casos de Dengue no Brasil 2017-2018.



Fonte: Ministério da Saúde (2019).

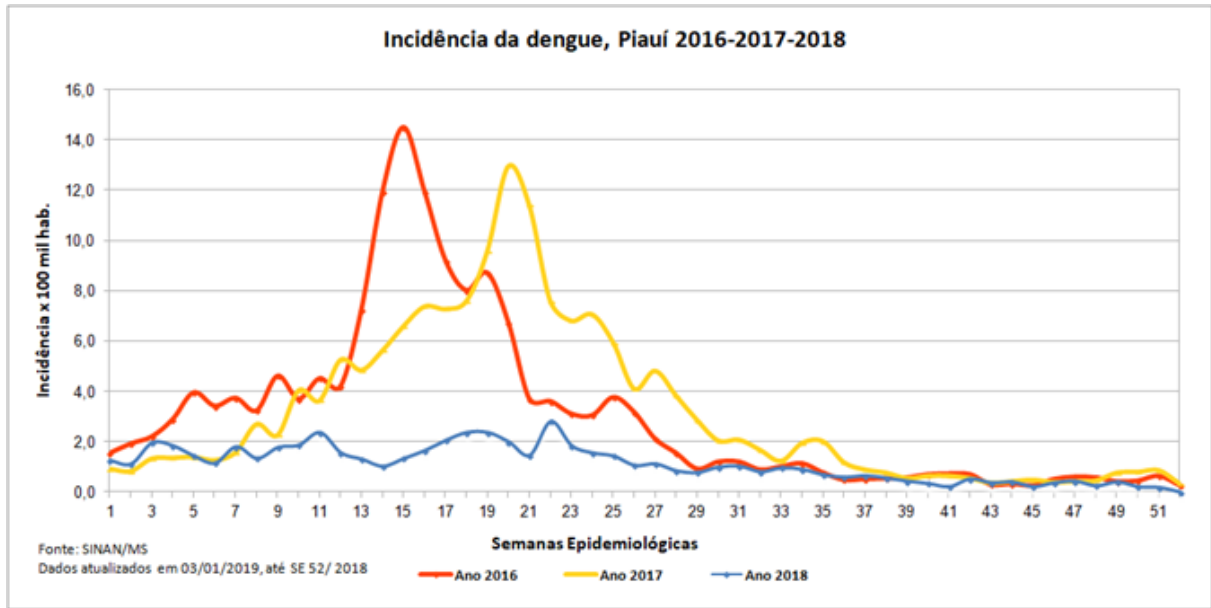
Em 2018, a região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos prováveis (93.344 casos; 37,7 %) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Nordeste (66.401 casos; 26,8 %), Sudeste (68.460 casos; 27,7%), Norte (16.288 casos; 6,6%) e Sul (2.900 casos; 1,2%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

No Piauí, a Secretaria de Estado da Saúde (SESAPI, 2019) divulgou que até a 52ª SE de 2018 houve uma redução de 65% de casos novos de dengue em relação ao mesmo período de 2017 (**Gráfico 2**).

No momento, só existe uma vacina contra dengue registrada na ANVISA, que está disponível na rede privada. Ela é usada em 3 doses no intervalo de 1 ano e só deve ser aplicada, segundo o fabricante, a OMS e a ANVISA, em pessoas que já tiveram pelo menos uma infecção por dengue. Esta vacina não está disponível no SUS, mas o Ministério da Saúde acompanha os estudos de outras vacinas (BRASIL, 2019).

Vale destacar que a causa das epidemias de dengue, assim como as demais arboviroses, está relacionada à capacidade de adaptação do vetor, que permite a reemergência da doença (NERIO *et al.*, 2010).

Gráfico 2 - Incidência de dengue no Piauí- triênio 2016-2018.



Fonte: SESAPI (2019).

3.2.2 Zika vírus (ZIKV)

Os primeiros casos de infecções de seres humanos por ZIKV ocorreu na Nigéria em 1954, mas existem relatos da aparição do vírus em macacos no ano de 1947, Floresta de Zika, em Uganda, daí a etimologia do seu nome (TEIXEIRA (CHIKV)., 2015).

No Brasil, a autoctonia do Zika foi confirmada só em 2015, e em 2016, a OMS decretou a doença como emergência em saúde pública, em virtude das alterações neurológicas e surto de microcefalia, reportados no Brasil e na Polinésia Francesa (BRASIL, 2017).

Em 2017, foram registrados 17.593 casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika em 2018, foi registrado 8.680, 3.984 (45,9 %) casos foram confirmados A região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis (3.149 casos; 36,3 %) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Nordeste (2.425 casos; 27,9%), Centro-Oeste (1.733 casos; 20,0 %), Norte (1.326 casos; 15,3 %) e Sul (47 casos; 0,5%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). No Piauí, segundo dados da SESAPI, os casos de Zika também diminuíram de 86 para 23 na comparação entre 2017 e 2018. (SESAPI, 2019).

3.2.3 Febre Chikungunya (CHIKV)

A primeira ocorrência foi identificada pela primeira vez em 1950, no sul da Tanzânia. Assume importância de alerta mundial, porque se trata de uma patologia emergente, haja vista

que ainda não há um tratamento ou vacina eficaz para o vírus. No Brasil, a doença surgiu em 2014, quando foram confirmados 2.772 casos em seis estados do país (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Em 2017, foram registrados 185.593 casos prováveis de febre de Chikungunya e em 2018, 87.687 casos, destes, 68.962 foram confirmados. Assim como nos casos de Zika a região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de febre de Chikungunya (52.966 casos; 60,4%) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Centro-Oeste (13.862 casos; 15,8 %), Nordeste (11.287 casos; 12,9 %), Norte (9.315 casos; 10,6 %) e Sul (257 casos; 0,3 %) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Segundo a SESAPI (2019), no Piauí ocorreu uma redução de 90,8% em relação ao mesmo período de 2017.

3.2.4 Febre amarela FA - (YFV)

Foi o jesuíta Raymond Bréton o primeiro a se referir à febre-amarela com relativa precisão, ao relatar a epidemia que ocorreu em 1635 entre os imigrantes francêses na ilha de Guadalupe. A epidemia reapareceu na ilha de Guadalupe em 1648 e nesse mesmo ano eclodiu em Yucatan, no México. Admite-se que a primeira epidemia de febre-amarela conhecida no Brasil, foi a que irrompeu no Recife, no ano de 1685 (FRANCO, 1969).

De acordo com dados do Ministério da Saúde sobre Febre Amarela no Brasil, boletim nº 03, nas últimas décadas, a Febre Amarela (FA) tem sido registrada além dos limites da área considerada endêmica (região amazônica). Processos de reemergência do vírus produziram importante impacto na saúde pública, representado pelos mais extensos surtos em humanos e epizootias em primatas não humanos (PNH) pela doença das últimas décadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; 2019).

Casos humanos e epizootias PNH foram recentemente registrados em uma ampla área do território nacional. Inicialmente, entre 2014/2015, a transmissão se deu na região Norte, com posterior expansão no sentido leste e sul do país, onde afetou prioritariamente a região Centro Oeste entre 2015/2016 (BRASIL, 2019).

Mais recentemente, no período 2017/2018, foi registrado um dos eventos mais expressivos da história da FA no Brasil. A dispersão do vírus alcançou a costa leste brasileira, na região do bioma Mata Atlântica, que abriga uma ampla diversidade de PNH e de potenciais vetores silvestres e onde o vírus não era registrado há décadas. O surto afetou principalmente os estados da região Sudeste, quando foram registrados 1.376 casos humanos e 483 óbitos, além de 864 epizootias. É importante ressaltar que toda esta expansão da circulação do vírus está associada à ocorrência do ciclo silvestre da doença, não havendo nenhum indício da sua

urbanização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; 2019). De acordo com a SESAPI (2019) o Piauí segue sem casos de febre amarela.

A destruição do *Aedes aegypti*, vetor dessas arboviroses, interromperia o ciclo das doenças.

3.3 Biologia do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

O *Aedes aegypti* é um mosquito representante da ordem Diptera, pertencente à família Culicidae. Esta família possui mais de 3.200 espécies descritas, é subdividida em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitina. A subfamília Culicinae detém mais de 1.200 espécies, destacando-se o gênero *Aedes* (ALMEIDA, 2011).

A ocorrência do *A. aegypti* foi primeiramente descrita no Egito por Linnaeus, em 1762 (ZARA *et al.*, 2016), daí a derivação do nome específico, porém é originário da África região da Etiópia. Provavelmente, chegou ao Brasil pelos navios negreiros, durante o período da colonização. Em 1955 chegou a ser considerado erradicado, depois de múltiplas ações de controle, devido a sua importância como vetor da febre amarela. Porém, os países vizinhos não tiveram a mesma preocupação com o vetor, e assim anos depois o mosquito foi reintroduzido em nosso país (PRATA, 2000; BROWN *et al.*, 2011; BROWN *et al.*, 2013).

Atualmente apresenta distribuição mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, com ocorrência em países do Sudeste Asiático, Américas, África, Pacífico e Mediterrâneo (WHO, 2009).

Essas faixas compreendem entre as latitudes 35°N e 35°S, com relatos de mosquitos encontrados fora dessa faixa, quase sempre em virtude da estação quente, pois o mesmo não sobrevive a invernos rigorosos, e não é encontrado com facilidade acima dos 1000 metros do nível do mar, porém há registros de presença dos mosquitos em locais com 2.200 metros. Com a destruição dos habitats naturais, devido às pressões antrópicas, uma parte da população silvestre sofreu um processo seletivo que favoreceu a disseminação e sobrevivência da espécie em aglomerados humanos (BRASIL, 2001).

O *Aedes aegypti* apresenta como características fenotípicas corpo escuro, com faixas brancas nas bases dos segmentos, apresenta desenho semelhante a uma lira no dorso (BESERRA *et al.*, 2007) o tegumento predominantemente negro com escamas branco-prateadas, típico do gênero *Aedes*. O aparelho bucal tipo é do tipo sugador pungitivo (MARTINS, 2013) (**Figura 1**).

Figura 1 – Fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).



Fonte: Agência Fiocruz de Notícias e Portal de Periódicos. Foto: Acervo CCS/Fiocruz (2019).

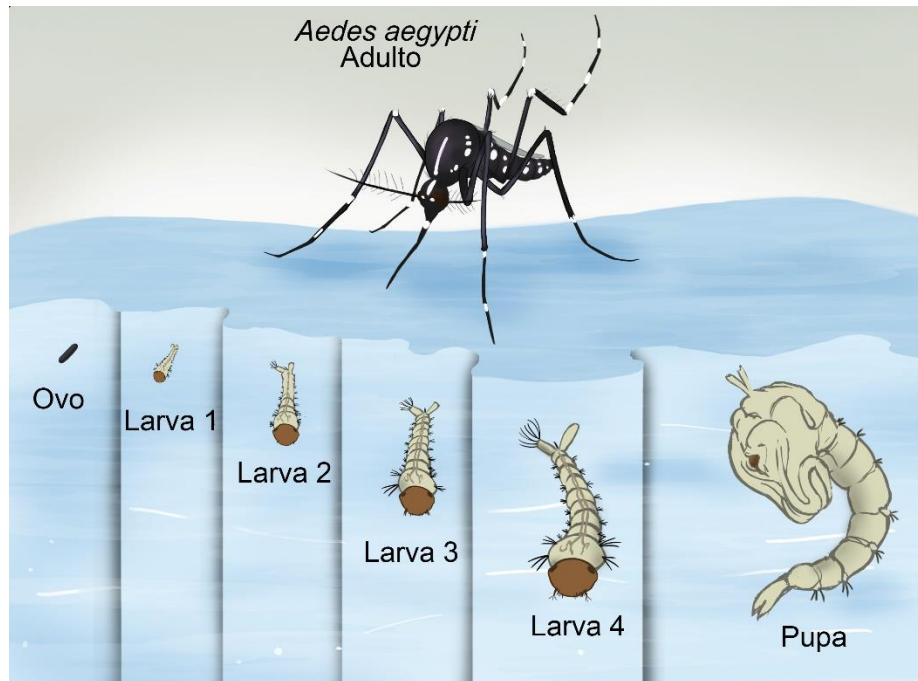
A etologia do *Aedes aegypti* beneficia sua ampla dispersão, favorecida nos ambientes urbanos, preferencialmente no intra e no peridomicílio humano. Raramente são encontrados em ambientes semissilvestres ou onde não há presença intensa do homem (ZARA *et al.*, 2016).

Machos e fêmeas se alimentam de fluídos açucarados como néctar de flores e de outros nectários. Porém as fêmeas também são hematófagas, elas precisam do sangue para completar o desenvolvimento dos ovos. A quantidade de sangue ingerido irá determinar o número de oviposturas, a qual poderá ser alcançada com 3,0 a 3,5 mg de sangue, ovipositando 120 ovos, aproximadamente, por repasto sanguíneo (BRASIL, 2017). O repasto sanguíneo das fêmeas é importante para a ovipostura, para o desenvolvimento embrionário (até que se complete a oogênese) e para a infecção pelos mais variados tipos de vírus, neste último caso, o vertebrado hospedeiro precisa está em fase de viremia (BRASIL, 2009).

Para copular as fêmeas atraem os machos pelos zumbidos emitidos pelas asas. Logo em seguida, os machos são devorados, deixando apenas seus órgãos reprodutores, com intuito de impedir que a fêmea copule com outros machos (NEVES, 2010).

Os *Aedes aegyptis* são insetos holometábolos (**Figura 2**). A oviposição se faz nas paredes dos criadouros pouco acima da superfície a água. Os ovos não chegam a 1mm de comprimento. Para que os embriões tenham um bom desenvolvimento os ovos precisam passar cerca de 48 horas em boas condições de umidade e temperatura, assim, se tornam resistentes a dessecação e podem sobreviver por até 450 dias sem o contato com a água (BRASIL, 2001).

Figura 2 - Ciclo Biológico do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).



Fonte: Autor (2019) - Adaptado de Geris *et al.* (2008).

Os ovos eclodem após cerca de 10 dias, dando origem a larvas no 1º instar, para que ocorra a eclosão é necessário que os ovos estejam em contato direto com a água e que esta contenha microrganismo e compostos químicos (FORATTINI, 2002).

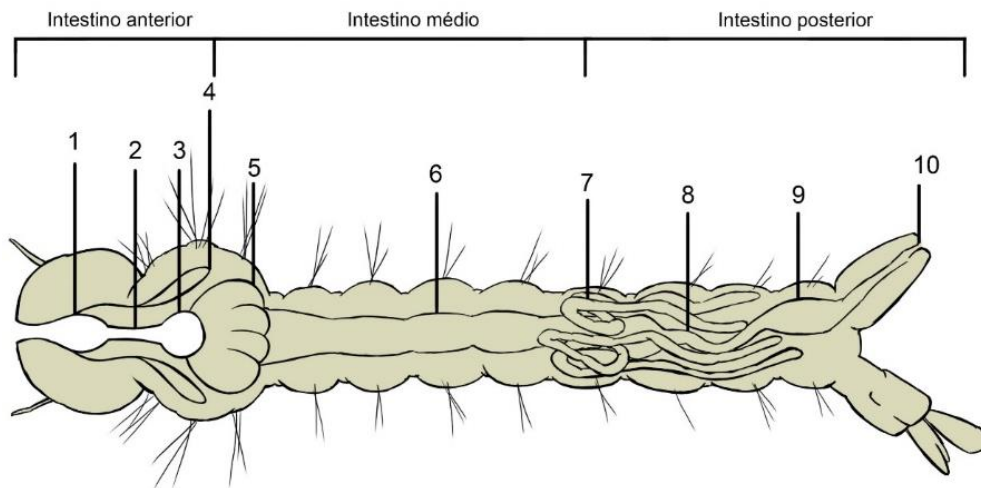
As larvas no 1º instar absorvem o material orgânico acumulado no criadouro para crescerem sequencialmente de comprimento, passando por quatro estádios. Temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro são fatores que interferem no seu desenvolvimento. Em condições favoráveis essa fase dura cerca de 5 dias, já em condições adversas pode durar semanas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

Após alcançarem o 4º instar elas transformam-se em pupa, cuja duração é de 2 a 3 dias, na sequência, para finalizar o ciclo, ocorre o aparecimento de características próprias dos mosquitos adultos como asas, probóscito e patas (GADELHA, 1985). Para favorecer o processo de oxidação e enrijecimento da quitina, os mosquitos saem à procura de ambiente livre de luz e vento e após 24 horas, estão aptos a iniciar novamente o ciclo em busca de alimentos e cópula (NEVES, 2010).

As larvas de *Aedes aegypti* apresentam um aspecto alongado e vermiforme, corpo definido em cabeça, tórax e abdômen. De aspecto globoso e mais robusto, a cabeça e o tórax têm uma maior quantidade de quitina, já o abdômen fino, liso, flexível e dividido por nove segmentos o que garante grande mobilidade (ABED *et al.*, 2007).

O intestino das larvas apresenta três partes distintas (**Figura 3**), chamadas intestino anterior (estomodeu), intestino médio (mesêntero) e intestino posterior (proctodeu). O mesêntero é um dos locais de ação de substâncias tóxicas para larvas de *Aedes aegypti*. Esta área é subdividida em três regiões visualizadas pelas diferentes características morfohistológicas ao longo do tubo digestório. As células do mesêntero têm em comum uma intensa atividade excretora essencial para formação da matriz peritrófica, membrana extracelular que atua como uma barreira protetora, eliminada como forma de desintoxicação quando as larvas ingerem substâncias tóxicas, químicas e biológicas (VALOTTO *et al.*, 2014).

Figura 3 - Aparelho digestório das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).



Sistema digestivo da larva: **1:** faringe; **2:** esôfago; **3:** proventrículo; **4:** glândula salivar; **5:** cecos gástricos; **6:** estômago ou intestino médio; **7:** tubos de Malpighi; **8:** fleo/cólon; **9:** reto; **10:** ânus.

Fonte: Autor (2019) - Adaptado de Consoli *et al.* (1994).

As larvas podem filtrar até dois litros de água por dia (CONSOLI, 1994). Durante a ingestão dos alimentos, as peças bucais movem-se juntas, produzindo de 180 a 240 batimentos por minuto e o movimento das escovas labiais faz com que a água flua em direção a cabeça trazendo as partículas de alimento. Passam a maior parte de tempo alimentando-se de detritos orgânicos, bactérias, levedos vivos, esporos de fungos, ou qualquer partícula de matéria orgânica. Elas não selecionam às partículas para alimentação o que facilita a ação de substâncias larvicidas por ação digestiva, já as pupas não se alimentam (FORATTINI, 2002).

Diversos mecanismos têm sido utilizados na busca para combater o *Aedes aegypti*, como: inseticidas sintéticos, programas educacionais e biocidas.

3.4 Combate ao *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

3.4.1. Inseticidas sintéticos

Uma característica geral, segundo Chiaravalloti Neto *et al.* (2003) é que os programas de combate à dengue são feitos com aplicações sucessivas de inseticidas sintéticos. As principais classes de inseticidas sintéticos utilizados no controle de vetores são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (BISSET, 2002).

Os organoclorados, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), são os inseticidas mais antigos. Suas propriedades inseticidas foram descobertas em 1939 por Paul Müller e atuam no canal sódio-potássio nas membranas dos axônios (D'AMATO *et al.*, 2002), eles contêm fósforo. O teméfos é o único desse grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquitos e age inibindo a Acetilcolinesterase (AChE). Já os piretróides sintéticos como a cipermetrina, utilizada como adulticida, são produzidos em laboratório a partir de uma substância natural o piretro, extraída do crisântemo. Essa substância age mantendo abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios (BRAGA; VALLE, 2007).

Os produtos sintéticos como os piretróides e organofosforados possuem ação rápida no combate ao *Aedes aegypti*, porém são altamente tóxicos para o ser humano e ao meio ambiente. O teméfos, usado nos programas de saúde pública, apresenta um efeito residual de 90 dias (PONTES *et al.*, 2005).

O uso contínuo desses produtos é indesejável por vários motivos, como o desenvolvimento de resistência do inseto, desequilíbrios biológicos, efeitos prejudiciais ao homem e inimigos naturais, além dos altos custos que envolvem a sua utilização. Além de causar resistência, gera uma amplificação no uso destas substâncias, uma vez que o volume se torna cada vez maior e frequente nas aplicações, para que o produto atinja sua eficácia. Isso pode levar a toxicidade do ambiente e do ser humano (KOGAN, 1998).

Os mecanismos que influenciam na velocidade dessa seleção de organismos resistentes podem ser categorizados em fatores genéticos, biológicos-ecológicos e operacionais, sendo que apenas esses últimos fatores podem ser controlados pelo homem a fim de diminuir o aparecimento da resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1986).

O primeiro registro da seleção da resistência em mosquitos pelo uso de larvicidas e adulticidas data de 1947, quando populações de *Aedes* demonstraram resistência ao DDT (BROWN, 1986).

A resistência de populações de *Aedes aegypti* ao teméfos foi registrada em várias localidades de diversas unidades federais no Brasil (BRAGA; VALE, 2007) como no Distrito Federal (CARVALHO *et al.*, 2001; 2004), Espírito Santo e Rio de Janeiro (LIMA *et al.*, 2003),

Campinas (CAMPOS; ANDRADE, 2001), São Paulo (MACORIS *et al.*, 2003), tendo posteriormente sua distribuição interrompida.

Em 2014 o Pyriproxyfen passou a ser utilizado em regiões com pouco saneamento, onde há necessidade de armazenamento de água e os depósitos não podem ficar protegidos fisicamente. De acordo com a nota técnica o produto atua sobre o inseto de forma análoga ao hormônio juvenil, inibindo o desenvolvimento das características adultas do inseto (por exemplo, asas, maturação dos órgãos reprodutivos e genitália externa), mantendo-o com aspecto "imaturo" (ninfa ou larva). Durante o estadio larvário o hormônio juvenil também está presente, sendo sua produção interrompida ao final do 4º estágio larvário quando a atuação do Pyriproxyfen é mais notada. Portanto, em campo se verifica o efeito de prolongação do tempo que o vetor se mantém como larva que pode chegar até 20 dias. Esse produto tem pouco efeito sobre mortalidade de larvas, sendo seu efeito de mortalidade verificado em pupas e na inibição de emergência do adulto (BRASIL, 2014).

Um relatório, sem validação científica, publicado por um grupo de médicos argentinos, levanta a hipótese que o uso de Pyriproxifen potencialize a má-formação cerebral, causada pelo zika vírus. Em nota, o Ministério da Saúde afirma que não existe nenhum estudo epidemiológico que comprove essa relação.

Os efeitos adversos dos inseticidas sintéticos, como toxicidade, desenvolvimento de resistência e impactos ambientais, têm motivado a busca por alternativas que possam ser incorporadas em programas sanitários para o controle de insetos vetores de doenças. Diversas tecnologias têm sido desenvolvidas como alternativas no controle do *A. aegypti*, utilizando-se diferentes mecanismos de ação, tais como medidas sociais, monitoramento seletivo da infestação, dispersão de inseticidas, novos agentes de controle químico e biológico e procedimentos moleculares para controle populacional dos mosquitos, inclusive considerando-se combinações entre técnicas (ZARA *et al.*, 2016).

3.4.2 Inseticidas fitoquímicos

Diversas tecnologias têm sido desenvolvidas como alternativas no controle do *A. aegypti*, utilizando-se diferentes mecanismos de ação, tais como medidas sociais, monitoramento seletivo da infestação, dispersão de inseticidas, novos agentes de controle químico e biológico e procedimentos moleculares para controle populacional dos mosquitos, inclusive considerando-se combinações entre técnicas (ZARA *et al.*, 2016).

As plantas possuem uma rica fonte de bioativos químicos que podem ajudar no controle de pragas (MACIEL *et al.*, 2010). Os derivados extratos e óleos vegetais são amplamente

conhecidos pela sua diversidade química e pela sua variada aplicação na indústria, pois fornecem metabólitos secundários com atividade inseticida. Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem ser utilizados como um método alternativo aos inseticidas sintéticos, pois normalmente agem em doses baixas e com ações específicas, além de poucos serem tóxicos a mamíferos (REGNAULT-ROGER, 1997).

Fatores como diferentes partes da planta, o solvente utilizado para extração; a interferência da luz e a origem geográfica da planta podem alterar a ação dos fitoquímicos. As condições de execução dos bioensaios, como a temperatura, o estado nutricional de adultos e imaturos e as substâncias utilizadas na diluição em água dos fitoquímicos após sua extração, podem alterar a suscetibilidade dos indivíduos ou a toxicidade dos extratos (SUKUMAR, 1991).

Alguns compostos naturais, como extratos naturais e óleos essenciais de plantas, têm sido investigados para constatação de atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* (BARRETO, 2005). Esses derivados botânicos apresentam diversas atividades contra insetos, podendo ter efeito larvicida, serem inibidores de oviposição, de crescimento e reprodução ou interferir nos receptores olfativos sendo atrativos ou repelentes. Também podem atuar em todos os estágios de vida dos mosquitos ou agir de forma diferenciada nas diferentes espécies (PRAJAPATI *et al.*, 2005).

As características de determinados grupamentos químicos estruturais desses compostos ou a combinação entre eles podem conferir aumento ou redução da atividade larvicida (SANTOS *et al.*, 2011). As plantas da família Annonaceae, presentes no bioma Cerrado, apresentam em sua composição as acetogeninas, com propriedade inseticida no controle de *Aedes aegypti*, conforme pesquisas realizadas com *Annona squamosa* (MASSEBO *et al.*, 2009). Extratos das sementes de *Annona coriacea* mostraram atividade larvicida e efeito residual, os extratos de *Annona foetida* demonstraram-se eficazes no controle de *Aedes aegypti* tanto como larvicida quanto sob efeito de doses subletais, provavelmente devido à presença das acetogeninas (DILL *et al.*, 2012).

A utilização de biocidas (inseticidas ou antimicrobianos) a partir de plantas pode ser vantajosa em relação aos sintéticos. Como são provenientes de recursos renováveis e por serem uma mistura de vários compostos ativos agindo sinergicamente, a seleção dos organismos resistentes, mosquitos, fungos ou bactérias, dentre outros organismos, pode ocorrer em menor intensidade. Assim, os metabólitos secundários obtidos dos extratos de plantas podem ser eficazes no combate ao *Aedes aegypti* e também no combate a microrganismos multirresistentes, como bacterias e fungos.

3.5 Resistências aos antimicrobianos

O aumento da disponibilidade de antibióticos para salvar vidas no mundo em desenvolvimento é um fator positivo, pois permitiu revolucionárias intervenções médicas como a quimioterapia, transplantes de órgãos e praticamente todas as grandes cirurgias (WRIGHT, 2010). Porém em todo o mundo, o uso excessivo desses medicamentos tem criados cepas resistentes de bactérias patogênicas (REARDON, 2014).

Os antibióticos são uma classe de fármacos utilizados para o tratamento de doenças infecciosas, que diferem uns dos outros quanto as suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas e também no seu espectro e mecanismo de ação. Os mecanismos farmacodinâmicos podem ser: Inibição da síntese de parede celular; Inibição da síntese proteica; Inibição da síntese de ácidos nucleicos; Desorganização da membrana celular e Interferência no metabolismo celular (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Esse uso excessivo de antibióticos inclui diversos fatores como a postura de profissionais de saúde que prescrevem antimicrobianos desnecessariamente ou prescrevem baseado apenas em sinais e sintomas sem fundamentação em culturas microbianas e testes de suscetibilidade, sendo estes os principais fatores desencadeadores de patógenos resistentes em ambiente hospitalar, no qual os fármacos antimicrobianos exercem grande pressão seletiva sob cepas resistentes (GATTI MENEZES *et al.*, 2007), fatores socioeconômicos que influenciam o uso irracional e abusivo de antimicrobianos como a pobreza e acesso inadequado a estes fármacos (COSTA; SILVA-JÚNIOR, 2017).

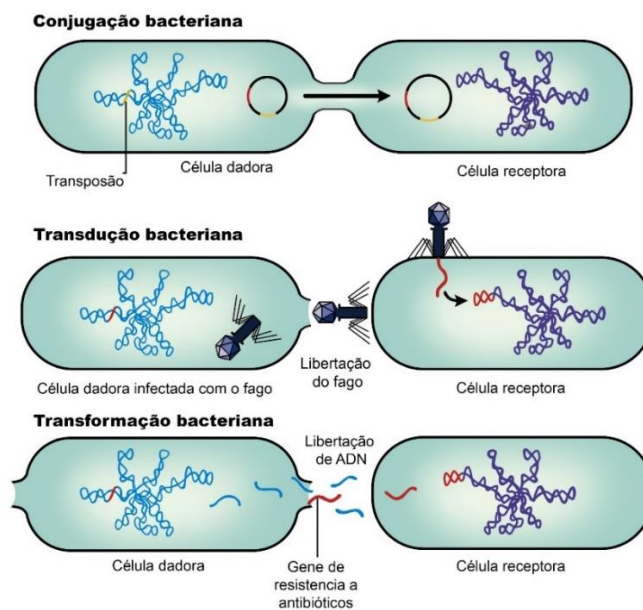
Vale destacar que o uso inapropriado de antimicrobianos não se restringe ao uso médico humano e veterinário, pois existem disponíveis no mercado uma gama de produtos como sabonetes, detergentes, cremes dentais, escovas de dentes, creme para as mãos e outros produtos contendo agentes antimicrobianos que favorecem a seleção de cepas resistentes dentro do ambiente doméstico, em função da imagem de proteção contra os germes que esses produtos transmitem em suas campanhas midiáticas (COSTA; SILVA-JÚNIOR, 2017).

O uso de drogas antimicrobianas na agricultura, pecuária e piscicultura com finalidade profilática e de tratamento também representam um risco à saúde pública por selecionar cepas resistentes que podem colonizar o trato digestivo humano e transferir genes de resistência aos patógenos e comensais humanos que podem se tornar patógenos oportunistas (COSTA; SILVA-JÚNIOR, 2017).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético relacionado a existência de genes que codificam diferentes proteínas, responsáveis por mecanismos bioquímicos que impedem a ação de drogas (DZIDIC *et al.*, 2008).

Essa resistência pode ser uma característica natural, intrínseca de certas espécies de bactérias que podem resistir à ação de um dado antibiótico como resultado de uma característica estrutural ou funcional inerente de dada espécie (BLAIR *et al.*, 2015); pode também ser adquirida como resultado de mutações espontâneas, que ocorrem durante a replicação, modificando seu DNA ou mutações induzidas por intermédio de agentes mutagênicos como radiações ionizantes e não ionizantes, agentes alquilantes ou espécies reativas de oxigênio (ROS); ou ainda adquiridas pela aquisição de material genético exógeno anteriormente presente em outros microrganismos que contenham genes de resistência que são propagados por meio de mecanismos de transferência gênica horizontal (TAVARES, 2000) como a conjugação bacteriana, a transformação e a transdução (DZIDIC *et al.*, 2008) (**Figura 4**).

Figura 4 - Mecanismos de aquisição de material genético exógeno.



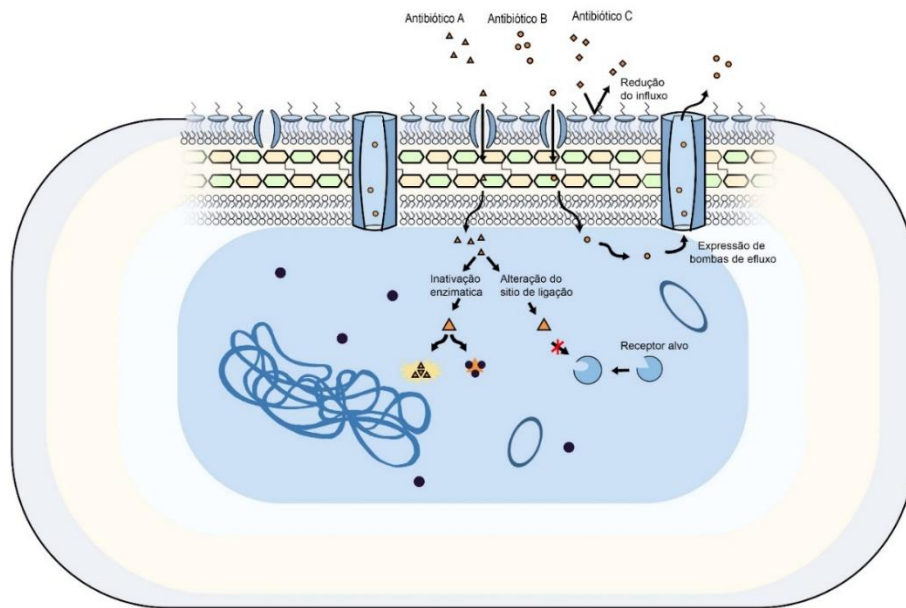
Fonte: Autor (2019) - Adaptado de Nogueira *et al.* (2017).

3.5.1 Mecanismos bioquímicos de resistência aos antibióticos

Os mecanismos pelos quais as bactérias expõem resistência aos antimicrobianos são variados e incluem (**Figura 5**).

Inativação enzimática do antibiótico – a bactéria produz enzimas que degradam ou inativam o antibiótico. Essa inativação pode envolver três tipos de reações enzimáticas tais como hidrólise, transferência de um grupo químico ou processo de oxiredução (COSTA *et al.*, 2008).

Figura 5 - Principais mecanismos bioquímicos de resistência aos antimicrobianos.



Fonte: Autor (2019) - Adaptado de Nogueira *et al.* (2017).

Modificação do alvo do antibiótico: A maioria dos antibióticos se liga especificamente aos seus alvos com alta afinidade e dessa forma previnem a atividade normal do alvo. Entretanto mudanças estruturais do alvo que previnem a ligação efetiva entre o alvo e o antibiótico, mas que ainda possua sua função normal conferem resistência (BLAIR *et al.*, 2015).

Alteração da permeabilidade da membrana: devido à alteração na conformação dos canais proteicos. Os fármacos podem penetrar a membrana celular: por difusão simples através da bicamada fosfolipídica; por difusão facilitada pelas porinas, proteínas membranares ou ainda por *self promoted uptake*. Onde a penetração do fármaco nas bactérias depende de características físico-químicas dos antibióticos como a polaridade e o tamanho das moléculas (Kumar *et al.*, 2013).

Bombas de efluxo: as “bombas de efluxo” são proteínas integrantes da membrana plasmática bacteriana e que tem sido responsabilizadas por diversos casos de resistência a drogas, as quais são expelidas para fora da célula mantendo as concentrações intracelulares em baixos níveis. Este é um mecanismo de resistência que afeta todas as classes de antibióticos, atingindo principalmente os macrólitos, tetraciclinas e fluoroquinolonas (DZIDIC *et al.*, 2008).

Segundo Kumar *et al.* (2013) um novo modo de resistência é a “formação de biofilmes”, capaz de ocorrer em muitos lugares, incluindo a placa dentária, ambientes aquáticos, catéteres médicos, feridas traumáticas e outros, onde os micro-organismos encontrados nos biofilmes são protegidos contra a entrada de múltiplos agentes antimicrobianos.

3.5.2 Atividade Moduladora em Bactérias

Modificadores da atividade antibiótica é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo reverterem a resistência bacteriana a certos antibióticos, como é o caso de vários produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes) que alteram a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo (GIBBONS, 2004).

O uso de extratos, provenientes de produtos naturais, como agentes antimicrobianos pode ser uma alternativa relevante, tendo em vista que os mesmos apresentam uma baixa possibilidade de proporcionar resistência microbiana, porque são misturas complexas, fazendo com que a adaptabilidade microbiana seja muito difícil (DAFERERA *et al.*, 2003). Substâncias naturais vem sendo isoladas e testadas com sucesso contra o desenvolvimento de bactérias resistentes a múltiplas drogas (FOUOTSA, 2013)

O extrato hexânico e metanólico das folhas frescas da *Allium cepa* L. apresentaram atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos frente as cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de linhagem multirresistente (CRUZ *et al.*, 2016). O óleo essencial de *Rollinia leptopetala* R. E. Fr., uma Annonaceae, apresentou atividade moduladora da resistência numa linhagem de *Staphylococcus aureus*. (COSTA *et al.*, 2008). O extrato etanólico de *Clusia nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae) atuou como um agente modulador da atividade antimicrobiana de bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus*, *Escherinchia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (HONORIO OLIVEIRA *et al.*, 2016). Tintino *et al.* (2013) descrevem o sinergismo dos extratos hexânico e etanólico de *Costus cf. arabicus* L. para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são a melhor fonte para a obtenção de uma variedade de moléculas biologicamente ativas. Dados sobre a atividade antibacteriana de extratos vegetais frente a variados microrganismos permitem evidenciar que as plantas apresentam potencial para o tratamento terapêutico, apesar de muitos destes extratos não terem sido completamente investigados cientificamente (NASCIMENTO *et al.*, 2000). O interesse por novos antibióticos provenientes das plantas apresenta alternativa que comporta menos custo e efeito eficaz, uma vez que o princípio ativo poderá retardar ou inibir a replicação bacteriana (SANTOS *et al.*, 2011).

A complexidade de metabólitos presentes nos extratos vegetais, comprovados através de sua análise fotoquímica, pode oferecer benefícios promotores da saúde. Ensaio realizados com produtos obtidos de plantas podem ser promissores para produção de novos fármacos, biodegradáveis e menos tóxicos ao ambiente ou funcionarem como indicadores positivos para ensaios futuros.

REFERÊNCIAS

- ABED, R. A. *et al.* Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulada* Ducke (Leguminosae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 1, p. 75-86, 2007.
- ALMEIDA, P. G. Mosquitoes (Diptera, Culicidae) and their medical importance for Portugal: challenges for the 21st century. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 6, p.961–74, 2011.
- BARRETO, C. F. *Aedes aegypti*-Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 2, n. 1, p. 62-73, 2005.
- BISSET, J. A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 54, n. 3, p. 202-219, 2002.
- BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42, 2015.
- BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279-293, out-dez, 2007.
- BRASIL. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção de dengue**, Controle de Epidemias. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 160 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) Brasília: Ministério da Saúde, 2009. ISBN 978-85-334-1602-4. Disponível em URL: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_dengue.pdf.
- BRASIL. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2009. Disponível em: https://mosquito.saude.es.gov.br/Media/dengue/Arquivos/Diretrizes_dengue_Epidemia.pdf. Acesso em: 21 de janeiro de 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde- **Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2018/2019**. Informe nº 01 | 2018/2019. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/12/informe-FA-n.1_8nov_final2.pdf. Acesso em: 21 de janeiro de 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2018/2019**. Informe nº 03 | 2018/2019. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao/situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 03 de janeiro de 2019.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação Nº 4, DE 28 DE Setembro de 2017**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0004_03_10_2017.html. Acesso em: 12 de março de 2019.
- BRASIL. MS – Ministério da Saúde. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, **Informe especial sobre febre amarela no Brasil**. 2017.

BRASIL. MS - Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Dados e indicadores selecionados**. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

BRASIL. **Notas técnicas para utilização do larvicida Pyriproxyfen**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/15/Instruções-para-uso-de-pyriproxifen-maio-2014.pdf>. Acesso em: 25 de janeiro de 2019.

BRASIL. **Principais ameaças para a saúde em 2019**. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2019-01/oms-lista-10-principais-ameacas-para-saude-em-2019>. Acesso em: 12 de abril de 2019.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Volume 50. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf> <Acesso em: 25 de janeiro 2019>.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Volume 49 Dez. 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>. Acesso em: 25 de janeiro de 2019.

BROWN, A. W. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 1986.

BROWN, J. E. *et al.* Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514-525, 2014.

BROWN, J. E. *et al.* Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 278, p.2446-2454, 2011.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 232-236, 2001.

CARVALHO, M. S. L. *et al.* Susceptibilidade do aedes aegypti ao inseticida temephos no distrito federal, em 2000. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 10, p. 41-43, 2001.

CARVALHO, M. S. L. *et al.* Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 623-629, 2004.

CASSEB, A. R. *et al.* Arbovírus: importante zoonose na Amazônia brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.

CHIARAVALLOTI NETO, F. *et al.* Controle do vetor do dengue e participação da comunidade em Catanduva, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 6, p. 1739-1749, 2003.

CONSOLI, R. A. G. B; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 1994.

COSTA, A. L. P.; SILVA-JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica** (UNIFAP), v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

COSTA, V. C. O. *et al.* Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* RE Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 245-248, 2008.

CRUZ, A. J. F. *et al.* Evaluation of the Antibacterial and Modulating Activity of Methanolic and Hexanic Extracts of the *Allium Cepa*. **Revista Ciências de la Salud**, v. 14, n. 2, p. 191-200, 2016.

D'AMATO, C. *et al.* DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 6/A, p. 995-1002, 2002.

DAFERERA, D. J. *et al.* The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.

DILL, E. M. *et al.* Efeito residual do extrato de *Annona coriacea* sobre *Aedes aegypti*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 595-601, 2012.

DZIDIC, S. *et al.* Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Bio chemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**. v. 46, n. 11, p. 11-21, 2008.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Especial dengue**. Disponível em: <http://periodicos.fiocruz.br/pt-br/content/especial-dengue>. Acesso em: 25 de janeiro de 2019.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia** Vol. 2. Edusp, 1996.

FOUOTSA, H. Antibacterial constituents of Cameroonian medicinal plants: *Garcinia nobilis*, *Orcinia suaveolens* and *Balsamocitrus camerunensis*. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 81, p. 1-10, Apr. 2013.

FRANCO. O. **A História da febre amarela no Brasil**. 1969. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/0110historia_febre.pdf. Acesso em: 25 de janeiro de 2019.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor. **Manual de normas técnicas**, p. 75, 2001.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 29-36, 1985.

GATTI MENEZES, F. *et al.* Evolução da farmacoterapia de antibióticos em pacientes com infecção hospitalar. **Saúde Coletiva**, v. 4, n. 15, 2007.

GEORGHIOU, G.P e TAYLOR, C. E. Pesticide resistance: strategies and tactics for management. **National Academies Press**, p. 157-169, 1986.

- GERIS, R. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae), **Revista do Instituto Medicina Tropical**, v. 50, p. 25-28, 2008.
- GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 21, n. 2, p. 263-277, 2004.
- GUIMARÃES, D. O. *et al.* Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667- 679, 2010.
- HONORIO DE OLIVEIRA, A. *et al.* Actividad moduladora de extractos de las hojas de *Clusia nemorosa* G. Mey (clusiaceae) sobre drogas antimicrobianas. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2016.
- KNIPE, D. M. *et al.* Fields virology. 6th Edition. **Philadelphia**: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- KOGAN, M. Integrated pest management historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 243- 270, 1998.
- KUMAR, S. *et al* Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **Chemotherapy**, v. 14, p. 18, 2013.
- LIMA, J. B. P. *et al.* Resistência do *Aedes aegypti* aos organofosforados em vários municípios do estado do Rio de Janeiro e Espírito Santo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 68, p. 329-333, 2003.
- MACIEL, M. V. *et al.* Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses Plant extracts used in the control of dipteran vectors of zoonosis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 105-112, 2010.
- MACORIS, M. L. G. *et al.* Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003.
- MARTINS, L. M. A. Alternativas para o controle biológico do agente transmissor da dengue- *Aedes aegypti* L. **Acervo da Iniciação Científica**, n. 1, 2013.
- MASSEBO, F. Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia African. **Journal of Biotechnology**, v.8, n.17, p. 4183-4188, 2009.
- NASCIMENTO, G. G. F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p.247-56, 2000.
- NERIO, L. S. *et al.* Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 2, p. 372-378, 2010.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Editora Atheneu, 11 ed. São Paulo, 2010.

NOGUEIRA, H. S. *et al.* Antibacterianos: principais classes, mecanismos de ação e resistência. **Unimontes Cientific**, v. 18, n. 2, p. 96-108, 2017.

PADBIDRI, V. S.; GNANESWAR, T. T. Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India. **Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology**, v. 23, n. 4, p. 445-451, 1979.

PONTES, R. J. S. *et al.* Efeito residual de apresentações comerciais dos larvicidas temefos e *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *Aedes aegypti* em recipientes com renovação de água. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 316-321, 2005.

PRAJAPATI, V. *et al.* Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Bioresource technology**, v. 96, n. 16, p. 1749-1757, 2005.

PRATA, Aluizio. Yellow fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 183-187, 2000.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**. v. 29, n. 9, p. 913-920, 2010.

REARDON, S. Antibiotic resistance sweeping developing world: bacteria are increasingly dodging extermination as drug availability outpaces regulation. **Nature: News Infocus**, v.509, n. 7499, p.141-143, 2014.

REGNAULT-ROGER, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 2, n. 1, p. 25-34, 1997.

SANTOS, J. C. *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1557-1564, 2011.

SESAPI – Secretaria de Saúde do estado do Piauí. **Boletim da 52ª Semana Epidemiológica de 2018**. Disponível em: <http://www.saude.pi.gov.br/>. Acesso em 21. Jan. 2019.

SUKUMAR, K.; PERICH, M. J.; BOOBAR, L. R. Botanical derivatives in mosquito control: a review. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, n. 2, p. 210-237, 1991.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p. 281-301, 2000.

TEIXEIRA, J. M. *et al.* Vírus do Genotype Chikungunya do Leste / Centro / Sul Africano, Brasil, 2014. **Emerging Infectious Diseases**. v. 21, n. 5, p. 906-907, 2015.

TINTINO S. R. *et al.* Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociências Brazilian Journal of Biosciences**, v. 11, n. 2, p. 157-162, abr./jun. 2013.

VALOTTO C. F. B. *et al.* Atividade larvicida do ácido 3- β -acetoxilabdan-8(17)-13-dien-15-óico isolado da planta medicinal *Copaifera reticulata* (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) 42 evidenciadas pelas alterações morfohistológicas. **Revista de Patologia Tropical**. v. 43, p. 375-384, 2014.

WÖLWER-RIECK, U. *et al.* Methylerythritol and mevalonate pathway contributions to biosynthesis of mono-, sesqui-, and diterpenes in glandular trichomes and leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 11, p. 2428-2435, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. World Health Organization, 2009.

WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? **BMC biology**, v. 8, n. 1, p. 123, 2010.

ZARA, A. L. S. A. *et al.* Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.



CAPÍTULO I

As Potencialidades da espécie *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae): uma prospecção científica e tecnológica.

**Potentialities of the species *Annona coriacea* Mart.
(Annonaceae): a scientific and technological prospection**

As Potencialidades da espécie *Annona coriacea* Mart. Annonaceae: uma prospecção científica e tecnológica

RESUMO

No Brasil, o gênero *Annona* é um dos gêneros mais representativos da família Annonaceae, apresentando importância significativa devido à presença de metabólitos com propriedades terapêuticas e atividade farmacológica. A espécie *Annona coriacea* se distribui por todas as regiões do Brasil, seus extratos possuem diversas atividades. Os termos *Annona coriacea*, *Annona*, *Annona coriacea and anti**, *Annona coriacea and Aedes aegypti*, "*Annona coriacea and Staphylococcus aureus* foram utilizados como descritores na busca científica e *Annona coriacea*, *Annona* na tecnológica. Foram selecionados apenas os artigos que versavam sobre as atividades biológicas e farmacológicas. A prospecção mostrou que a maioria dos trabalhos realizados utilizam extratos em seus experimentos e que existe uma carência em relação as patentes, com apenas uma descrição sobre a utilização da espécie como ingrediente de um produto alimentício. Os resultados mostram que *Annona coriacea* pode ser promissora no desenvolvimento de biocidas e novos fármacos. O estudo desta espécie poderá fornecer dados que irão contribuir para o avanço biotecnológico, valorização da biodiversidade e a preservação da espécie e de seu ambiente.

Palavras chave: Farmacologia. Extratos. Biocida.

Potentialities of the species *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae): a scientific and technological prospection

ABSTRACT

In Brazil, the genus *Annona* is one of the most representative genera of the Annonaceae family, presenting significant importance due to the presence of metabolites with therapeutic properties and pharmacological activity. The species *Annona coriacea* is distributed in all regions of Brazil, its extracts have several activities. The terms *Annona coriacea*, *Annona*, *Annona coriacea* and anti *, *Annona coriacea* and *Aedes aegypti*, "*Annona coriacea* and *Staphylococcus aureus* were used as descriptors in the scientific search and *Annona coriacea*, *Annona* in the technological. Only articles dealing with biological and pharmacological activities were selected. Prospecting has shown that most of the work done uses extracts in their experiments and that there is a lack of patents, with only a description of the use of the species as an ingredient of a food product. The results show that *Annona coriacea* may be promising in the development of biocides and new drugs. The study of this species could provide data that will contribute to the biotechnological advancement, enhancement of biodiversity and preservation of the species and its environment.

Keywords: Pharmacology. Extract. Biocide.

1 Introdução

A família Annonaceae possui cerca de 135 gêneros e 2.500 espécies com distribuição pantropical (CHATROU *et al.*, 2004). No Brasil são registrados 29 gêneros e 392 espécies distribuídas nos biomas Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado. A Amazônia abriga a maioria das espécies, cerca de 75%, no Cerrado são encontrados apenas 10 gêneros, nenhum deles endêmico, e 47 espécies (MAAS *et al.*, 2013; 2015).

Essa família possui relevante papel econômico (CORRÊA *et al.*, 2008), seus frutos são muito apreciados e consumidos frescos ou processados em preparações como sucos, sorvetes, geleias, compotas, licores e doces (PIMENTA *et al.*, 2013) e do ponto de vista fitoquímico, as plantas dessa família têm sido cada vez mais pesquisadas devido à presença das acetogeninas que possuem atividade citotóxica, antitumoral e pesticida (CHEN *et al.*, 2012) e atuam em modelos celulares inibindo a respiração mitocondrial no complexo I e NADH (MCLAUGHLIN, 2008), bloqueando assim a fosforilação oxidativa mitocondrial resultando em apoptose (CHEN *et al.*, 2011).

No Brasil, o gênero *Annona* é um dos gêneros mais representativos (MAAS, 2009) e apresentam importância significativa devido à presença marcante de metabólitos com propriedades terapêuticas (ALMEIDA; SANTOS, 2018). Muitas espécies desse gênero possuem atividade farmacológica, tais como atividade antinociceptiva (ALMEIDA *et al.*, 2012), ansiolítica, sedativa e também atividade sobre o sistema nervoso central em roedores (DINIZ *et al.*, 2013) antimicrobiana (COSTA *et al.*, 2013), antitumoral e antioxidante (SANTOS *et al.*, 2010), antinociceptiva, anti-inflamatória (SIEBRA *et al.*, 2009; CHAVAN *et al.*, 2010), despertando assim, interesse do setor farmacêutico.

Dentre as espécies do gênero, as mais cultivadas na região tropical, devido aos seus frutos comestíveis, são: *Annona squamosa* L. (fruta-do-conde, ata ou pinha) *Annona muricata* L. (graviola), *Annona reticulata* L (Vell) (condessa) e *Annona cherimola* Mill. (cherimóia), todas essas exóticas. Essas espécies são consideradas importantes devido ao seu valor comercial e suas propriedades nutricionais, podendo ser consumidas tanto na forma in natura, como no preparo de sucos e sorvetes (LORENZI, 2006).

A espécie *Annona coriacea* Mart. é popularmente conhecida por araticum-liso, araticum, araticum-do-campo, marolo, cabeça-de-negro e geograficamente se distribui nas regiões Norte (PA, TO, RO), Nordeste (MA, PI, CE, PB, PE, BA), Centro-Oeste (MT, GO, DF, MS), Sudeste (MG, SP) e Sul (PR). É uma espécie nativa e não endêmica, que ocorre no Cerrado, Pantanal em áreas secas, arenosas e bem drenadas, na Floresta Decidual e na Caatinga

(SAVERESSIG, 2014). O fruto do araticum é consumido pela população e empregado empiricamente para o tratamento de processos inflamatórios (FAGUNDES *et al.*, 2005). Na medicina popular as folhas, na forma de cataplasma, são utilizadas para induzir a supuração de furúnculos e úlceras, as compressas e bochechos no tratamento de estomatites, nevralgias e cefaleias e por via oral são utilizadas como carminativa, estomática, anti-reumática e anti-helmíntica e propriedade analgésica sobre o sistema nervoso central e periférico (SOUSA *et al.*, 2007).

Numerosos estudos científicos confirmam a presença dos compostos secundários e as atividades biológicas de extratos ou compostos isolados de plantas do Cerrado, assim, o objetivo desse estudo foi realizar uma prospecção científica e tecnológica da espécie *Annona coriacea* Mart. a fim de analisar o perfil de produção científica disponível com as atividades biológicas e farmacológicas dessa espécie, bem como, o número de registros de depósitos de patentes, por meio de bancos de inovação e tecnologia nacionais e internacionais.

2 Metodologia

A prospecção científica foi desenvolvida pela busca nos bancos de dados *Pubmed*, *Science Direct*, *Web of Science* e *Periódicos Capes* acerca de publicações sobre a espécie *Annona coriacea* e suas atividades biológicas e farmacológicas nos últimos dez anos (2009 a 2019). A pesquisa foi realizada durante o mês de janeiro a abril de 2019. Como descritores utilizou-se as palavras: “*Annona coriacea*”, “*Annona coriacea and anti**”, “*Annona coriacea and Aedes aegypti*”, “*Annona coriacea and Staphylococcus aureus*” e “*Annona*”

Em relação as bases de dados tecnológicas foram utilizadas os bancos de dados *European Patent Office* (EPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), *Web of Science* e *Banco de Dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial* (INPI) do Brasil. Utilizou-se como descritor o nome da espécie “*Annona coriacea*”. Devido à ausência de patentes com a espécie em estudo, ampliou-se a busca para o gênero “*Annona*” apenas para demonstrar a relevância do gênero no processo de produção de patentes.

3 Resultados e Discussão

Várias substâncias naturais vêm sendo isoladas e testadas com sucesso contra o desenvolvimento de bactérias resistentes a múltiplas drogas (FOUOTSA *et al.*, 2013), compostos secundários das plantas isolados ou em misturas, apresentam atividades larvicida e

inseticida (TEIXEIRA *et al.*, 2014), mais de 50% dos medicamentos anticâncer são derivados de produtos naturais (TWILLEY; LALL, 2018). Nos últimos anos tem crescido o interesse pelo uso de metabólitos de plantas para tratar doenças em humanos e animais (AVATO; ARGENTIERI, 2018), isso reforça a importância dos produtos naturais para a saúde e para a economia. Em face das atividades descritas para plantas da família Annonaceae, em especial para o gênero *Annona*, é de interesse o estudo da espécie *Annona coriacea* Mart. sendo potencialmente viável para geração de conhecimentos científico e tecnológico.

3.1 Prospecção científica

Os resultados obtidos na prospecção científica encontram-se na **Tabela 1**. Foram excluídos os artigos em duplicatas bem como aqueles que utilizavam “*Annona coriacea*” para comparação em resultados/discussão, em outros estudos ou quando este descritor aparecia apenas em listas e tabelas.

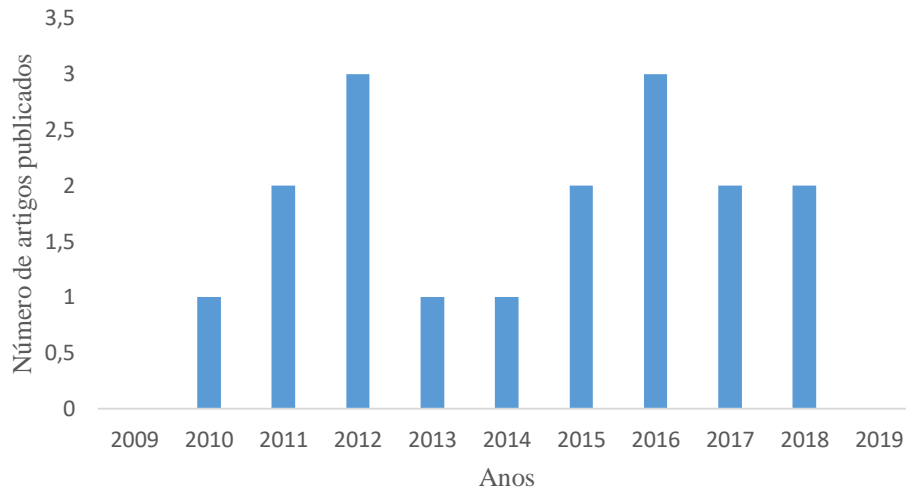
Tabela 01. Publicações científicas nos bancos de dados PubMed, Science Direct, Web of Science e Periódicos Capes.

Descritores	PubMed	Science Direct	Web of Science	Periódicos Capes
<i>Annona coriacea</i>	12	75	29	245
<i>Annona coriacea and anti*</i>	01	14	03	04
<i>Annona coriacea and Aedes aegypti</i>	01	08	01	05
<i>Annona coriacea and Staphylococcus aureus</i>	02	06	02	04
<i>Annona</i>	484	1.303	1.292	3.214

Fonte: Autor (2019).

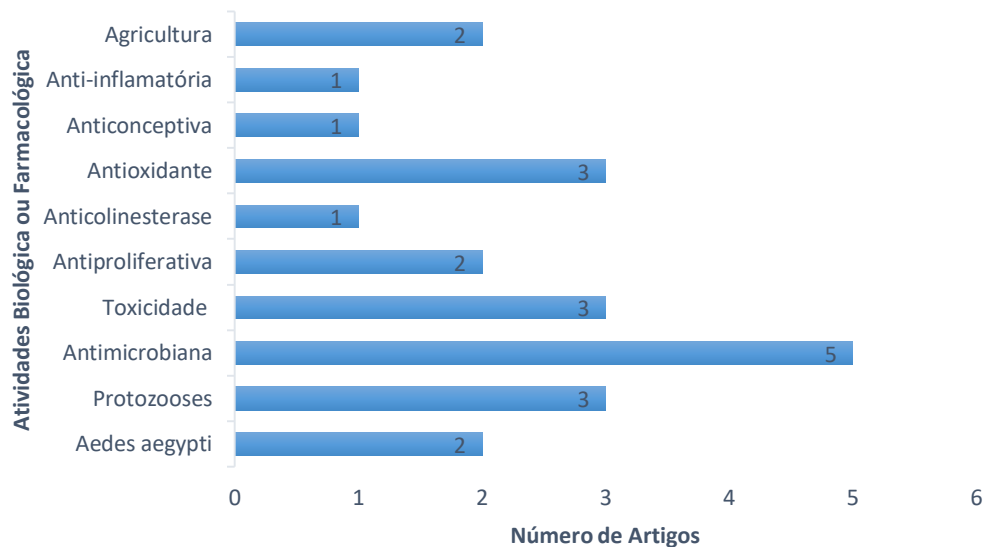
Após análise, foram considerados válidos, apenas 17 artigos, que versavam sobre as atividades biológicas e farmacológicas da espécie nos últimos dez anos (2009-2019) (**Gráfico 1**). Os estudos descrevem a importância da espécie no combate a vetores de doenças, a microrganismos patogênicos e atividades antiproliferativa, antioxidante, anticolinesterásica e citoprotetora como mostra o **Gráfico 2**.

Gráfico 1. Número de publicações científicas sobre atividade biológicas e farmacológicas da espécie *Annona coriacea* Mart. no período 2009-2019.



Fonte: Autor (2019).

Gráfico 2. Atividades Biológicas e farmacológicas descritas para *Annona coriacea* Mart.



Fonte: Autor (2019).

Em um estudo realizado por Costa *et al.* (2012), os autores relatam a observação de alterações morfológicas no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*, causados pelos extratos metanólicos das sementes de *Annona coriacea* – as larvas expostas ao extrato apresentaram vacuolização citoplasmática intensa e destruição das células intestinais colunares e regenerativas. As superfícies apicais das células colunares exibiram protrusões citoplasmáticas

orientadas em direção ao lúmen, sugerindo que essas células poderiam estar envolvidas em processos secretórios apócrinos e / ou apoptose. Dill *et al.* (2012) analisaram o efeito residual do extrato etanólico das sementes de *A. coriacea* sobre as larvas, pupas e adultos do mosquito e observaram que, em condições ambientais, o extrato (100ppm) apresentou efeito residual de 15 dias sobre as larvas, porém a efetividade sobre a mortalidade de pupas e adultos foi baixa. Na concentração de 50 ppm a mortalidade das larvas foi de 100%, duante 8 dias. Esses estudos demonstram a eficácia do uso de extratos vegetais de *A. coriacea* para o controle do vetor da dengue, podendo ser utilizado como um método alternativo.

O óleo volátil das folhas apresentou atividade anti-leishmanial e tripanocida contra promastigotas de quatro espécies de *Leishmania* e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, mostrando-se mais ativas contra *Leishmania (L.) chagasi* (IC₅₀ 39,93 µg / ml) essa ação é atribuída a uma possível ação sinérgica entre compostos sesquiterpênicos e monoterpenos encontrados no óleo (SIQUEIRA *et al.*, 2010). Em *Rhodnius neglectus*, hospedeiro do *Trypanosoma cruzi*, o extrato etanólico das sementes, nas concentrações de 100 e 200 mg/mL, provocou uma mortalidade de 100% dos insetos, interrompeu o desenvolvimento de ninfas e adultos, reduziu as taxas de fecundidade e fertilidade, provocou dissuasão alimentar e causou alterações morfológicas nas ninfas e nos adultos (CARNEIRO *et al.*, 2013), apresentando também toxicidade contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IC 50175 µg / ml) (TOLEDO *et al.*, 2011).

Segundo José-Junior *et al.* (2016) o extrato hidroetanólico de *A. coriacea* Mart. possui atividade inibitória contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (MIC \geq 512 µg/mL) porém, ação antagônica significativa na modulação de aminoglicosídeos. No mesmo estudo foi observado que o extrato também apresentou atividade citoprotetora significativa ($P < 0,0001$ e $P < 0,05$) em cepas de *S. aureus* e *E. coli* contra cloreto de mercúrio (HgCl₂), atribuídos a presença dos flavanoides. Os dados obtidos indicam o produto como fonte promissora no combate aos metais pesados, apresentando-se como protetores de seres procarióticos, no combate a bactérias, mas reforçando a necessidade de cautela na combinação de produtos naturais e farmacêuticos. Toledo *et al.* (2011), utilizando extrato de folhas, obtidos a partir da cachaça, não observou atividade inibidora contra cepas bacterianas *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Bacillus subtilis*.

Os extratos etanólicos da casca e das folhas de *A. coriacea* mostraram atividade inibitória e reduziram o crescimento fúngico das espécies de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* (ALMEIDA-APOLONIO *et al.*, 2018), *Candida albicans* e *Candida*

parapsilasis (TOLEDO *et al.*, 2011) sugerindo que esta planta pode ser uma alternativa eficaz contra esses microrganismos.

O trabalho realizado por Toledo *et al.* (2011), é uma triagem antimicrobiana, nesse trabalho os extratos foram analisados também quanto à atividade antiviral. O modelo biológico escolhido foi o poliovírus (gênero Enterovirus pertencente à família Picornaviridae, vírus sem envelope), responsável pela poliomielite humana. O extrato de *A. coriacea* não apresentou potencial antiviral. Entretanto, em um outro estudo realizado por Brandão *et al.* (2011) os extratos etanólicos dos frutos e sementes de *A. coriacea* apresentaram elevada toxicidade em células cultivadas para atividade antiviral, incluindo o polivírus. O estudo também demonstrou que não ocorreu toxicidade contra eritrócitos humanos.

Nascimento *et al.* (2012) investigaram a toxicidade *in vivo* do extrato etanólico das sementes de *A. coriacea* sobre rins, fígado e cérebro de camundongos Swiss machos e observou alterações significativas no fígado, que mostraram redução no número de hepatócitos por área e aumento do índice apoptótico, além de alterações no citoplasma e no núcleo dessas células e também uma redução do consumo de água e ração nesses animais. Para o cérebro e os rins não foram observadas alterações. Os extratos metanólicos do caule e das folhas de *A. coriacea* foram altamente tóxicos sobre *A. salina* (NOVAES *et al.*, 2016), de acordo com Rosa *et al.* (2016) a letalidade de uma substância sobre esses microcrustáceos é considerado um excelente teste para ser empregado como *pré-screening* em investigação de atividade terapêutica contra tumores sólidos.

Extratos metanólicos de sementes de *A. coriacea* avaliados por Formagio *et al.* (2015) exibiram amplos efeitos antiproliferativos, inibindo linhagens celulares de vários tipos de câncer, incluindo UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI / ADR / RES (tumor ovariano expressando o fenótipo de resistência múltipla a medicamentos), 786-0 (renal), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon), K562 (leucemia) e UA251 (glioma), com diferentes potenciais. Geralmente, as sementes são mais ativas que as folhas, porém, extratos de folhas de *A. coriacea* exerceram altas taxas de inibição contra NCIH460 e NCI / ADR / RES, com valores de atividade inibitória do crescimento (GI 50) de 0,02 e 0,10 µg / mL (TUNDIS *et al.*, 2017; FORMAGIO *et al.*, 2015).

Segundo Formagio e colaboradores (2015), os extratos (da semente e das folhas) de *A. coriacea* além de possuírem propriedades antiproliferativas também possuem atividade anticolinesterásicas, com a porcentagem de inibição de AchE variando de 12 a 52%, o que abre novas possibilidades para fármacos farmacoterapêuticos alternativos.

A atividade antioxidante é descrita por Benites *et al.* (2015), eles observaram que o extrato hidrometanólico das sementes de *A. coriacea* apresentou alto teor de fenóis totais ($147,08 \pm 4,20$ mg de GAE / g de extrato) e flavonóides totais ($131,18 \pm 2,31$ mg de QE / g de extrato) e relacionaram essa atividade ao alto teor desses constituintes. Camilo *et al.* (2017), também relataram a atividade antioxidante de extratos florais, dessa espécie e relacionam a ação ao teor de polifenóis. Ao estudar flavanoides isolados das folhas dessa espécie, Novaes *et al.* (2018) também observou uma elevada atividade oxidante.

Estudos tem demonstrado também, a importância dessa espécie para a Agricultura. O extrato metanólico das folhas apresentou bom teor de flavonoides e fenóis e diminuiu a sobrevivência das larvas, interrompeu o desenvolvimento das pupas e afetou o ganho de peso de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), que causam perdas significativas nas culturas de milho, indicando potencial para desenvolvimento de inseticidas botânicos (FREITAS *et al.*, 2014). Os extratos aquosos e metanólicos das folhas também mostraram eficácia no controle de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), considerada o principal agente causador de danos a plantas em plantios comerciais em todo o mundo, devido a sua alta taxa de alimentação durante o período larval o que causa danos substanciais às lavouras. (COUTO *et al.*, 2016).

3.2 Prospecção tecnológica

Para os pedidos de patentes, observou-se, de modo geral, uma ausência de registro de patentes com a espécie *Annona coriacea*, uma única exceção é observada no *Web of Science*. Para o gênero *Annona* ocorre um número maior de patente, especialmente para a espécie *Annona muricata* L. (graviola) e *Annona squamosa* L. (ata), o que evidencia a importância desse gênero. (**Tabela 2**).

Tabela 02. Publicações tecnológicas nos bancos de dados INPI, Web of Science, EPO, USPTO.

Descritores	INPI	Web of Science	EPO	USPTO
<i>Annona coriacea</i>	0	1	0	0
<i>Annona</i>	04	198	91	12

Fonte: Autor (2019).

A maior quantidade de patentes relacionadas ao gênero *Annona* estão depositadas na China (CN), Japão (JP) e Estados Unidos (US).

A patente BR201106468-A2, que relata a espécie *Annona coriacea*, foi publicada no dia 28 de julho de 2015, no *Instituto Nacional de Propriedade Industrial* (INPI), foi depositada por inventores brasileiros do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e se refere a um produto alimentício feito à base de extrato amargo de gengibre e que contém como um dos seus ingredientes polpa do fruto de *Annona coriacea*.

4 Conclusão

Muitas espécies de plantas da família Annonaceae e em específico do gênero *Annona* possuem diversas classes de metabólitos secundários os quais têm apresentado importantes atividades biológicas. Os resultados demonstram que a maioria dos estudos realizados utilizam os extratos brutos, especialmente das sementes.

Os resultados obtidos são de extrema relevância e mostram que a espécie pode ser promissora, principalmente para a saúde pública, medicina, farmacologia e agricultura. O estudo desta espécie poderá fornecer dados que irão contribuir para o avanço biotecnológico, valorização da biodiversidade e preservação da espécie e de seu ambiente.

Referências

- ALMEIDA, J. R. G. S. *et al.* Antinociceptive activity of ethanol extract from *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- ALMEIDA, A. S.; SANTOS, A. F. Flavonoids of the genus *Annona*. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 475-485, 2018.
- ALMEIDA-APOLONIO, A. A. D. *et al.* Antifungal activity of *Annona coriacea* Mart. ethanol extracts against the aetiological agents of cryptococcosis. **Natural Product Research**, 1-5, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1440221>
- AVATO, P.; ARGENTIERI, M. **Phytochem Revist.** 17: 645, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9549-1>.
- BENITES, R.S.R. *et al.* Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. **Brazilian Journal of Biology**, 75(3), pp.685-691, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.21313>
- BRANDÃO, G. C. *et al.* Antiviral activity of plants occurring in the state of minas gerais (Brazil): Part III. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 223-236, 2011.
- CAMILO, J. C. *et al.* Chemical Research and Evaluation of the Antioxidant Activity of the Flowers of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). **Current Bioactive Compounds**, 13(1), 66-70, 2017.
- CARNEIRO, Â. P. *et al.* Biocide activity of *Annona coriacea* seeds extract on *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae). **Revista de Biologia Tropical**, 61(1), 419-427, 2013.
- CHATROU, L. W. *et al.* Annonaceae. In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S. V (Ed.). **Flowering plants of the neotropics**. New York: Princeton University Press.p. 18-20, 2004.
- CHAVAN, M. J. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 149-151, 2010.
- CHEN, Bing-Hung *et al.* Anonaine induces DNA damage and inhibits growth and migration of human lung carcinoma h1299 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2284-2290, 2011.
- CHEN, Y. *et al.* Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 462-466, 2012.
- CORRÊA, P. G. *et al.* Caracterização morfoantômica foliar de *Annona crassiflora* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1 816-818, 2008.
- COSTA, E. V. *et al.* Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmännii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. **Natural Product Research**, v. 27, n. 11, p. 997-1001, 2013.
- COSTA, M. S. *et al.* Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae)

extract. *Neotropical entomology*, 41(4), 311-314, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13744-012-0050-z>

COUTO, I. F. *et al.* Feeding preference of *Plutella xylostella* for leaves treated with plant extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 88(3), 1781-1789, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620150236>

DILL, E. M. *et al.* Residual effect of *Annona coriacea* extract on *Aedes aegypti*. **Arquivos do Instituto Biológico**, 79(4), 595-602, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1808-16572012000400017>

DINIZ, T. C. *et al.* Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, n. 37, p. 2729-2735, 2013.

FAGUNDES, F. A. *et al.* *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 24-29, 2005.

FORMAGIO, A.S.N. *et al.* In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 48(4), pp.308-315, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20144127>

FOUOTSA, H. *et al.* Antibacterial constituents of three Cameroonian medicinal plants: *Garcinia nobilis*, *Oricia suaveolens* and *Balsamocitrus camerunensis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 81, p. 1-10, Apr. 2013. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-81>

FREITAS, A. F. *et al.* Effects of methanolic extracts of *Annona* species on the development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical entomology**, 43(5), 446-452, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s13744-014-0225-x>

JOSÉ -JUNIOR, G. A. S. *et al.* Chemical characterization and cytoprotective effect of the hydroethanol extract from *Annona coriacea* Mart. (Araticum). **Pharmacognosy research**, 8(4), 253, 2016. <http://dx.doi.org/10.4103/0974-8490.188882>.

LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 44, 2006.

MAAS, P. *et al.* Annonaceae In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB117067>. Acesso em: 18 jan.2019.

MAAS, P. J. M. *et al.* Annonaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil>. Acesso em: 20 jan. 2019.

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.

MCLAUGHLIN, J. L. Paw paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 7, p. 1311-1321, 2008.

NASCIMENTO, G. N. L. D. *et al.* Investigation of the toxic potential of crude ethanol extract of *Annona coriacea* (araticum) seeds in acute exposed mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 22(3), 580-586, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000015>

NOVAES, P. *et al.* Biological activities of Annonaceae species extracts from Cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, 39(1), 131-13, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s40415-015-0225-z>

NOVAES, P. *et al.* Flavonols from *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 78, 77-80, 2018.

PIMENTA, A. C. *et al.* Morphological characterization of fruits, seeds and seedlings of araticum plant (*Annona crassiflora* Mart-Annonaceae). **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 4, p. 524-531, 2013.

ROSA, C. S. *et al.* Chemical composition and toxicity against *Aedes aegypti* L. and *Artemia salina* Leach of the essential oil from *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 18(1), 19-26, 2016. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_006

SANTOS, L. A. A. *et al.* Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1129 –1138, 2010.

SAVERESSIG, D. **Plantas do Brasil: árvores nativas**. 1 ed. Irati, PR: Editora Plantas do Brasil, v.1, p. 36, 2014.

SIEBRA, C. A. *et al.* Potencial anti-inflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 82 - 88, 2009.

SIQUEIRA, C. A. *et al.* Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and in vitro antiprotozoal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 21(1), pp.0-0., 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000004>

SOUSA, O. V. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) leaves methanol extract. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 872-877, 2007.

TEIXEIRA, A. H. *et al.* Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Cobral-Ceará, Brasil. SANARE- **Revista de Políticas Públicas**, v. 13, n. 1, p. 2328, 2014.

TOLEDO, C. E. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, 133(2), 420-425, 2011.

TUNDIS R. *et al.* *Annona* species (Annonaceae): a rich source of potential antitumor agents? **Annals of the New York Academy of Sciences**. Jun;1398(1):30-6, 2017. <https://doi.org/10.1111/nyas.13339>

TWILLEY, D.; LALL, N. The role of natural products from plants in the development anticancer agents. *In: Natural Products and Drug Discovery* (pp. 139-178), 2018. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102081-4.00007-1>



CAPÍTULO II

Estudo comparativo da composição fitoquímica e atividade antioxidante dos extratos etanólico e hexânico de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae)

Comparative study of the phytochemistry composition and antioxidant activity of the ethanolic and hexane extracts of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae)

Estudo comparativo da composição fitoquímica e atividade antioxidante dos extratos etanólico e hexânico de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae)

RESUMO

Annona coriacea é uma planta típica do Cerrado, cujos frutos são utilizados para fins alimentícios, e as folhas e sementes para fins medicinais. O presente estudo foi realizado com o objetivo de investigar o efeito dos solventes etanol e hexano sobre o rendimento, conteúdo fitoquímico e atividade antioxidante de folhas de *Annona coriacea*. Amostras de folhas foram testadas por meio de curvas de calibração, com padrões específicos para determinação de fenóis totais (TPC), flavonóides (TFC), taninos hidrolisados (THC), taninos condensados (TCC) e atividade antioxidante *in vitro* pelo ensaio de DPPH e pelo ensaio ABTS^{•+}. O EEAC apresentou maior rendimento (9,71%) e quantificação dos fitoquímicos TPC ($52,16 \pm 3,5$ mgGA.g⁻¹); TFC ($99,6 \pm 3,2$ mg / Eg⁻¹); THC ($17,78 \pm 0,0$ mgTA.g⁻¹) e TCC ($18,17 \pm 0,0$ mgCE.g⁻¹) e maior atividade antioxidante. Já o EHAC apresentou menor desempenho em rendimento, teor fitoquímico e atividade antioxidante. Esses achados mostram uma maior eficiência do solvente polar (etanol) na recuperação de fitoquímicos e na eliminação de radicais livres, podendo subsidiar estudos futuros.

Palavras chaves: Efeitos do solvente. Conteúdo fitoquímico. Sequestro de DPPH. Ensaio ABTS. Annonaceae.

Comparative study of the phytochemistry composition and antioxidant activity of the ethanolic and hexane extracts of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae)

ABSTRACT

Annona coriacea is a typical plant of the Cerrado, whose fruits are used for food purposes, and the leaves and seeds for medicinal purposes. The present study was carried out with the objective of investigating the effect of solvents ethanol and hexane on yield, phytochemical content and antioxidant activity of *A. coriacea* leaves. Leaf samples were tested by means of calibration curves, with specific standards for determination of total phenols (TPC), flavonoids (TFC), hydrolyzed tannins (THC) and condensed tannins (TCC) and in vitro antioxidant activity by DPPH and ABTS +. The EEAC presented higher yield (9.71%) and quantification of the phytochemicals TPC (52.16 ± 3.5 mgGA.g⁻¹); TFC (99.6 ± 3.2 mg / QEG⁻¹); THC (17.78 ± 0.0 mgTA.g⁻¹) and TCC (18.17 ± 0.0 mgCE.g⁻¹). While EHAC showed lower performance in yield, phytochemical content and antioxidant activity. These findings show a higher efficiency of the polar solvent (ethanol) in the recovery of phytochemicals and in the elimination of free radicals, and may support future studies.

Keywords: Solvent effects. Phytochemical contents. DPPH scavenging. ABTS assay. Annonaceae.

1 INTRODUÇÃO

As plantas são fontes de agentes terapêuticos, largamente utilizadas para a prevenção e tratamento de inúmeras doenças e enfermidades compondo cerca de 60% dos produtos farmacêuticos (Pan *et al.*, 2013). O estresse oxidativo tem sido relacionado ao desenvolvimento de várias fisiopatologia entre elas o câncer, doenças cardíacas e as doenças neurodegenerativas como Alzheimer, assim como ao processo inflamatório e ao envelhecimento (Carvalho *et al.*, 2018). Ele resulta de um desequilíbrio entre a formação e a neutralização dos radicais livres (Mc Cord, 2000), podendo ser compensado pela suplementação com antioxidantes naturais (Birben *et al.*, 2012).

Vitaminas, flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, são os principais fitoquímicos responsáveis pelas propriedades redutoras de radicais livres (Carvalho *et al.*, 2018). Isso ocorre por que os metabólitos secundários nas plantas desempenham funções adaptativas ao meio ambiente e protetoras contra fitopatógenos, o que tem despertado o interesse nas suas propriedades medicinais em composições farmacológicas (Pinho *et al.*, 2016). A ênfase em estudos por antioxidantes naturais tem crescido muito nos últimos anos. Substâncias que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos bem como flavonoides, taninos e esteróis (BERNARDES *et al.*, 2010).

A espécie *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae), conhecida popularmente como “araticum”, ou “marolo”, está bastante distribuída no Cerrado, onde sua fruta é consumida in natura (Paulino-Neto, 2014). Suas folhas são utilizadas na medicina tradicional no tratamento de feridas, de estomatites, nevralgias e reumatismo (Sousa, Delvechio-Vieira, Kaplan, 2007). Os fenóis presentes nos extratos hidrometanólicos da polpa e das sementes dessa espécie foram correlacionados à atividade antioxidante (Benites *et al.*, 2015).

O rendimento dos antioxidantes varia conforme sua solubilidade no solvente utilizado, tempo de extração, natureza química e polaridade dos fitoquímicos (Bellassouad, Feki, Ayadi, 2015; Thavamoney *et al.*, 2018; Sepahpour *et al.*, 2018). Os polifenóis são melhor extraídos com solventes polares, como o etanol (Ignat, Volf, Popa, 2011) que também é o mais indicado para aplicações medicinais e alimentares (Do *et al.*, 2014).

O potencial redutor de um extrato vegetal está associado à metodologia extrativa e ao tipo de solvente utilizado (Komes *et al.*, 2011; Felhi *et al.*, 2017). Dentre as diversas técnicas para recuperação de fitoquímicos vegetais, a maceração com solventes de diferentes polaridades é uma das mais simples e utilizadas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi comparar o

efeito dos solventes etanol e hexano no conteúdo fitoquímico e na atividade antioxidante das folhas de *Annona coriacea* Mart. utilizando o método de maceração.

2 METODOLOGIA

2.1 Preparo dos Extratos

Folhas de *Annona coriacea* Mart. foram coletadas no Piauí (Cerrado Setentrional), município de Campo Maior, coordenadas S 05° 02' 51.7" W 42° 46' 57.3" altitude 98 m, em 11 de março de 2017. O exemplar foi incorporado ao acervo do Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob o número de exsicata TEPB 30.764.

As folhas foram submetidas ao processo de secagem à temperatura ambiente em local arejado, em seguida moídas, em moinho de facas e submetidas ao procedimento de extração por maceração com renovação de solvente a cada três (3) dias por duas vezes consecutivas, com hexano e etanol sucessivamente. Posteriormente, os extratos foram concentrados em um rotaevaporador e mantido refrigerados (-5 ° C) em frasco âmbar, até o momento da utilização.

2.2 Triagem Fitoquímica

Testes qualitativos foram realizados conforme metodologia proposta por Soares *et al.* (2016) e Yusuf *et al.* (2014) para detecção dos metabólitos secundários nos extratos etanólico (EEAC) e hexânico (EHAC) das folhas de *Annona coriacea* Mart. Os testes se baseiam na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

2.3 Conteúdo Fitoquímico

2.3.1 Determinação do Conteúdo de Fenóis (TPC)

O teor total de fenóis nos extratos foi determinado pelo método Swain e Hills, (1959), usando o reagente de Folin-Ciocalteu. Os EEAC e EHAC (0,5 mL) foram adicionados em tubo de ensaio com 8 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin Ciocalteu. A solução foi homogeneizada e, após 3 min, acrescentou-se 1 mL de solução saturada de Na₂CO₃. Após 1 hora de repouso a absorbância da amostra foi lida a 725 nm. O ácido gálico foi usado como padrão. A quantidade de conteúdo fenólico foi expressa em mg de ácido gálico por grama de extrato (mg GA.g⁻¹).

2.3.2 Determinação do Conteúdo de Flavonoides (TFC)

O conteúdo total de flavonoides foi medido pelo ensaio colorimétrico de cloreto de alumínio. A mistura reacional consistiu em adicionar 4 mL de água destilada a 1 mL de extrato (EEAC e EHAC), seguida da adição de 0,3 mL de NaNO_3 a 5%. Após 5 minutos, misturaram-se 0,3 mL de AlCl_3 a 10%. Passados 5 minutos, acrescentou-se 2 mL de NaOH 1M e completou-se o volume com água destilada. A absorbância da amostra foi lida a 510 nm. Os resultados foram expressos em mg de quercetina g^{-1} (mg QE.g⁻¹) dos extratos, obtidos por interpolação em uma curva de calibração (Tambe, Bhambar, 2014).

2.3.3 Determinação do conteúdo de Taninos Hidrolisáveis (THC)

Os taninos foram determinados pelo método de Folin - Ciocalteu. Cerca de 0,1 mL dos extratos da amostra foram adicionados a 5 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, 1 mL de solução Na_2CO_3 a 20% e diluído a 10 mL com água destilada. A mistura foi bem agitada e mantida temperatura ambiente durante 30 min. Absorbância para teste e soluções padrão foram medidas contra o branco em 725 nm com um espectrofotômetro UV / Visível (Tambe; Bhambar, 2014). O ácido tânico foi usado como padrão. O teor de tanino foi expresso em mg de ácido tânico por grama de extrato (mgTA.g⁻¹), obtido por interpolação em uma curva de calibração.

2.3.4 Determinação do conteúdo de Proantocianidinas / Taninos Condensados (TCC)

O teor de proantocianidina foi determinado pelo método de Broadhurst & Jones (1978). Os EEAC e EHAC (1,0 ml) diluídos foram misturados com 3 ml de solução de vanilina-metanol (2%) e 1,5 ml de H_2SO_4 a 70%. A absorbância foi registrada a 500 nm. A catequina foi utilizada como composto padrão e os resultados foram expressos em mg por grama de extratos (mg.CE.g⁻¹).

2.4 Ensaio de atividade antioxidante

2.4.1 Ensaio de DPPH

Para realização das análises, adicionou-se 1,5 mL da solução etanólica do radical DPPH[•] ($6 \times 10^{-5} \text{M}$) e uma alíquota de 0,5 mL das amostras contendo diferentes concentrações de cada extrato. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 517 nm, após 30 minutos do início da reação. As determinações foram feitas em triplicata acompanhada de um controle negativo (sem antioxidante) e dois controles positivos (padrões: ácido ascórbico e Trolox®, natural e sintético respectivamente).

A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle (somente o radical), estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), conforme a fórmula a seguir: **% de inibição do radical DPPH•** = $[(A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$, onde A é absorvância, conforme metodologia proposta por Brand-Williams *et al.*, (1995) e Vieira *et al.* (2011). A taxa de eliminação de 50% do radical DPPH• (EC₅₀) foi calculado graficamente usando uma curva de calibração na faixa linear pela plotagem da concentração dos extratos versus o efeito de sequestro correspondente.

2.4.2 Ensaio ABTS

O radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio, sendo reservados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 12-16 horas. Transcorrido esse período, a solução foi diluída em etanol PA até obter-se uma solução com absorvância de 0,70 (± 0,01). Adicionou-se 40 µL das amostras diluídas (em etanol) a 1960 µL da solução contendo o radical, determinando-se a absorvância em espectrofotômetro a 734 nm, após 30 minutos de reação (Re *et al.*, 1999). Como a solução padrão, utilizou-se o antioxidante sintético Trolox® análogo da vitamina E. A reação para sequestrar os radicais catiônicos das amostras foi monitorada a 734 nm e os resultados foram expressos como milimol de equivalentes de Trolox® por grama de extrato seco (mM AAET.g⁻¹) pela curva padrão do Trolox®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento de extração

A partir de 200g de massa do pó das folhas, obteve-se 15,955g de extrato hexânico de *Annona coriacea* Mart. (EHAC), que expressa um rendimento de aproximadamente 7,98% e uma massa de 19,4223g de extrato etanólico de *Annona coriacea* Mart. (EEAC), que expressa um rendimento de aproximadamente 9,71%, conforme descrito na **Tabela 1**.

O maior rendimento foi obtido pelo extrato etanólico. Essa diferença pode ser atribuída à maior solubilidade de bioativos extraíveis nesse solvente, bem como à diferença de polaridade dos solventes (Silva *et al.*, 2014; Naima *et al.*, 2015).

3.2 Análise Fitoquímica

Em ambos os extratos foram identificados os mesmos constituintes fitoquímicos, diferindo apenas na ausência de saponinas no extrato etanólico, como mostra a **Tabela 2**.

Tabela 1 - Massa das folhas, massa e rendimento dos extratos etanólico (EEAC) e hexânico (EHAC) de *Annona coriacea* Mart.

Extratos	Massa das folhas (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento do extrato total (%)
EHAC	200g	15,955g	7,98%
EEAC	200g	19,4223g	9,71%

Fonte: Autor (2019).

3.3 Efeito da extração de solvente no conteúdo fitoquímico dos extratos

A análise fitoquímica mostrou que o EEAC apresentou maior teor de fenóis totais (TPC), flavonóides (TFC), taninos hidrolisados (THC) e taninos condensados (TCC) quando comparado ao EHAC (**Tabela 2**). A maior presença de fitoquímicos em solventes polares prótico, como o etanol, também foi observada por Felhi *et al.* (2017).

Tabela 2- Composição do fitoquímica dos extratos etanólico (EEAC) e hexânico (EHAC) de *Annona coriacea* Mart.

Classe de metabólito	Reações	EHAC	EEAC
Taninos	cloreto férrico a 10%.	+	++
Saponinas	formação de espuma	++	-
Alcalóides	Dragendorff	+	+
Flavonóides	AlCl ₃ 10%	+	+
Triterpenos/esteroides	Liebermann-Burchard	+	+
Antraquinonas	Borntreger	-	-
Cumarinas	NaOH 10%	+	+

Ausência (-) Presença (+) Muito expressivo (++)

Fonte: Autor (2019).

Os compostos fenólicos são conhecidos como poderosos antioxidantes devido à sua capacidade sequestradora de radicais livres, de oxigênio singlete e de radicais superóxido,

atribuídas aos grupos hidroxila presentes em seu anel (Farahmandfar *et al.*, 2019). A extração de compostos fenólicos depende do método aplicado a extração e das características do solvente aplicado, onde esses interagem com o soluto através de interações dipolo (Naczki, Shahidi, 2006; Chisté, Benassi, Mercadante, 2011).

Foi relatado que a eficiência de extração depende da afinidade entre o solvente e os grupos fenólicos (Hayouni, 2007; Ignat, Volf, Popa, 2011). Em nosso estudo o TPC dos extratos foi obtido através da curva padrão ($Y = 0,0057473X + 0,1404$ e $r^2 = 0,9988$) e expresso como equivalentes de ácido gálico (**Tabela 3**). O EEAC expressou um conteúdo mais elevado de TPC ($52,16 \pm 3,5$ mg GA.g⁻¹) e o EHAC apenas $13,80 \pm 2,5$ mg GA.g⁻¹.

As concentrações de fenóis do EEAC determinadas nesse estudo (**Tabela 3**) estavam bem próximas às obtidas por Benites *et al.* (2015) com o extrato hidrometanólico da polpa de *A. coriacea* ($57,67 \pm 1,16$ GAE.g⁻¹). Porém a TPC do EHAC foi bem menor quando comparada aos achados no mesmo estudo. O extrato etanólico das folhas de *Annona vepretorum* Mart. apresentaram TPC de $76,60 \pm 5,57$ GA.g⁻¹, enquanto que suas frações apolares, hexânica e clorofórmica apresentaram valores bem menores, esses resultados se assemelham aos encontrados em nosso trabalho com os extratos de *A. coriacea* (Almeida *et al.*, 2014).

Tabela 3. Teor de Fenóis (TPC), Flavanoídes (TFC), Taninos Hidrolissáveis (THC) e Taninos Condensados (TCC) dos extratos etanólicos (EEAC) e hexânico (EHAC) das folhas de *Annona coriacea*. Mart.

Amostras	mgGA.g ⁻¹ de amostra	mgQE.g ⁻¹ de amostra	mgTA.g ⁻¹ de amostra	mgCE.g ⁻¹ de amostra
EHAC	13,80 ± 2,5	15,2 ± 0,2	5,64 ± 0,0	nd
EEAC	52,16 ± 3,5	99,6 ± 3,2	17,78 ± 0,0	18,17 ± 0,0

GA: equivalente de ácido gálico; QE: equivalente de quercetina; TA: equivalente de ácido tânico; CE: equivalente de catequina. ± desvio padrão da média, n=3. Intervalo com 95% de confiança; nd: não determinado.

Fonte: Autor (2019).

Outro composto fenólico quantificado nos extratos das folhas foram os flavonóides. Esses compostos também apresentam efeitos antioxidantes atribuídos aos números e à posição das hidroxilas em suas estruturas, que influenciam na capacidade de quelação de íons metálicos, capacidade de eliminação de radicais livres e interação com funções enzimáticas (Farahmandfar *et al.*, 2019). O TFC foi obtido através da curva padrão da quercetina ($Y = 0,0008782X +$

0,005544 e $r^2 = 0,9901$) (**Tabela 3**). EEAC expressou um conteúdo bem mais elevado de TFC com $99,6 \pm 3,2$ (mg QE.g⁻¹) e o EHAC com apenas $15,2 \pm 0,2$ (mg QE.g⁻¹).

Em relação ao conteúdo de flavonóides obtidos por Justino *et al.* (2018) com o extrato etanólico de *Annona muricata* L. ($20,6 \pm 2,4$ mg g⁻¹) os EEAC e EHAC apresentaram maior TFC. Nossos resultados também foram superiores ao TFC encontrados na polpa ($24,38 \pm 2,45$ mgQE.g⁻¹) de *A. coriacea*, porém inferiores ao obtido nas sementes ($131,18 \pm 2,31$ mgQE.g⁻¹), por Benites *et al.* (2015).

Além de fenóis simples e flavonoides, taninos também são considerados compostos fenólicos e são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados, este último, também designados como proantocianidinas e mais abundante nos vegetais (Sousa *et al.*, 2007; Smeriglio *et al.*, 2017).

O conteúdo de THC encontrado foi muito baixo, e maior no EEAC que no EHAC (Tabela 02). A partir da curva de calibração do ácido tânico ($Y = 0,001187X + 0,01394$ e $r^2 = 0,9959$) foi determinado o conteúdo de THC no EEAC ($17,78 \pm 0,0$ mgTA.g⁻¹) e no EHAC ($5,64 \pm 0,0$ mgTA.g⁻¹). O TCC foi determinado a partir da curva de calibração da catequina ($Y = 0,001388X + 0,01304$ e $r^2 = 0,9916$) com resultados apenas no EEAC ($18,17 \pm 0,0$ mgEC.g⁻¹). O TCC foi determinado apenas no EEAC. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da polimerização de taninos com as hidroxilas de solventes polares (Felhi *et al.*, 2017).

Bryan-Thomas (2016) obteve o equivalente a $75,48 \pm 0,1$ mgTA.g⁻¹ em THC nos extratos aquoso das folhas de *A. muricata*. Benites *et al.* (2015) obteve um TCC próximos ao EEAC, com os extratos hidrometanólico das polpas de *A. coriacea* ($17,43 \pm 1,08$ mgCE.g⁻¹) e *A. sylvatica* ($15,68 \pm 2,04$ mgCE.g⁻¹) e valores superiores nas sementes ($45,76 \pm 0,97$ e $53,31 \pm 1,01$ mgCE.g⁻¹), destas espécies respectivamente.

3. 4 Efeito da extração de solvente nas atividades antioxidantes dos extratos

Os radicais livres são moléculas com um elétron desemparelhado e estão envolvidos em processos inflamatórios, infecções bacterianas e parasitárias, câncer e doenças neurodegenerativas (Gangwar *et al.*, 2014). Nossos resultados mostram que os extratos das folhas de *A. coriacea* possuem atividade sequestradora de radicais como o DPPH[•] e o ABTS^{•+}.

A atividade antioxidante dos extratos de *A. coriacea* utilizando o método de captura dos radicais DPPH está apresentada na **Tabela 4**. Os resultados foram expressos em CE₅₀ (concentração de extrato em µg. mL⁻¹ capaz de reagir com 50% do radical presente na solução de DPPH). O EEAC apresentou uma CE₅₀ moderada ($77,1 \pm 3,7$ µg.mL⁻¹), quando comparada

com os padrões antioxidantes ácido ascórbico e Trolox, no entanto o EHAC foi menos efetivo e apresentou uma alta CE_{50} ($1058 \pm 4,4 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

Tabela 4. Concentração eficaz para inibir 50% do radical DPPH^{*} (CE_{50}) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox®.

Amostras	$CE_{50} \mu\text{g/mL}$	mM Trolox.g ⁻¹ de amostra
EHAC	$1058 \pm 4,4$	$27,8 \pm 5,10$
EEAC	$77,1 \pm 3,7$	$144,8 \pm 5,14$
Ácido Ascórbico	$22,72 \pm 0,13$	-
Trolox®	$14,92 \pm 0,41$	-

± desvio padrão da média, n=3. Intervalo com 95% de confiança.

Fonte: Autor (2019).

O DPPH^{*} é um radical livre estável e aceita um elétron ou OH⁻ para se tornar uma molécula diamagnética estável (Soares *et al.*, 1997). A diminuição da absorvância resulta em uma mudança de cor de roxo para amarelo conforme como os radicais sejam reduzidos por antioxidantes, através da doação de hidrogênio para formar a molécula estável do DPPH. Esse teste é um dos mais métodos mais utilizados na investigação da atividade antioxidante em extratos vegetais (Sahu, Kar, Routray, 2013).

Vários estudos relacionaram o teor total de fenóis à atividade antioxidante, onde os mesmos podem atuar na redução de oxigênio singleto, na quelação de metais, e na proteção contra a oxidação lipídica (Kasote *et al.*, 2015). Além disso, a atividade antioxidante depende do tipo de solvente utilizado, e varia conforme sua polaridade (Turkmen, Sari, Velioglu, 2006; Do *et al.*, 2014). Esse fato foi observado nos extratos das folhas de *A. coriacea*, onde o EEAC, mais polar, apresentou uma maior atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS que o EHAC (**Tabela 4**).

Em nossos estudos os resultados da atividade antioxidante pelo método ABTS foram obtidas através da interpolação numa curva de calibração do Trolox ($Y = 0,6244X + 0,03525$ e $r^2 = 0,9989$). Nesse método, assim como no método do DPPH, o EEAC ($144,8 \pm 5,14$ mM AAET.g⁻¹) apresentou uma capacidade antioxidante maior quando comparada com o EHAC ($27,8 \pm 5,10$ mM AAET.g⁻¹) (**Tabela 4**).

O radical $ABTS^{\bullet+}$, é um radical sintético centrado em nitrogênio, muito útil para determinar a atividade antioxidante de espécies antioxidantes doadoras de hidrogênio ou sequestradoras de radicais livres (Felhi *et al.*, 2017). Nessa metodologia os extratos vegetais inibem a atividade do persulfato de potássio e assim reduzem a produção do radical $ABTS^{\bullet+}$, (Senguttuvan, Paulsamy; KArthika, 2014).

A CE_{50} do EEAC e do EHAC sobre o radical DPPH foram próximas ao encontrado na polpa ($822,19 \pm 13,89 \mu\text{g/mL}$) e superior a encontrada nas sementes ($330,55 \pm 2,34 \mu\text{g/mL}$) de *A. coriacea* por Benites *et al.* (2015). Pelo método ABTS, a polpa ($57,18 \pm 4,0 \mu\text{M AAET.g}^{-1}$) e as sementes ($159,36 \pm 8,32 \mu\text{M AAET.g}^{-1}$) de *A. coriacea* apresentaram valores antioxidantes inferiores aos obtidos em nosso estudo (**Tabela 4**).

Diferente do encontrado em nossos estudos, outras *Annonas* apresentam uma baixa CE_{50} e são consideradas mais promissoras na redução dos radicais livres. Justino *et al.* (2018) encontrou no extrato etanólico das folhas de *A. muricata* uma CE_{50} de $28,1 \pm 4,4 \mu\text{g. mL}^{-1}$. Kalidindi *et al.* (2015) obteve com as folhas de *Annona squamosa* L. uma CE_{50} alta de $308,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, porém menor que os obtidos por seus extratos apolares. O extrato etanólico das folhas de *Annona vepretorum*, apresentou uma ação antioxidante mais expressiva que suas frações apolares e uma CE_{50} de $98,87 \pm 11,24 \mu\text{g.mL}^{-1}$, próxima ao obtido por EEAC (Almeida *et al.*, 2014).

Esses resultados mostram que os extratos polares das *Annonas* são mais efetivos na recuperação de compostos fenólicos e por isso apresentam um maior efeito antioxidante. Em nosso estudo apesar dos extratos das folhas apresentarem uma baixa atividade antioxidante, o EEAC apresentou melhor conteúdo fitoquímico e foi mais efetivo em reduzir os radicais DPPH e $ABTS^{\bullet+}$.

4 CONCLUSÃO

O extrato etanólico das folhas de *A. coriacea* apresentou um maior rendimento, uma maior concentração dos fitoquímicos, fenóis, flavonoides e taninos, e uma maior inibição de radicais DPPH e $ABTS^{\bullet+}$ que o extrato obtido em solvente hexânico. Esses achados mostram uma maior eficiência do solvente polar na recuperação de fitoquímicos e podem subsidiar estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- Almeida J R G D S, Araújo C D S, Pessoa C D Ó, Costa M P D, Pacheco A G M. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). *Rev Bras Frutic.* 2014; 36 (1): 258-264.
- Bellassouad K, Feki A E, Ayadi H. Effect of extraction solvents on the biomolecules and antioxidant properties of *Scorzonera undulata* (Asteraceae): application of factorial design optimization phenolic extraction. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2015; 14 (4); 313-330.
- Benites R S R, Formagio A S N, Argandoña E J S, Volobuff C R F, Trevizan L N F, Vieira M C, *et al.* Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. *Braz J Biol.* 2015; 75 (3): 685-691.
- Birben E, Sahiner, U M, Sackesen C, Erzurum, S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5(1): 9.
- Brand-Willians W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wiss U Technol.* 1995; 28 (1): 25-30.
- Broadhurst R B, Jones W T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J Sci Food Agric.* 1978; 29 (9): 788-794.
- Bryan-Thomas, J A Comparative study of the Antioxidant activity (DPPH), Total flavonoid, Total Tannin, Total polyphenol levels in plant extracts of the *Annona muricata*, *Ribes nigrum* and *Manilkara zapota*. *Inter J Scient Res Public.* 2016; 6 (9): 490-494.
- Carvalho A A, Santos L R D, Farias R R S, Chaves M H, Feitosa C M, Vieira Júnior G M, *et al.* Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from *Bauhinia pulchella*. *Quím Nova.* 2018; 41 (4): 405-411.
- Chisté R C, Benassi M T, Mercadante A Z. Effect of solvent type on the extractability of bioactive compounds, antioxidant capacity and colour properties of natural annatto extracts. *Int J Food Sci Tech.* 2011; 46 (18): 63-70.
- Do Q D, Angkawijaya A E, Tran-Nguyen P L, Huynh L H, Soetaredjo F E, Ismadji S, *et al.* Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J Food Drug Anal.* 2014; 22 (3): 296-302.
- Farahmandfar R, Esmailzadeh Kenari R, Asnaashari M, Shahrampour D, Bakhshandeh T. Bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of *Arum maculatum* leaves extracts as affected by various solvents and extraction methods. *Food sci nutr.* 2019; 7 (2): 465-475.
- Felhi S, Daoud A, Hajlaoui H, Mnafigui K, Gharsallah N, Kadri A. Solvent extraction effects on phytochemical constituents profiles, antioxidant and antimicrobial activities and functional group analysis of *Ecballium elaterium* seeds and peels fruits. *Food Sci Technol.* 2017; 37 (3): 483-492.
- Gangwar M, Gautam M K, Sharma A K, Tripathi Y B, Goel R K, Nath G. Antioxidant capacity and radical scavenging effect of polyphenol rich *Mallotus philippensis* fruit extract on human erythrocytes: an in vitro study. *Scientific World Journal.* 2014: 1-12.

- Hayouni E A, Abebradda M, Bouix M, Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* 2007; 105 (3): 1126-1134.
- Ignat I, Volf I, Popa V I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 2011; 126 (4): 1821-1835.
- Yusuf AZ, Zakir A, Shemau Z, Abdullahi M, Halima SA. Phytochemical analysis of the methanol leaves extract of *Paullinia pinnata* linn. *J Pharmacognosy Phytother.* 2014; 6(2):10-16.
- Justino A B, Miranda N C, Franco R R, Martins M M, Silva N M, Espindola F S. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. *Biomed Pharmacother.* 2018; 100: 83-92.
- Kalidindi N, Thimmaiah NV, Jagadeesh NV, Nandeeep R, Swetha S, Kalidindi B. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. Leaves. *J food drug anal.* 2015; 23(4): 795-802.
- Kasote D M, Katyare S S, Hegde M V, e Bae H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int j biol sci.* 2015; 11(8): 982.
- Komes D, Belščak-Cvitanović A, Horžić D, Rusak G, Likić S, Berendika M. Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochem anal.* 2011; 22 (2): 172-180.
- Mc Cord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108 (8):652–659.
- Nacz M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 41 (5): 1523–1542.
- Naima, R., Dumam, M., Hannache, H., Sesbou, A., Charrier, B., Pizzi, A., *et al.* Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Ind Crops Prod.* 2015; 70: 245-252.
- Pan S Y, Zhou S F, Gao S H, Yu Z L, Zhang S F, Tang M K, *et al.* New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013: 1-25.
- Paulino-Neto H F. Polinização e biologia reprodutiva de Araticum-liso (*Annona coriacea* Mart.: Annonaceae) em uma área de cerrado paulista: implicações para fruticultura. *Rev Bras Fruict.* 2014; 36: 132-140.
- Pinho F V S D A, Da Cruz L C, Rodrigues N R, Waczuk E P, Souza C E S, Coutinho H D M, *et al.* Phytochemical composition, antifungal and antioxidant activity of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill. *Oxid med cell longev.* 2016: 1-9.
- Sahu R K, Kar M, Routray R. DPPH free radical scavenging activity of some leafy vegetables used by Tribals of Odisha, India. *J Med Plants Stud.* 2013; 1 (4): 21-27.

Senguttuvan J, Paulsamy S, Karthika K. Phytochemical analysis and evaluation of leaf and root parts of the medicinal herb, *Hypochoeris radicata* L. for in vitro antioxidant activities. *Asian Pac j Trop Biomed.* 2014; 4: S359-S367.

Sepahpour S, Selamat J, Abdul Manap M, Khatib A, Abdull Razis A. Comparative Analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. *Molecules.* 2018; 23 (2): 402.

Silva C P D, Sousa M S B, Siguemoto É S, Soares R A M, e Arêas J A G. Chemical composition and antioxidant activity of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour. *Food Sci Technol.* 2014; 34(3): 597-603.

Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Br J Pharmacol.* 2017; 174 (11): 1244-1262.

Soares N P, Santos P L, Vieira V S, Pimenta V S C, Araújo E G. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. Enciclopédia Biosfera, v. 13, n. 24, p. 991, 2016.
https://doi.org/10.18677/EnciBio_2016B_094

Soares J R, Dins T C P, Cunha A P, Almeida L M. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radic Res.* 1997; 26 (5): 469-478.

Sousa C M M, Silva H R, Vieira-Junior G M, Ayres M C C, Costa C L S, Araújo D S, et al. Fenóis e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova.* 2007; 30 (2): 351-355.

Sousa O V, Del-Vechio-Vieira G, Kaplan M A C. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) leaves metanol extract. *Acta farm bonaer.* 2007; 26(6): 872-877.

Swain T, Hills W E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric.* 1959; 19: 63-68.

Tambe V D, Bhambar R S. Estimation of total phenol, tannin, alkaloid and flavonoid in *Hibiscus tiliaceus* Linn. Wood extracts. *J pharmacog phytochem.* 2014; 2(4): 41-47.

Thavamoney N, Sivanadian L, Tee L H, Khoo H E, Prasad K N, Kong K W. Extraction and recovery of phytochemical components and antioxidative properties in fruit parts of *Dacryodes rostrata* influenced by different solvents. *J food sci technol.* 2018; 55 (7): 2523-2532.

Turkmen N, Sari F, Velioglu Y S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food chem.* 2006; 99 (4): 835-841.

Vieira L M, Sousa M S B, Mancini-Filho J, LIMA A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. *Rev Bras Frutic.* 2011; 33 (3): 888-897.



CAPÍTULO III

Eficácia larvicida dos extratos de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Larvicidal efficacy of the extracts of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Eficácia larvicida dos extratos de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)

RESUMO

Dengue, Chikungunya, Zika e Febre Amarela são arboviroses transmitidas pelas fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* que têm alcançado proporções gigantescas com relevante aumento de casos em todo o Brasil, causando um impacto negativo na saúde pública e na economia. Esse estudo avaliou o potencial larvicida dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Annona coriacea* Mart. (EEAC e EHAC) sobre as larvas de *A. aegypti*. Os extratos apresentaram excelente atividade larvicida, as concentrações de 20 µg/mL do EEAC e 40 µg/mL do EHAC causaram uma letalidade de 100% das larvas de *A. aegypti*, após 48h de exposição com uma CL₅₀ de 0,84µg/mL e 0,90 µg/mL, respectivamente. Os EEAC e EHAC também demonstraram elevada toxicidade sobre *Artemia salina* não sendo possível calcular a DL 50. O EEAC mostrou-se um potente inibidor de acetilcolinesterase (>50%), com CI₅₀ = 6,966 mg/mL. Nossos resultados foram promissores e revelam o potencial biocida dos fitoquímicos presentes nos EEAC e EHAC, porém mais estudos precisam ser realizados para avaliar o mecanismo associado a letalidade das larvas.

Palavras chave: Arboviroses. Toxicidade. Acetilcolinesterase. *Artemia salina*. Biomonitoramento.

Larvicidal efficacy of the extracts of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) on *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)

ABSTRACT

Dengue, Chikungunya, Zika and Febre Amarela are arboviruses transmitted by the females of the *Aedes aegypti* mosquito, which have reached gigantic proportions with a relevant increase in cases throughout Brazil, causing a negative impact on public health and the economy. This study evaluated the larvicidal potential of the ethanolic and hexane extracts of leaves of *Annona coriacea* Mart. (EEAC and EHAC) on *A. aegypti* larvae. The extracts showed excellent larvicidal activity, the concentrations of 20 µg / mL of the EEAC and 40 µg / mL of the EHAC caused a lethality of 100% of *A. aegypti* larvae, after 48h of exposure with an LC50 of 0.84 µg / mL and 0.90 µg / mL, respectively. The EEAC and EHAC also showed high toxicity on *Artemia salina* and it was not possible to calculate the LD 50. The EEAC showed a potent inhibitor of acetylcholinesterase (> 50%), with IC50 = 6,966 mg / mL. Our results were promising and reveal the biocidal potential of the phytochemicals present in the EEAC and EHAC, but more studies need to be performed to evaluate the mechanism associated with larval lethality.

Keywords: Arboviroses. Toxicity. Acetylcholinesterase. *Artemia salina*. Biomonitoring.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a OMS a dengue está entre os dez principais problemas globais de saúde pública que irão demandar mais atenção neste ano de 2019 (BRASIL, 2019). Dengue, Chikungunya, Zika e Febre Amarela (FA) são arboviroses transmitidas pelas fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus,1762) (BRASIL, 2017) e estão causando um impacto negativo na saúde pública e na economia. Segundo dados obtidos pelo Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, no Brasil, essas arboviroses têm alcançando proporções gigantescas com relevante aumento de casos em todo país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

As estratégias tradicionais, como o uso de inseticidas químicos, de controle de vetores não conseguiram impedir o crescimento dessas epidemias transmitidas pelo *A. aegypti* a populações humanas (GOINDIN et al.,2017). O uso frequente e indiscriminado dessas substâncias sintéticas tem provocado poluição ambiental, intoxicação em humanos e outros organismos não alvos e, principalmente, acelerado o processo de seleção de populações de mosquitos resistentes (JIRAKANJANAKIT et al., 2014).

A resistência de populações de *A. aegypti* ao theméfos (larvicida organofosforado), por exemplo, foi registrada em várias unidades federais no Brasil (BRAGA; VALLE, 2007) como no Distrito Federal (CARVALHO et al., 2001, 2004), Ceará (LIMA et al., 2006), Campinas (SP) (CAMPOS; ANDRADE, 2001), São Paulo (MACORIS et al., 2013) e Paraíba (BESERRA et al., 2006), tendo posteriormente sua distribuição interrompida. Este fato evidencia claramente a necessidade urgente da implementação de novos produtos, economicamente viáveis, menos tóxicos e mais eficientes de controle de vetores, destacando-se os inseticidas botânicos.

Os pesticidas à base de vegetais oferecem, de modo geral, menos riscos aos ecossistemas, seus metabólitos secundários e derivados fornecem uma alternativa para o controle de mosquitos (GOVINDARAJULU et al., 2015). Segundo Shaalan et al. (2005) os componentes químicos provenientes do metabolismo secundário de vegetais, como alcaloides, esteroides, terpenoides e fenólicos, desempenham um importante papel sobre vários insetos vetores de doenças.

A *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) é uma espécie arbórea que se distribui por todas as regiões do Brasil, ocorrendo no Pantanal, na Floresta Decidual, no Cerrado e na Caatinga (MAAS et al., 2011). Diversos trabalhos relatam sua atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* (CARNEIRO et al., 2013; COSTA et al., 2012). Assim, inseticidas obtidos dessa a partir dessa planta podem ser uma alternativa biodegradável e eficaz no controle do vetor dessas

arboviroses, contribuindo de forma positiva para a utilização de fontes naturais, capazes de interromper o ciclo do *A. aegypti*.

Substâncias obtidas de fontes naturais também podem trazer riscos ao meio ambiente e a outros seres vivos, inclusive ao homem. Por essa razão, o World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) recomenda a realização de testes de toxicidade (ARAÚJO et al., 2018). Entre os organismos indicados como modelos experimentais, a *Artemia salina* Leach mostra alta sensibilidade para monitoramento ecotoxicológico de novos agentes (ARAÚJO et al., 2018; ALBUQUERQUE et al., 2014). O biomonitoramento com *A. salina* pode indicar também possíveis ações biológicas como anticancerígena, inseticida, moluscicida e antifúngica (ROSA et al., 2016; LUNA et al., 2006).

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial larvicida dos extratos etanólico e hexânico obtidos das folhas de *Annona coriacea* Mart. sobre as larvas de *Aedes aegypti* bem como investigar se essa atividade está relacionada com a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE).

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Material vegetal e obtenção dos extratos

As folhas de *Annona coriacea* Mart. foram coletadas no Piauí (Cerrado Setentrional), município de Campo Maior, coordenadas S 05° 02' 51.7" W 42° 46' 57.3" altitude 98 m, em 11 de março de 2017. O exemplar foi incorporado ao acervo do Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob o número de exsicata TEPB 30.764.

As folhas foram desidratadas à temperatura ambiente em local arejado, em seguida moídas, em moinho de facas e submetidas ao procedimento de extração por maceração duas vezes, com hexano e etanol, sucessivamente. Cada extração teve a duração de 72 horas. Posteriormente o solvente orgânico foi removido por destilação em rotoevaporador e mantido refrigerado (-5 ° C) em frasco âmbar, até o momento da utilização.

2.2 Teste fitoquímico

A identificação fitoquímica qualitativa de metabólitos secundários das folhas de *A. coriacea* seguiu a metodologia descrita por Soares et al. (2016) e Yusuf et al. (2014).

2.3 Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

2.3.1 Análise qualitativa de inibição de AChE.

A metodologia baseia-se na inibição qualitativa da enzima acetilcolinesterase (AChE) proposta por Ellman et al. (1961) e modificado por Rhee et al. (2001). Os EEAC e EHAC (10 mg/mL) foram aplicados em placas de sílica e revelados com reagente de Ellman (Tris/HCl 50 mM, pH 8, NaCl 0.1 M; MgCl₂·6H₂O 0.02 M), 1 mM DTNB [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)]; 15 mM ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) e AChE (5 units/mL). A cafeína foi utilizada como padrão positivo.

2.3.2 Quantificação da inibição enzimática *in vitro*

O ensaio enzimático em microplaca foi realizado conforme a metodologia descrita por Machado et al. (2015) e Dohi, Terasaki, Makino (2009). Inicialmente, adicionou-se 25 µL de EEAC e EHAC (10,0 - 0,125 mg/mL), 50 µL do tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8, 0,1% albumina bovina) e 25µL da enzima AChE (0,22 U/mL). A placa foi encubada a 37 °C por 5 min. Em seguida, adicionou-se 125 µL de DTNB 3 mM e 25 µL de ATCI 15 mM. Logo após, realizou-se a primeira leitura no leitor de microplaca, e após 5 min a segunda leitura. As absorbâncias foram lidas a 405 nm. Um branco foi realizado nas mesmas condições substituindo a amostra por metanol em 25µL de tampão A (50 mM Tris-HCl, pH 8). Os procedimentos foram realizados em triplicata e a Rivastigmina® foi utilizada como controle positivo. A Rivastigmina® é um medicamento inibidor da AChE, muito utilizado no tratamento de pessoas com a doença de Alzheimer.

A porcentagem de inibição foi calculada através da equação: % inibição = $100 - (A_{amostra} / A_{branco}) \times 100$; Onde, A é a variação das absorbâncias, no tempo inicial e final das leituras. A concentração que inibe 50% da enzima (CI₅₀) foi realizada por regressão em análise em log dose-probit, através do programa Graphpad prism 6, no intervalo de confiança de 95%.

2.4 Bioensaios

2.4.1 Atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*

Para o bioensaio foram utilizadas larvas de *A. aegypti* obtidas a partir de mosquitos adultos, provenientes de Teresina-PI, mantidos em colônia semifechada no Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária (LAPES) do Departamento de Parasitologia e Microbiologia, CCS, UFPI, em condições controladas de temperatura e umidade (28±1°C; 70±10%). A manutenção da colônia de mosquitos seguiu os parâmetros de biossegurança para insetários da Fundação Oswaldo Cruz –FIOCRUZ (SILVA et al.,1998).

Larvas de *A. aegypti* (n=10) em terceiro e quarto estádios, foram transferidas para copos plásticos descartáveis com 20mL da solução (EEAC + dimetil-sulfóxido-DMSO a 1%) e

(EHAC + DMSO a 1%) em diferentes concentrações (100 – 1 µg/mL). Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, em triplicata, totalizando 30 larvas por concentração. Após 24 e 48h foram registradas as taxas de mortalidade e sobrevivência. Como controle negativo foi utilizado uma solução de DMSO 1%.

A concentração letal que mata 50% das larvas (CL_{50}) foi avaliada utilizando regressão por análise em log dose-probit, com o intervalo de confiança de 95%, realizados através do programa SAS.

2.4.2 Toxicidade sobre *Artemia salina* Leach.

A toxicidade foi realizada de acordo com o ensaio proposto por Meyer et al. (1982). Os ovos de *A. salina* Leach. foram eclodidos em água do mar artificial e após 48 horas, as larvas foram coletadas para os bioensaios. Soluções com os extratos (1000 – 1 µg mL) foram preparadas em DMSO 1% e água do mar artificial, em quadruplicata. Posteriormente foram adicionadas a estas soluções 10 náuplios. Após 24 horas a contagem dos sobreviventes foram realizadas, e determinada a dose letal média (DL_{50}). Um controle negativo com DMSO 1% e água do mar artificial foi utilizado.

A concentração letal que mata 50% dos náuplios (DL_{50}) foi avaliada utilizando regressão por análise em log dose-probit, com o intervalo de confiança de 95%, realizados através do programa SAS.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1 Teste fitoquímico

Os testes qualitativos detectam metabólitos especiais e funcionam como marcadores químicos da espécie (SOARES et al., 2016). Através do *screening* fitoquímico foi possível identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nos EEAC e EHAC (**Tabela 1**). Alcaloides, flavonoides e triterpenos foram identificados nos extratos, e são responsáveis, majoritariamente, pelas atividades biológicas do gênero *Annona* (CARVALHO et al., 2004).

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com os de Benites et al. (2015); Silva et al. (2015a) e Brito et al. (2008). Dentre os compostos encontrados nos EEAC e EHAC destacam-se os taninos que são capazes de formar complexos solúveis com proteínas, o que torna essa classe de substâncias bastante tóxica a insetos, fungos e bactérias (SIMÕES et al., 2017). Plantas ricas em taninos apresentam boa atividade larvicida, os efeitos tóxicos sobre

Culicídeos sugerem que esses podem ser úteis como complemento em programas de controle de espécies de mosquitos associados à atividade humana (VALOTTO et al., 2010; SILVA et al., 2004 e REY et al., 1999), como o *A. aegypti*.

Tabela 1 - Resultados do *screening* fitoquímico das folhas de *Annona coriacea* Mart.

Metabólitos secundários / Testes realizados	EHAC	EEAC
Taninos	+	++
Flavonoides (AlCl ₃)	+	++
Triterpenos/esteroides	+	+
Saponinas	++	-
Cumarinas	+	+
Quinonas	-	-
Alcaloides	+	+

(-) Ausência; (+) Presença; (++); Muito expressivo.

Fonte: Autor 2019.

Em uma revisão sobre substâncias vegetais com atividade larvicida, Garcez et al. (2013) relataram que flavanoides, cumarinas e triterpenos apresentam atividade larvicida. A presença dessas substâncias nos EEAC e EHAC podem justificar a boa atividade larvicida desses extratos.

3.2 Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

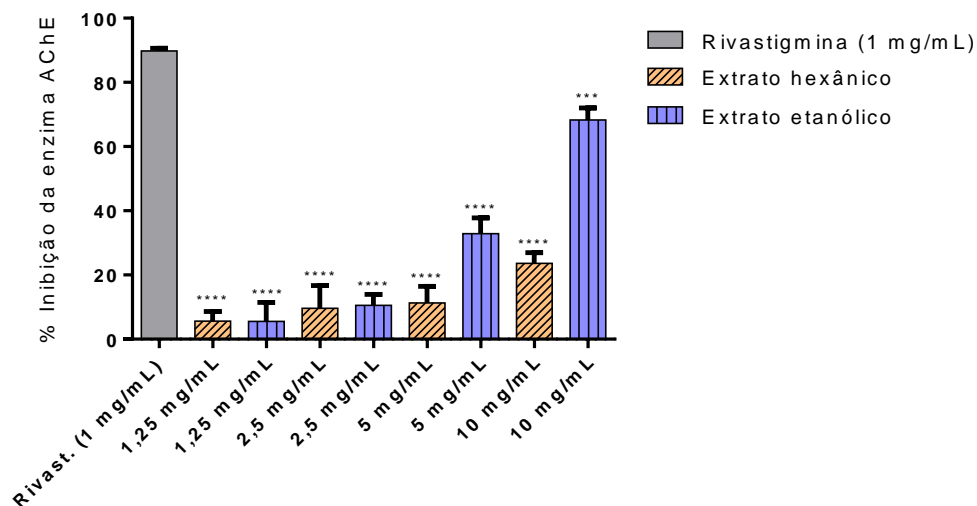
A inibição da AChE está relacionada com a atividade larvicida, inseticida e também ao tratamento da doença de Alzheimer, dessa forma diversos trabalhos têm sido realizados com extratos de plantas ou seus derivados buscando bioprodutos capazes de inibir sua ação (LIMA et al., 2018; SILVA et al., 2015a).

Nesse estudo os EEAC e EHAC apresentaram resultados positivos de inibição qualitativa frente à AChE comprovado através da formação dos halos brancos no campo amarelo da placa de Cromatografia em Camada Delgada, semelhante ao padrão cafeína, segundo o método de Ellman. Essa atividade foi mais evidenciada no EEAC quando comparado ao EHAC. Silva et al. (2015a) e Begum et al. (2010) relatam a ação anticolinesterásica dos extratos de *Annona glabra* Linn. e *Annona squamosa* L., respectivamente.

O teste quantitativo permitiu calcular a concentração dos extratos capaz de inibir a atividade da enzima AChE em 50%. Somente o EEAC apresentou atividade inibitória com $CI_{50} = 6,966$ mg/mL. Esse valor é maior do que o encontrado para a Rivastigmina® ($CI_{50} = 0,1148$ mg/mL), controle positivo.

De acordo com classificação de Vinutha et al. (2007) os extratos podem ser classificados em: inibidores potentes (> 50% de inibição), inibidores moderados (30-50% de inibição) e inibidores fracos (< 30% de inibição). O EEAC foi considerado um potente inibidor, com uma percentagem de inibição superior a 50% na maior concentração testada, enquanto que o EHAC foi considerado um fraco inibidor, segundo a mesma classificação. **(Gráfico 1).**

Gráfico 1 – Percentual de inibição de AChE dos EHAC e EEAC.



Os valores representam a média \pm erro padrão da média, $n=3$ para cada concentração. *One way ANOVA*, seguida pelo pós-teste de *Tukey*. **** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$ comparado à Rivastigmina® (1 mg/mL).

Fonte: autor (2019).

Alguns trabalhos relatados na literatura, como o de Formagio et al. (2015), mostraram resultados próximos ao do presente estudo, eles descrevem uma inibição de (52%) para o extrato metanólico das sementes de *A. coriacea*; para o extrato metanólico das folhas a inibição observada por eles foi de 33%, menor do que o apresentado para o EEAC nesse trabalho; o extrato floral da mesma espécie não apresentou atividade inibitória. Outras Annonaceas foram analisadas no mesmo estudo: *Annona crassiflora* Mart., *Annona sylvatica* A. St. – Hil., *Annona cacans* Warm. e *Duguetia furfuracea* A. St. – Hil. cuja taxa de inibição foi menor que 50%.

A AChE tem como função hidrolisar a acetilcolina, formando ácido acético e colina, sua inibição, aumenta o nível de acetilcolina nas sinapses, ocasionando paralisia e a morte do inseto (GARCEZ et al., 2013). Segundo Silva et al. (2014; 2015b) a inibição de AChE, também pode causar a morte devido a redução dos níveis de colina, que atua como substrato para síntese de fosfolipídeos. Conforme Dambolena et al. (2016) a inibição de AChE é o principal mecanismo de ação para a maioria dos inseticidas, dessa forma o EEAC é promissor como potencial inseticida.

3.3 Bioensaio larvicida

3.3.1 Atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*

O percentual de mortalidade das larvas de *A. aegypti* ocasionado pelos EEAC e EHAC foi superior a 80% com 24h de exposição nas concentrações de 100 a 20 µg/mL, atingindo uma letalidade de 100% após 48h de exposição nas concentrações de 100 a 20 µg/mL, para o EEAC e 100 a 40 µg/mL para o EHAC como mostra a **Tabela 2**.

Tabela 2 - Percentual de mortalidade de larvas de 3º e 4º estágio de *Aedes aegypti*, após 48h de exposição às diferentes concentrações (100 – 1 µg/mL) do EEAC e EHAC.

Extrato	100	80	60	50	40	20	10	5	1	Branco
µg/mL										
EEAC	100	100	100	100	100	96	90	3	3	0
EHAC	100	100	100	100	100	90	86	6	3	0

Fonte: autor (2019).

Muitas espécies do gênero *Annona* possuem atividade inseticida. De acordo com Magadula et al. (2009) o extrato das sementes de *Annona montana* Macfad. apresenta atividade larvicida e residual sobre populações do *A. aegypti* e os extratos de *A. squamosa* L. e *Annona senegalensis* Pers. possuem fortes efeitos na morte de insetos, particularmente mosquitos. Estudos realizados com *Annona crassiflora* Mart., *A. glabra* e *Annona muricata* L. também revelaram atividade larvicida sobre *A. aegypti*. (RODRIGUES et al., 2006).

O EEAC apresentou a CL50 de 1,15 µg/mL após 24 horas e 0,84µg/mL com 48h. Para o EHAC a CL50 foi de 1,22 e 0,90 µg/mL, após 24h e 48h, respectivamente. Ambos os extratos foram considerados bons larvicidas de acordo com as propostas de Cheng et al. (2003) e de

Komalamisra et al. (2005) os quais classificam as substâncias com $CL_{50} < 100\mu\text{g/mL}$ e $CL_{50} < 50\mu\text{g/mL}$ como ativas contra larvas, respectivamente.

Os testes com os EEAC e EHAC foram mais efetivos do que os relatados na literatura para outras espécies de *Annonas*. Extratos metanólicos de *Annona reticulata* L. e *A. glabra* apresentaram uma CL_{50} de $95,24\mu\text{g/mL}$ e $114,47\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Mohankumar et al. 2016). Para *A. muricata* Santhosh et al. (2015) e Omena et al. (2007) descreveram uma CL_{50} de ($51,13\mu\text{g/mL}$ e $42,3\mu\text{g/mL}$), o extrato etanólico das folhas de *A. squamosa* apresentaram, $CL_{50} = 169\mu\text{g/mL}$ (OMENA et al., 2007). Nanopartículas de prata do extrato de *A. reticulata* apresentaram $CL_{50} = 4,43\mu\text{g/mL}$ (PARTHIBAN et al., 2019). A exceção é feita ao extrato etanólico das sementes de *A. glabra* que segundo Omena et al. (2007) apresentou $CL_{50} = 0,06\mu\text{g/mL}$. Ao comparar esse estudo com os anteriores observa-se que os EEAC e EHAC podem ser uma fonte promissora de produtos naturais com atividade larvicida.

Além da alta mortalidade, provocada pela ação dos EEAC e EHAC em nosso trabalho foi observada que as larvas apresentaram curvação do corpo e manchas escuras ao longo do intestino após exposição aos extratos (**Figura 1**).

O escurecimento das larvas também foi observado em outros estudos (OLIVEIRA et al., 2013; ABED, et al., 2007). Costa et al. (2012) descreveram que o extrato metanólico de *A. coriacea* causou morte em larvas de *A. aegypti*, afetando parcial ou totalmente as células epiteliais do intestino médio. Essa mesma observação foi relatada por (ABED et al. 2017) para extratos de *Annona reticulata*. A acetogenina, *squamocin*, isolada de *A. squamosa*, nas concentrações de $100\text{-}50\mu\text{g/mL}$, apresentou atividade citotóxica com alterações graduais no epitélio do intestino médio das larvas de *A. aegypti* a partir de 120 minutos de exposição. (COSTA et al., 2014).

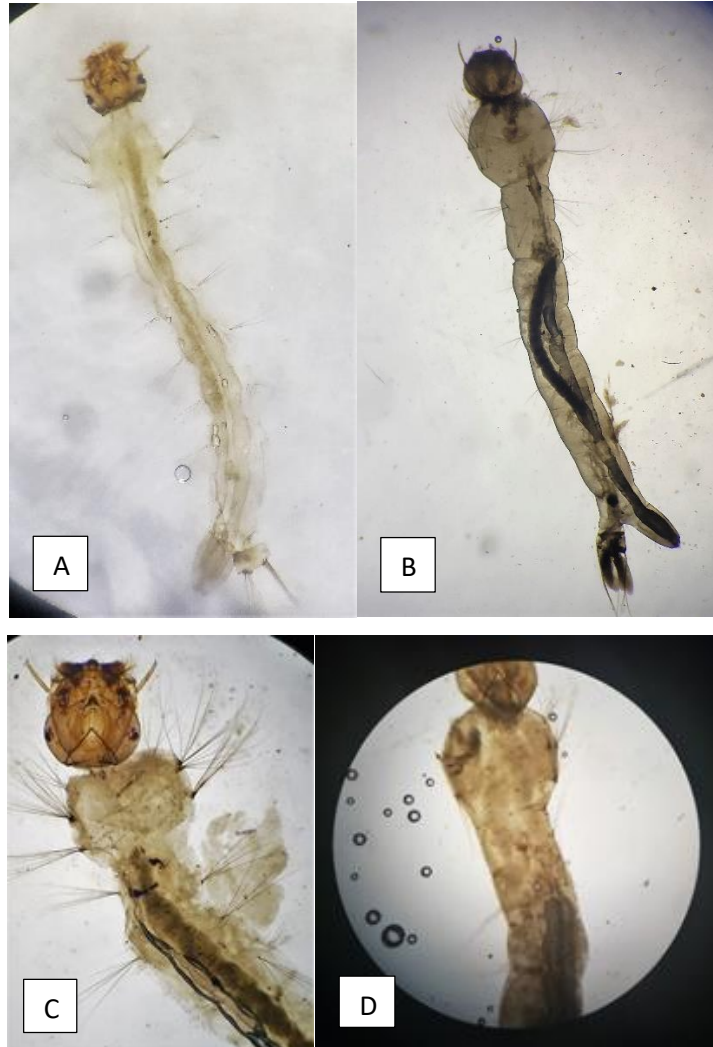
Valotto et al., (2010), Abed et al., (2007) e Arruda et al. (2003) também observaram danos causados ao intestino das larvas de *A. aegypti* expostas a extratos e óleos vegetais.

Segundo Aciole (2009) essas alterações morfológicas podem levar à uma explicação completa da ação tóxica dos componentes fitoquímicos nas larvas de Culicidae e fornecer indicações do modo de ação dos compostos vegetais no corpo das larvas. Dessa forma, mais estudos poderiam elucidar os efeitos dessa substância fornecendo subsídios para produção de inseticida altamente eficaz e que não causasse interferência em outros organismos nem no meio ambiente que estão sendo expostos.

A ação larvicida ou inseticida de um extrato vegetal pode variar de acordo com diversos fatores (CHENG, 2009). Para Mohankumar et al. (2016), os extratos vegetais das Annonaceas possuem uma complexidade de moléculas como acetogeninas, taninos e alcaloides que

apresentam diversas bioatividades, destacando-se a toxicidade aos insetos o que foi observado nesse estudo para os EEAC e EHAC.

Figura 1 - Larva de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).



1A (larva do grupo controle - vista na lupa); 1B (larva exposta ao EEAC 100 µg / mL - lupa); 1C (larva exposta ao EEAC 100 µg / mL - microscópio); 1D (larva exposta ao EHAC 100 µg / mL – microscópio).

Fonte: Autor (2019).

3.3.2 Toxicidade sobre *Artemia salina* Leach.

Os ensaios de toxicidade sobre *A. salina* permitem prever uma atividade específica de uma determinada substância e facilita estudos de triagem de fitodrogas (ROSA et al., 2016; HAMIDI et al., 2014; KANWAR, 2007). O uso de produtos naturais para fins farmacológicos ou fitoterápicos exige a realização desses ensaios para verificar a segurança nessa utilização (ROSA et al., 2016; SILVEIRA et al., 2008).

Segundo Meyer et al. (1982), amostras com DL50 >1000µg/mL são consideradas atóxicas e com DL50 <1000µg/mL são tóxicas frente ao microcrustáceo *A. salina*. Em nossos estudos a toxicidade dos EEAC e EHAC foi tão intensa que não foi possível calcular a DL₅₀. Esse estudo corrobora com o realizado por Novaes et al. (2016) para *A. coriacea* ratificando sua ação inseticida e evidenciando seu potencial citotóxico.

A alta toxicidade das *Annonas* sobre *A. salina* é descrita para diversas espécies *A. senegalensis*, *A. crassifolia*, *A. nutans*, *A. hypoglauca*, *A. cherimola*, *A. muricata*, *A. squamosa* e *A. reticulata* (CHEL-GUERRERO et al., 2018; SILVA et al., 2015b; LUNA et al., 2006; PIMENTA et al., 2003 e SAHPAZ et al., 1994). Eles correlacionam essa atividade a presença das acetogeninas.

De acordo com Rosa et al. (2016); Arcanjo et al. (2012) e Siqueira et al. (1998) o ensaio de letalidade sobre *A. salina* tem mostrado significativa correlação com a atividade antitumoral *in vivo*, sendo considerado um excelente teste para ser empregado como *pré-screening* em investigações de atividade terapêutica contra tumores sólidos. Embasados nessa premissa sugere-se o potencial dos extratos obtidos das folhas de *A. coriacea* em estudos anti-tumorais.

4. CONCLUSÃO

Os EEAC e EHAC apresentaram boa atividade larvicida sobre *A. aegypti*, com atividade letal em baixas concentrações (20 µg/mL). No entanto mais estudos são necessários para elucidar a alta taxa de mortalidade das larvas, se essa causa está relacionada a ingestão de fitoquímicos presentes nos extratos, a inibição da AChE ou ambos.

Nossos resultados foram promissores e revelam o potencial dos EEAC e EHAC na elaboração de inseticidas biodegradáveis. Esses produtos reduzem as desvantagens dos inseticidas sintéticos sobre o meio ambiente e promovem também a utilização sustentável de recursos naturais disponíveis no Cerrado, além de contribuir para a preservação e valorização da biodiversidade desse Bioma, que é uma fonte promissora de substâncias químicas bioativas.

Além disso os EEAC e EHAC apresentam alta toxicidade sobre *A. salina*, fornecendo assim, subsídios para futuros ensaios de atividade antiproliferativa, indicando possível potencial para o desenvolvimento biotecnológico de formulações farmacêuticas com ação antineoplásica.

REFERÊNCIAS

- Abed, R. A. A. A., Cavasin, G. M., Silva, H. H. G., Geris, R. G., & Silva, I. G. (2007). Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). *Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology*, 36(1).
<https://doi.org/10.5216/rpt.v36i1.1819>
- Aciole, S. D. G. (2009). Avaliação da actividade insecticida dos óleos essenciais nas plantas amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como alternativa de controle às larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) (Doctoral dissertation).
- Albuquerque, L. P., Pontual, E. V., de Sá Santana, G. M., Silva, L. R. S., dos Santos Aguiar, J., Coelho, L. C. B. B. & Napoleão, T. H. (2014). Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. *Acta tropica*, 138, 23-27.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.005>
- Arcanjo, D. D. R., Albuquerque, A. C. M., Melo-Neto, B., Santana, L. C. L. R., Medeiros, M., & Citó, A. M. G. L. (2012). Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Biology*, 72(3), 505-509.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842012000300013>
- Araújo, H. D., Silva, L. R., Siqueira, W. N., Fonseca, C. S., Silva, N. H., Melo, A. M., & Lima, V. L. (2018). Toxicity of Usnic Acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. *Acta tropica*, 179, 39-43.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.007>
- Benites, R. S. R., Formagio, A. S. N., Argandoña, E. J. S., Volobuff, C. R. F., Trevizan, L. N. F., Vieira, M. C., & Silva, M. S. (2015). Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. *Brazilian Journal of Biology*, 75(3), 685-691.
<http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.21313>
- Beserra, E. B., Castro Júnior, F.P., Santos, J. W., Santos, T. S. e Fernandes, C. R. M. (2006). Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*, 35(6), 853 – 860.
- Begum, N., Sharma, B., & Pandey, R. S. (2010). Toxicity potential and anti AchE activity of some plant extracts in *Musca domestica*. *J. Biofertil. Biopestic*, 2(108), 1-6.
<http://dx.doi.org/10.4172/2155-6202.1000108>
- Braga, I. A.; Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, p. 279-293.
<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/18453>.
 Acesso em 12 de março de 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação Nº 4, de 28 de Setembro de 2017. Disponível em:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0004_03_10_2017.html.
 Acesso em: 29 de março de 2019.

Brasil. Principais ameaças para a saúde em 2019. Disponível em:
<http://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2019-01/oms-lista-10-principais-ameacas-para-saude-em-2019>.
 Acesso em: 18 de abril de 2019.

Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 11 de 2019. *Boletim epidemiológico. Volume 50*. Disponível em:
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>.
 Acesso em: 18 de abril de 2019.

Brito, H. O., Noronha, E. P., França, L. M., Brito, L. M. O., & Prado, M. S. A. (2008). Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). *Revista Brasileira de Farmacologia*, 89(3), 180-184.

Campos, J., & Andrade, C. F. (2001). Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*, 35, 232-236.

Carneiro, Â. P., Pereira, M. J. B., & Galbiati, C. (2013). Biocide activity of *Annona coriacea* seeds extract on *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae). *Revista de Biologia Tropical*, 61(1), 419-427.

Carvalho, M. D. S. L. D., Caldas, E. D., Yoshizawa, M. A. C., Degallier, N., Oliveira, C. D., & Knox, M. B. (2001). Susceptibilidade do *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal, em 2000. *Informe Epidemiológico do SUS*, 10, 41-43.
<http://dx.doi.org/10.5123/S0104-16732001000500012>

Carvalho, M. D. S. L. D., Caldas, E. D., Degallier, N., Vilarinhos, P. D. T. R., Souza, L. C. K. R. D., Yoshizawa, M. A. C., ... & Oliveira, C. D. (2004). Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Revista de Saúde Pública*, 38, 623-629.
<http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.21313>

Chel-Guerrero, L. D., Sauri-Duch, E., Fragosó-Serrano, M. C., Pérez-Flores, L. J., Gómez-Olivares, J. L., Salinas-Arreortua, N. & Mendoza-Espinoza, J. A. (2018). Phytochemical Profile, Toxicity, and Pharmacological Potential of Peels from Four Species of Tropical Fruits. *Journal of Medicinal Food*, 21(7), 734-743.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0124>

Cheng, S. S., Huang, C. G., Chen, Y. J., Yu, J. J., Chen, W. J., & Chang, S. T. (2009). Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology*, 100(1), 452-456.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.038>

Cheng, S. S., Chang, H. T., Chang, S. T., Tsai, K. H., & Chen, W. J. (2003). Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, 89(1), 99-102.

[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00008-7)

Costa, M., Cossolin, J., Pereira, M., Sant'Ana, A., Lima, M., Zanuncio, J., & Serrão, J. (2014). Larvicidal and cytotoxic potential of squamocin on the midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxins*, 6(4), 1169-1176.

<https://doi.org/10.3390/toxins6041169>

Costa, M. S., Pinheiro, D. O., Serrão, J. E., & Pereira, M. J. B. (2012). Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. *Neotropical Entomology*, 41(4), 311-314.

<http://dx.doi.org/10.1007/s13744-012-0050-z>

Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Herrera, J. M., Pizzolitto, R. P., Areco, V. A., & Zygadlo, J. A. (2016). Terpenes: Natural products for controlling insects of importance to human Health- A structure-activity relationship study. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1155/2016/4595823>

Dohi, S., Terasaki, M., & Makino, M. (2009). Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4313-4318.

<http://dx.doi.org/10.1021/jf804013j>

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.

[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Formagio, A. S. N., Vieira, M. C., Volobuff, C. R. F., Silva, M. S., Matos, A. I., Cardoso, C. A. L. & Carvalho, J. E. (2015). In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(4), 308-315.

<http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20144127>

Garcez, W. S., Garcez, F. R., da Silva, L. M., & Sarmiento, U. C. (2013). Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. *Revista Virtual de Química*, 5(3), 363-393.

<http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20130034>

Goindin, D., Delannay, C., Gelas, A., Ramdini, C., Gaude, T., Faucon, F., ... & Fouque, F. (2017). Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infectious Diseases of Poverty*, 6(1), 38.

<https://doi.org/10.1186/s40249-017-0254-x>

Govindarajulu, M., Epstein, L., Wroblewski, T. & Michelmore, R. W. (2015). Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, 13(7), 875-883.

<https://doi.org/10.1111/pbi.12307>

Hamidi, M., Jovanova, B., & Panovska, T. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharm Bull*, 60(1), 9-18.

Jirakanjanakit, N., Rongnoparut, P., Saengtharap, S., Chareonviriyaphap, T., Duchon, S., Bellec, C., & Yoksan, S. (2014). Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003–2005. *Journal of Economic Entomology*, 100(2), 545-550.
<https://doi.org/10.1093/jee/100.2.545>

Kanwar, A. S. (2007). Brine shrimp (*Artemia salina*) a marine animal for simple and rapid biological assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine*, 2(4), 236-240.

Komalamisra, N., Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., & Apiwathnasorn, C. (2005). Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 36(6), 1412.

Yusuf, A. Z., Zakir, A., Shemau, Z., Abdullahi, M., & Halima, S. A. (2014). Phytochemical analysis of the methanol leaves extract of *Paullinia pinnata* Linn. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 6(2), 10-16.
<http://dx.doi.org/10.5897/JPP2013.0299>

Lima, E. P., Oliveira Filho, A. M. D., Lima, J. W. D. O., Ramos Júnior, A. N., Cavalcanti, L. P. D. G., & Pontes, R. J. S. (2006). *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(3), 259-263.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822006000300006>

Luna, J. D. S., De Carvalho, J. M., De Lima, M. R. F., Bieber, L. W., Bento, E. D. S., Franck, X., & Sant'Ana, A. E. G. (2006). Acetogenins in *Annona muricata* L. (Annonaceae) leaves are potent molluscicides. *Natural product research*, 20(3), 253-257.
<https://doi.org/10.1080/14786410500161445>

Maas, P. J., Lubbert, Y. T., Rainer, H., Lobao, A. Q., & Erkens, R. H. (2011). An updated index to genera, species, and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. *Nordic Journal of Botany*, 29(3), 257-356.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1756-1051.2011.01092.x>

Machado, L. P., Carvalho, L. R., Young, M. C. M., Cardoso-Lopes, E. M., Centeno, D. C., Zambotti-Villela, L. & Yokoya, N. S. (2015). Evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity of Brazilian red macroalgae organic extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(6), 657-662.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.003>

Macoris, M.L.G., Andrighetti, M. T. M., Takaku, L., Glasser, C. M., Garbeloto, V. C., & Bracco, J. E Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 703-708, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000500020>

Magadula, J. J., Innocent, E., & Otieno, J. N. (2009). Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(9), 674-680.

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. J., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(05), 31-34.

<https://doi.org/10.1055 / s-2007-971236>

Mohankumar, T. K., Shivanna, K. S., & Achuttan, V. V. (2016). Screening of methanolic plant extracts against larvae of *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* in Mysore. *Journal of Arthropod-borne Diseases*, 10(3), 303.

Novaes, P., Torres, P. B., & dos Santos, D. Y. A. C. (2016). Biological activities of Annonaceae species extracts from Cerrado. *Brazilian Journal of Botany*, 39(1), 131-137.

<https://doi.org/10.1007/s40415-015-0225-z>

Oliveira, G. L., Cardoso, S. K., Lara Junior, C. R., Vieira, T. M., GUIMARÃES, E. F., Figueiredo, L. S., ... & Kaplan, M. A. C. (2013). Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(4), 1227-1234.

<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201391011>

Omena, M. C., Navarro, D. M. A. F., De Paula, J. E., Luna, J. S., De Lima, M. F., & Sant'Ana, A. E. G. (2007). Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. *Bioresource Technology*, 98(13), 2549-2556.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.040>

Parthiban, E., Manivannan, N., Ramanibai, R., & Mathivanan, N. (2019). Green synthesis of silver-nanoparticles from *Annona reticulata* leaves aqueous extract and its mosquito larvicidal and anti-microbial activity on human pathogens. *Biotechnology Reports*, 21, e00297.

<http://dx.doi.org/10.1016 / j.btre.2018.e00297>

Pimenta, L. S., Pinto, G. B., Takahashi, J. A., e Silva, L. G. F., & Boaventura, M. A. D. (2003). Biological screening of Annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine shrimp test). *Phytomedicine*, 10(2-3), 209-212.

<https://doi.org/10.1078/094471103321659960>

Rey, D., Pautou, M. P., & Meyran, J. C. (1999). Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic Diptera larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(2), 173-181.

<https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4810>

Rhee, I. K., van de Meent, M., Ingkaninan, K., & Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography*, 915(1-2), 217-223.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0)

Rodrigues, A. M. D. S., De Paula, J. E., Dégallier, N., Molez, J. F. & Espíndola, L. S. (2006). Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(2), 314-318.
[https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)22\[314:LAOSCP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)22[314:LAOSCP]2.0.CO;2)

Rosa, C. S., Veras, K. S., Silva, P. R., Lopes Neto, J. J., Cardoso, H. L. M., Alves, L. P. L. & Moraes, D. F. C. (2016). Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*.
http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_006.

Sahpaz, S., Bories, C. H., Loiseau, P. M., Cortes, D., Hocquemiller, R., Laurens, A. & Cave, A. (1994). Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. *Planta Medica*, 60(06), 538-540.
<http://dx.doi.org/10.1055 / s-2006-959566>

Santhosh, S. B., Yuvarajan, R., & Natarajan, D. (2015). *Annona muricata* leaf extract-mediated silver nanoparticles synthesis and its larvicidal potential against dengue, malaria and filariasis vector. *Parasitology Research*, 114(8), 3087-3096.
<http://dx.doi.org/10.1007 / s00436-015-4511-2>.

Shaalán, E. A. S., Canyon, D., Younes, M. W. F., Abdel-Wahab, H., & Mansour, A. H. (2005). A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment International*, 31(8), 1149-1166.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.03.003>

Sousa S. A. A., Alexandre, J. B., Vieira, L. G., Rodrigues, S. P., Falcão, M. J. C., & Morais, S. M. (2015a). Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinérgica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L. (araticum panã). *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 36(2).

Silva, E. M. F., de Castro Nascimento, R. B., Barreto, F. S., de Moraes Filho, M. O., Griz, S. A. S., Santos, A. F., & Mousinho, K. C. (2015b). Estudo in vitro do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 36(2).

Silva, A. A. D. S. S., Júnior, J. M. F., de Vasconcelos Silva, M. G., & de Morais, S. M. (2014). Estudo fitoquímico e atividades biológicas do limãozinho *Zanthoxylum syncarpum* Tull. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 8(1), 37-53.

Silva, H. H. G. D., Silva, I. G. D., Santos, R. M. G. D., Rodrigues Filho, E., & Elias, C. N. (2004). Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(5), 396-399.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-868220040005>

Silva, H. H. G. D., Silva, I. G. D., & Lira, K. D. S. (1998). Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. <https://doi.org/10.5216/rpt.v27i1.17196>

Silveira, P. D., Bandeira, M. A. M., & Arrais, P. S. D. (2008). Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4), 618-626.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400021>

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2016). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora.

Siqueira, J. M. D., Bomm, M. D., Pereira, N. F. G., Garcez, W. S., & Boaventura, M. A. D. (1998). Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000500004>.

Soares, N. P., Santos, P.L., Vieira, V. S., Pimenta, V. S. C., Araújo, E. G. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. *Enciclopédia Biosfera*, v. 13, n. 24, p. 991, 2016.
https://doi.org/10.18677/EnciBio_2016B_094

Valotto, C. F. B., Carvasin, G., Silva, H. H. G., Geris, R., & Silva, I. G. D. (2010). Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae).
<https://doi.org/10.5216/rpt.v39i4.13066>

Vinutha, B., Prashanth, D., Salma, K., Sreeja, S. L., Pratiti, D., Padmaja, R. & Deepak, M. (2007). Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 359-363.
<https://doi.org/10.1016/j.jp.2006.06.014>



CAPÍTULO IV

**Efeito modulador de *Annona coriacea* Mart.
sobre a resistência à norfloxacina em
*Staphylococcus aureus***

**Modulating effect of *Annona coriacea* Mart. on resistance
to norfloxacin in *Staphylococcus aureus***

Efeito modulador de *Annona coriacea* Mart. sobre a resistência à norfloxacina em *Staphylococcus aureus*

RESUMO

A atividade antimicrobiana dos extratos etanólico (EEAC) e hexânico (EHAC) das folhas de *Annona coriacea* Mart. foi avaliada contra cepas padrões de fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Para avaliação da atividade moduladora, as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da norfloxacina e do brometo de etídio foram testadas contra a cepa de *Staphylococcus aureus* SA1199-B, superprodutora da bomba de efluxo NorA, na ausência ou na presença de EEAC ou EHAC em concentrações subinibitórias. Os extratos apresentaram uma CIM ≥ 1024 , indicando que os mesmos são inativos contra as cepas testadas. No entanto, o EEAC em concentrações subinibitórias, foi capaz de reduzir em até 4 vezes a CIM do antibiótico contra a cepa SA1199-B, enquanto que o EHAC foi capaz de reduzir a CIM do antibiótico em até 2 vezes. Um maior efeito modulador foi obtido quando o extrato EEAC foi associado com o brometo de etídio, um substrato de NorA cujo único mecanismo de resistência conhecido é mediado por bombas de efluxo, sugerindo que a ocorrência de fitoquímicos nos extratos estudados que inibem a bomba de efluxo NorA, aumentando as concentrações intracelulares de norfloxacina em *S. aureus*. Dessa forma os fitoquímicos presentes nas folhas de *A. coriacea* são promissores quando associados a norfloxacina no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* multirresistentes.

Descritores: atividade antimicrobiana, fenóis, *Staphylococcus aureus*, resistência aos antibióticos, fluoroquinolonas, bomba de efluxo NorA.

Modulating effect of *Annona coriacea* Mart. on resistance to norfloxacin in *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The antimicrobial activity of ethanolic (EEAC) and hexane (HEAC) extracts of *Annona coriacea* leaves was evaluated by means of fungal and Gram-positive and Gram-negative bacteria. For the evaluation of its modulatory activity, such as the inhibitory concentrations (MICs) of norfloxacin and ethidium bromide against a bacterium of the *Staphylococcus aureus* SA1199-B overproduction of the NorA pump efflux, in its absence or in the presence of EEAC or HEAC in concentrations subinhibitory. The extracts are MIC ≥ 1024 , and the extracts are inactive against the strains tested. However, the EEAC at subinhibitory concentrations was able to reduce up to 4-fold the MIC of the antibiotic against the SA1199-B strain, whereas the HEAC was able to reduce the MIC of the antibiotic by up to 2-fold. The highest modulating effect was obtained when the EEAC extract was associated with ethidium bromide, a NorA substrate whose unique mechanism of resistance is mediated by efflux pumps, suggesting that an occurrence of phytochemicals in the extracts studied that inhibit a NorA efflux pump, increasing intracellular concentrations of norfloxacin in *S. aureus*. In this way the phytochemicals present in the leaves of *A. coriacea* are promising as adjuvants of norfloxacin without treatment of infections caused by multiresistant *S. aureus*.

Keywords: antimicrobial activity, phenols, *Staphylococcus aureus*, resistance to antibiotics, fluoroquinolones, NorA pump efflux.

1. Introdução

O aumento de microrganismos com fenótipo resistente tem se tornado um problema clínico em muitos países, com internações hospitalares frequentes e prolongadas, com elevados custos e alta morbimortalidade [1,2,3,4]. Um dos principais fatores que levam à resistência antimicrobiana são o uso excessivo e disseminado, no ambiente hospitalar e comunitário, de beta-lactâmicos que levam a seleção de cepas resistentes, como as de *Staphylococcus aureus* [5].

Os mecanismos de resistência são variados, incluindo modificação enzimática do alvo antimicrobiano, mutações que resultam na redução da absorção do fármaco, inativação enzimática do antimicrobiano e superexpressão de bombas de efluxo [6,7]. As bombas de efluxo são proteínas presentes na membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que expulsam o fármaco reduzindo a sua concentração intracelular a níveis ineficazes [8,9].

Um dos principais mecanismos de resistência a múltiplos fármacos expresso por *Staphylococcus* é a extrusão de drogas por bombas de efluxo [10]. A superexpressão da bomba de efluxo NorA lhes confere resistência a fluoroquinolonas hidrofílicas, compostos quaternário de amônia, e brometo de etídio [11,12,13]. Cepas que superexpressam bombas de efluxo têm sido relatadas como as mais resistentes aos tratamentos e se configuram como uma causa comum de infecções com elevada mortalidade [14,15].

Nesse contexto, restaurar a sensibilidade das cepas aos antimicrobianos, pode ser uma alternativa eficaz contra as linhagens multirresistentes [16]. Vários estudos têm avaliado a possível ação moduladora de produtos naturais na resistência aos antimicrobianos, visando restabelecer a sua eficácia contra bactérias multirresistentes [17,18,19].

A espécie *Annona coriacea* Mart., popularmente conhecida como araticum, com ampla ocorrência no Cerrado, surge como proposta promissora [20]. Na Medicina Tradicional, o decocto de suas folhas e sementes são utilizados contra formas parasitárias [21]. Na literatura relata-se seu efeito anti-leishmania, anti-tripanosossomial [22] e anti-antiplasmodial [23]. Pesquisas recentes revelam seu potencial antifúngico e antibacteriano [24,25].

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano dos extratos etanólico (EEAC) e hexânico (EHAC) das folhas de *Annona coriacea* Mart. em linhagens padrões, bem como o efeito modulador da resistência à norfloxacin em *Staphylococcus aureus*, cepa superprodutora da bomba de efluxo NorA.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material Vegetal e Extração

Folhas de *Annona coriacea* Mart. foram coletadas no Piauí no município de Campo Maior, coordenadas S 05° 02' 51.7" W 42° 46' 57.3" altitude 98m, em março de 2017. Um voucher foi incorporado ao Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob o número de exsicata TEPB 30.764.

As folhas foram submetidas ao processo de secagem à temperatura ambiente em local arejado, moídas em moinho de facas e submetidas ao procedimento de extração por maceração a frio com renovação de solvente a cada três (3) dias por duas vezes consecutivas, com hexano e etanol e remoção do solvente por destilação. Os extratos foram mantidos refrigerados (-5 ° C) em frasco âmbar, até o momento da utilização.

2.2 Screening Fitoquímico

A identificação fitoquímica qualitativa de metabólitos secundários das folhas de *A. coriacea* seguiu a metodologia descrita por [26].

2.3 Cepas e Drogas

A atividade antimicrobiana intrínseca dos extratos foi avaliada contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228); Bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* HUT 001), e contra os fungos *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida krusei* ATCC 34135.

O efeito modulador na resistência à fluoroquinolona foi investigado apenas em *S. aureus* SA1199-B, que superexpressa o gene NorA que codifica a bomba de efluxo NorA [27]. As cepas bacterianas foram mantidas em Agar Nutriente (Himedia, Índia, Mumbai) a 4 ° C.

Antes do uso em ensaios, as células foram cultivadas durante a noite a 37 ° C em Brain Heart Infusion (BHI; Himedia). As *Candidas* foram mantidas em ágar Sabouraud Dextrose (SDA, Himedia, Índia) a 4 ° C. Antes do uso em células de ensaio cultivadas durante a noite a 37 ° C (SDB, Himedia, Índia). Norfloxacin (Nor), brometo de etídio (EtBr) e clorpromazina (CPZ) foram obtidos da Sigma Chemical Corp. St. Louis, EUA.

Os antibióticos foram dissolvidos em água estéril e os EEAC e EHAC foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO-MERCK) e depois diluídos com água estéril. O DMSO na sua concentração final mais alta após a diluição em caldo (4,8%) não inibiu o crescimento microbiano.

2.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana Intrínseca

Soluções estoques de EEAC e EHAC foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), e diluída em água estéril para uma concentração final $1024 \mu\text{g. mL}^{-1}$. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas por ensaio de microdiluição em meio BHI com suspensões bacterianas de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL e soluções de extratos variando de 8 a $512 \mu\text{g/mL}$. Placas de microdiluição foram incubadas a 37°C por 24 horas, o crescimento bacteriano foi monitorado pela redução irreversível da resazurina ($20 \mu\text{L}$, 0,01% (m/v)), caracterizada por uma mudança na cor de azul para rosa e a atividade antifúngica foi determinada por observação da turbidez, que é indicativa de crescimento fúngico [28,29].

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de fármaco na qual não houve crescimento bacteriano e fúngico. O grupo controle utilizado neste estudo consistiu de meio de cultura e inóculo sem adição de extratos.

2.5 Ensaio da Modulação da Resistência às Fluoroquinolonas

Para avaliar o efeito do EEAC e AHAC na modulação da resistência em *S. aureus* SA1199-B, as CIMs de norfloxacin e do brometo de etídio foram determinadas na presença ou na ausência de concentrações subinibitórias (1/8 e 1/4 da CIM) de EEAC e EHAC, conforme metodologia proposta [30]. Concentrações de antibióticos variaram de 128 a $0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas e as leituras dos poços foram realizadas após adição de resazurina sódica como descrito na sessão 2.4. Testes de controle também foram realizados substituindo EEAC e EHAC por clorpromazina (CPZ) que é um conhecido inibidor de bomba de efluxo [31].

2.6 Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram normalizados pelo cálculo dos valores das médias geométricas. As diferenças entre o tratamento com o antibiótico sozinho e a associação antibiótico-extrato foram examinadas pelo programa GraphPad Prism 6.0®, utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA), seguidas de pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados e Discussão

A pesquisa fitoquímica do EEAC e EHAC revelou a presença de compostos fenólicos como taninos, flavonóides, cumarinas e alcalóides. A ocorrência de flavonoides e taninos nos extratos analisados no presente estudo corroboram com os resultados previamente reportados no extrato hidroalcoólico das folhas de *A. coriacea* [32].

Extratos de plantas têm sido investigados como uma possível fonte de fitoquímicos com eficácia contra microrganismos resistentes a múltiplas drogas [33]. Concentrações inibitórias mínimas encontradas para EEAC e EHAC contra todas as cepas testadas apresentaram valores $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$ (**Tabela 1**), indicando que eles não têm, por exemplo, atividade antimicrobiana intrínseca contra *E. coli* nas concentrações consideradas relevantes, testadas clinicamente [34].

Tabela 1 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do extrato etanólico (EEAC) e extrato hexânico de *Annona coriacea* Mart. (EHAC) contra diferentes cepas microbianas.

Microrganismos	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	EHAC	EEAC
<i>Staphylococcus aureus</i> SA1199-B	≥ 1024	≥ 1024
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	≥ 1024	≥ 1024
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	≥ 1024	≥ 1024
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	≥ 1024	≥ 1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HUT 001	≥ 1024	≥ 1024
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	≥ 1024	≥ 1024
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	≥ 1024	≥ 1024

Média geométrica de três experimentos simultâneos

Fonte: Autor (2019).

Um estudo anterior verificou que os taninos presentes no extrato etanólico de *Annona crassiflora* Mart. foram considerados como os principais agentes antimicrobianos contra *S. aureus* e *E. coli* [35]. Também já foi demonstrado que os flavonóides presentes na fração diclorometano do extrato de *Annona glabra* L. eram os responsáveis pelo seu efeito

antibacteriano contra diferentes cepas de *P. aeruginosa* [36]. Compostos fenólicos, como os taninos, atuam sobre esses microorganismos por adsorção as membranas celulares, interação com enzimas e privação de íons metálicos ou por inibição direta da fosforilação oxidativa [37].

Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos com o extrato hidroetanólico das folhas de *Annona muricata* L. com uma CIM $\geq 1024 \mu\text{g. mL}^{-1}$ contra *E. coli* e *S. aureus* [38] e com extratos etanólicos e metanólicos de Atemoia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) que apresentaram valores de CIM acima de $1024 \mu\text{g. mL}^{-1}$, quando testados contra cepas padrões e resistentes de *S. aureus* [39]. No entanto, uma fraca atividade antimicrobiana, CIM $\geq 512 \mu\text{g. mL}^{-1}$, foi obtida para os extratos hidroalcoólicos das folhas de *Annona coriacea* Mart.[32].

Apesar de apresentarem uma atividade antimicrobiana clinicamente irrelevante contra as cepas testadas, os EEAC e EHAC foram capazes de modular a resistência à norfloxacin contra a cepa *S. aureus* SA1199-B (**Figura 1**). A norfloxacin é um antibiótico da classe das fluoroquinolonas, que atua por inibição da replicação do DNA [40].

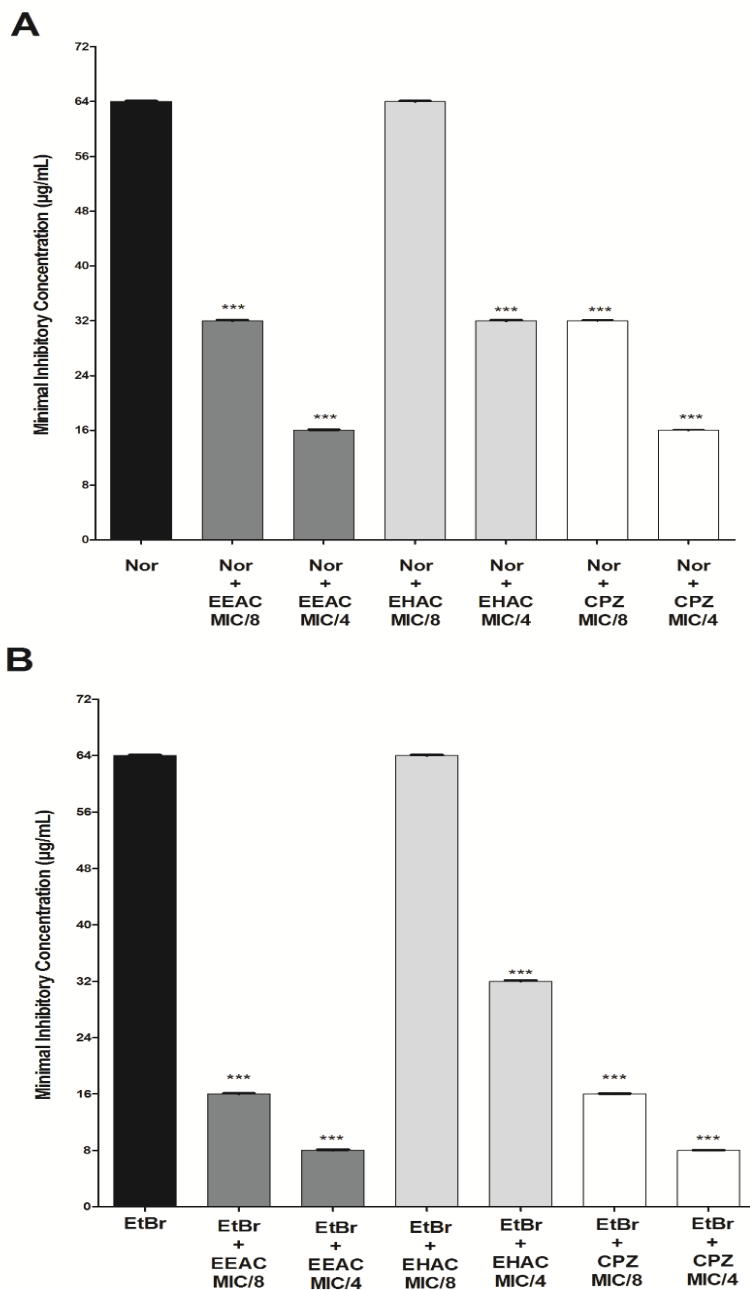
O EEAC em concentrações sub-inibitórias reduziu a CIM de norfloxacin de $64 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para $32 \mu\text{g. mL}^{-1}$ e $16 \mu\text{g. mL}^{-1}$, respectivamente. O HEAC foi menos efetivo e reduziu a CIM de norfloxacin para $32 \mu\text{g. mL}^{-1}$ somente na maior concentração testada (**Figura 1A**), indicando que o etanol foi o solvente mais efetivo na extração de moduladores de resistência a fitoquímicos do que o hexano. O efeito modulador do EEAC foi semelhante ao encontrado para CPZ, com uma redução de 4 vezes do MIC inicial de norfloxacin.

Resultados semelhantes foram obtidos com a espécie *Annona squamosa* L., cuja atividade antimicrobiana intrínseca do seu extrato etanólico foi irrelevante, no entanto foi capaz de potencializar a atividade de aminoglicosídeos, contra cepas resistentes de *S. aureus* e de *E. coli* [41]. Apesar de efetivo efeito sinérgico com fluoroquinolonas o extrato hidroalcoólico de *A. coriacea* Mart. quando testado contra aminoglicosídeos apresentou efeito antagônico [32].

Compostos naturais ou sintéticos podem potencializar o efeito de um antibiótico específico ao inibir seu transporte por bombas de efluxo, como ocorre em *S. aureus* [42,43]. O efeito modulador obtido com os extratos de *A. coriacea* Mart. em combinação com a norfloxacin pode estar associado à presença de fitoquímicos capazes de inibir a bomba de efluxo NorA produzida pela cepa de *S. aureus* SA1199B. Para testar esta hipótese, foram realizados ensaios de modulação em que o antibiótico foi substituído por brometo de etídio (EtBr). O EtBr tem sido utilizado como controle positivo para avaliar a inibição de bombas de efluxo, pois a resistência a esse agente intercalante de DNA ocorre exclusivamente através de bombas de efluxo [44,45,31].

Os resultados obtidos mostraram que o EEAC reduziu em 4 e 8 vezes (64 para 16 e para 8 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) a CIM do brometo de etídio (EtBr), enquanto o EHAC reduziu a CIM do EtBr em apenas 2 vezes (8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (**Figura 1B**).

Figura 1 - CIMs da Norfloxacin (Nor) e do Brometo de Etídio (EtBr).



1A - CIMs da Norfloxacin (Nor) na presença e na ausência do EEAC, HEAC e Clorpromazina (CPZ) contra *S. aureus* SA1199-B. 1B - CIMs do Brometo de Etídio (EtBr) na presença e na ausência do EEAC, HEAC e Clorpromazina (CPZ) contra *S. aureus* SA1199-B. Cada resultado é a média geométrica de três experimentos simultâneos. (****) Valores estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).

Fonte: Autor (2019).

Este efeito é mais forte com o extrato etanólico, provavelmente devido à ação dos fenóis que são melhor recuperados em extratos com solventes polares [46].

A triagem fitoquímica mostrou a presença de flavonoides, alcaloides e cumarinas tanto no EEAC quanto no EHAC (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Resultados do *screening* fitoquímico das folhas de *Annona coriacea* Mart.

Metabólitos secundários / Testes realizados	EHAC	EEAC
Taninos	+	++
Flavonoides (AlCl ₃)	+	++
Triterpenos/esteroides	+	+
Saponinas	++	-
Cumarinas	+	+
Quinonas	-	-
Alcaloides	+	+

(-) Ausência; (+) Presença; (++) Muito expressivo.

Fonte: Autor 2019.

Estudos anteriores evidenciaram que flavonoides [47], alcaloides [44] e cumarinas [48], metabólitos secundários presentes nos EEAC e EHAC, foram capazes de inibir o a bomba de efluxo NorA. O efeito modulador na resistência à norfloxacin em *S. aureus* SA1199-B demonstrado pelo extrato etanólico das folhas de *Bauhinia forficata* Link foi atribuído aos seus taninos e flavonóides [49]. O efeito modulador de *Annona squamosa* L. também foi correlacionado ao conteúdo fenólico presente no extrato de suas folhas [41]. Compostos fenólicos, como o ácido cafeico e ácido gálico, foram eficazes na reversão da resistência às fluoroquinolonas contra o *S. aureus* SA-1199B [13].

Os resultados obtidos nesse estudo com o EEAC são promissores, visto que a superexpressão de bombas de efluxo de múltiplas drogas é um dos principais mecanismos de resistência bacteriana às fluoroquinolonas, antimicrobianos ainda utilizados no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes a múltiplas drogas [11,12,13]. Assim, a inibição do NorA torna-se um alvo promissor na terapia antimicrobiana [50].

4. Conclusão

Os extratos EEAC e EHAC de *Annonac coriacea* Mart., não apresentaram atividade antimicrobiana intrínseca contra os microrganismos testados. No entanto quando combinados com a norfloxacin (NoR) e com o brometo de etídio (EtBr), esses extratos em concentrações subinibitórias apresentaram uma redução da CIM do antibiótico e do EtBr, provavelmente devido a presença de fitoquímicos capazes de inibir a bomba de efluxo NorA. Tais fitoquímicos presentes nas folhas de *A. coriacea* Mart. são promissores como candidatos ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas direcionados ao tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* superprodutora de NorA.

Referências

- [1] D'Costa VM, King, CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011; 477: 457- 461. [https://doi.org/ 10.1038/nature10388](https://doi.org/10.1038/nature10388).
- [2] World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014. World Health Organization.
- [3] Nathan C, Cars O. Antibiotic resistance- problems, progress, and prospects. *N Engl J Med* 2014; 371: 1761-1763. [https://doi.org/ 10.1056 / NEJMp1408040](https://doi.org/10.1056/NEJMp1408040).
- [4] Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. The negative impact of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2016; 22: 416-422. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.002>.
- [5] Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc*. 2012; 87: 198-208. [https://doi.org/ 10.1016 / j.mayocp.2011.12.003](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.003)
- [6] Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Ver*. 2015; 28 :337-418. [https://doi.org/10.1128 / CMR.00117-14](https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14)
- [7] Holler JG, Christensen SB, Slotved HC, Rasmussen HB, Gúzman A, Olsen CE, Petersen B, Mølgaard, P. Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67:1138-1144. [https://doi.org/ 10.1093 / jac / dks005](https://doi.org/10.1093/jac/dks005)
- [8] Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2009; 69:1555-1623. [https://doi.org/ 10.2165 / 11317030-000000000-00000](https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000).
- [9] Spengler G, Kincses A, Gajdács M, Amaral L. New roads leading to old destinations: efflux pumps as targets to reverse multidrug resistance in bacteria. *Molecules*. 2017; 22: 468. [https://doi.org/ 10.3390 / molecules22030468](https://doi.org/10.3390/molecules22030468).
- [10] Markham PN, Neyfakh AA. Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996. [https://doi.org/40:2673–2674.10.1128 / AAC.40.11.2673](https://doi.org/10.1128/AAC.40.11.2673).
- [11] Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 2595-2599. [https://doi.org/ 10.1128 / AAC.44.10.2595-2599.2000](https://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2595-2599.2000).
- [12] Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007; 128:1037-1050. [https://doi.org/ 10.1016 / j.cell.2007.03.004](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004)
- [13] Santos JF, Tintino SR, Freitas TS, Campina FF, Irwin RDA, Siqueira-Júnior JP, Coutinho HDM, Cunha FA. In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2018; 57: 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.03.001>
- [14] Crowcroft NS, Catchpole M. Mortality from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in England and Wales: analysis of death certificates. *Bmj*. 2002; 325:1390-1391. <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7387.501/a>

- [15] Gebremariam T, Zelelow YB. A systematic review of antimicrobial resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Saudi J Health Sci*. 2014; 3: 71–74. <https://doi.org/10.4103 / 2278-0521.134848>.
- [16] Shalayel MHF, Asaad AM, Qureshi MA, Elhussein AB. Anti-bacterial activity of peppermint (*Mentha piperita*) extracts against some emerging multi-drug resistant human bacterial pathogens. *J Herb Med*. 2017; 7: 27-30. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2016.08.003>
- [17] Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 2008; 15: 639-652. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.06.008>
- [18] Abreu AC, Mcbain AJ, Simoes M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat Prod Rep*. 2012; 29: 1007-1021. <https://doi.org/10.1039/c2np20035j>.
- [19] Barreto HM, Fontinele FC, Oliveira AP, Arcanjo DDR, Santos BHC, Abreu APL, Coutinho HDM, Silva RAC, Sousa TO, Medeiros MdF, Citó AML, Lopes JAD. Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity in vitro by *Lippia origanoides* H.B.K. in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Res Int*. 2014; 1–7. <https://doi.org/10.1155 / 2014/305610>.
- [20] Paulino-Neto HF. Polinização e biologia reprodutiva de Araticum-liso (*Annona coriacea* Mart.: Annonaceae) em uma área de cerrado paulista: implicações para fruticultura. *Rev Bras Frut*. 2014; 36:132-140. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500016>.
- [21] Santos AF, SAnt’ana AE. The molluscicidal activity of plants used in Brazilian folk medicine. *Phytomedicine*. 2000; 6: 431–438. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80071-9](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80071-9)
- [22] Tempone AG, Borborema ST, Andrade Jr HF, Gualda NCA, Yogi A, Carvalho CS, Bachiega D, Lupo FN, Bonotto SV, Fischer DCH. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*. 2005; 12: 382-390. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.10.007>
- [23] Mesquita MI, Grellier P, Mambu I, Paula JE, Espindola LS. in vitro antiplasmodial activity of brazilian cerrado plants used as traditional remedies. *J Ethnopharmacol*. 2007; 110:165-170. <https://doi.org/10.1016 / j.jap.2006.09.015>.
- [24] Toledo CE, Britta EA, Ceole LF, Silva ER, Mello JC, Dias Filho BP, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. *J Ethnopharmacol*. 2011; 133:420-425. <http://dx.doi.org/10.1016 / j.jep.2010.10.021>.
- [25] Almeida-Apolonio AAD, Dantas FGDS, Rodrigues AB, Cardoso CAL, Negri M, Oliveira KMPD, Chang MR. Antifungal activity of *Annona coriacea* Mart. ethanol extracts against the aetiological agents of *cryptococcosis*. *Nat Prod Res*. 2018; 1-5. <http://dx.doi.org/10.1080 / 14786419.2018.1440221>.
- [26] Matos FJA. Introdução à fitoquímica experimental. Coleção Ciência. Edições UFC, Fortaleza.1997.

- [27] Kaatz GW, Seo SM. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39: 2650–2655.8. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.39.12.2650>
- [28] Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Sarker SD, Moore, J.E., Rao, J.R. and Mazumdar, A. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *Food Sci Technol.* 2011; 44:1199–1206. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.10.005>.
- [29] Tintino SR, Oliveira-Tintino CDM, Campina FF, Silva RLP, Costa MS, Menezes IRA, Calixto-Júnior JT, Siqueira-Junior JP, Coutinho HDM, Leal-Balbino TC, Balbino VQ. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathogenesis.* 2016; 97: 9-13. <https://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.003>.
- [30] Coutinho HDM, Costa JGM, Falcao-Silva VS, Siqueira Junior JP, Lima EO. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. *J Med Food.* 2010; 13: 1024-1026. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0158>
- [31] Markham PN, Westhaus E, Klyachko K, Johnson ME, Neyfakh AA. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2404-2408. <https://doi.org/10.1128/aac.43.10.2404>
- [32] Siqueira-Júnior JG, Coutinho HD, Boris TC, Cristo JS, Pereira NL, Figueiredo FG, Cunha FA, Aquino PE, Nascimento PA, Mesquita FJ, Moreira PH, Coutinho ST, Souza IT, Teixeira GC, Ferreira NM, Farina EO, Torres CM, Holanda VN, Pereira VS, Guedes MI. Chemical characterization and cytoprotective effect of the hydroethanol extract from *Annona coriacea* Mart. (Araticum). *Pharmacognosy Res.* 2016; 8: 253. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.188882>
- [33] Marathe NP, Rasane MH, Kumar H, Patwardhan A, Shouche YS, Diwanay SS. *In vitro* antibacterial activity of *Tabernaemontana alternifolia* (Roxb) stem bark aqueous extracts against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2013; 12: 1-8. <https://doi.org/doi:10.1186/1476-0711-12-26>.
- [34] Houghton PJ, Howes M.-J, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 110: 391-400. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.032>
- [35] Ribeiro ICO, Mariano EGA, Careli RT, Morais-Costa F, de Sant'Anna FM, Pinto MS, de Souza MR, Duarte ER. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. *BMC Vet Res.* 2018; 14: 32. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1351-1>
- [36] Galvão SS, Monteiro AS, Siqueira EP, Bomfim MR, Dias-Souza MV, Ferreira GF, Denadai AM, Santos ÁR, Lúcia Dos Santos V, de Souza-Fagundes EM, Fernandes ES, Monteiro-Neto V. *Annona glabra* flavonoids act as antimicrobials by binding to *Pseudomonas aeruginosa* cell walls. *Front Microbiol.* 2016; 7: 2053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02053>.
- [37] Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* 1991; 30: 3875-3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L).

- [38] Bento EB, Matias EFF, Brito Jr FE, Oliveira DR, Coutinho HDM, Costa JGM, Kerntopf MR, Menezes IRA. Association between food and drugs: antimicrobial and synergistic activity of *Annona muricata* L. 2013; 16: 738-744. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.565905>
- [39] Rabêlo SV, Costa MMD, Libório RC, Almeida JRGDS. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts from atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). Rev Bras Frut. 2014; 36: 265-271. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500031>
- [40] Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. Biochemistry. 2014; 53: 1565-574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- [41] Fernandes C, Tintino S, Morais-Braga MF, Araújo A, Coutinho H, Menezes IRA, Kerntopf MR. Phytochemical prospecting, modulator and antibacterial activity of aminoglycosides of the extract and fractions of the *Annona squamosa*. Ethnobiology and Conservation, 2013; 2. <http://dx.doi.org/10.15451/ec2013-8-2.9-1-08>.
- [42] Araújo RS, Barbosa-Filho JM, Scotti MT, Scotti L, da Cruz RM, Falcão-Silva Vdos S, de Siqueira-Júnior JP, Mendonça-Junior FJ. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* with coumarin derivatives. Scientifica. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6894758>.
- [43] Madeiro SA, Borges NH, Souto AL, de Figueiredo PT, Siqueira-Junior JP, Tavares JF. Modulation of the antibiotic activity against multidrug resistant strains of coumarins isolated from Rutaceae species. Microb Pathog. 2017; 104:151-154. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.028>.
- [44] Costa LM, Macedo EV, Oliveira FAA, Ferreira JHL, Gutierrez SJC, Pelaez WJ, Lima FCA, Siqueira Junior JP, Coutinho HDM, Kaatz, Freitas VRM, Barreto HM. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. J. Appl. Microbiol. 2016; 121:1312-1322. <https://doi.org/10.1111/jam.13258>
- [45] Dantas N, Aquino TM, Araújo-Júnior JX, Silva-Júnior E, Gomes EA, Gomes AAS, Mendonça-Junior FJB. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump. Chem Biol Interact. 2018; 280: 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.009>
- [46] Ignat I, Vol, I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chem. 2011; 126:1821-1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>.
- [47] Wang SY, Sun ZL, Liu T, Gibbons S, Zhang WJ, Qing M. Flavonoids from *Sophora moorcroftiana* and their synergistic antibacterial effects on MRSA. Phytother Res. 2014; 28: 1071–1076. <https://doi.org/10.1002/ptr.5098>
- [48] Roy SK, Kumari N, Pahwa S, Agrahari UC, Bhutani KK, Jachak SM, Nandanwar H. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. Fitoterapia. 2013; 90:140-150. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.07.015>.
- [49] Sousa JN, Oliveira ABM, Ferreira AK, Silva E, Sousa LMS, Rocha, MCF, Siqueira Júnior JP, Júnior S, Kaatz GW, Almeida JRGS, Souza, J. S. N. Modulation of the resistance to norfloxacin in *Staphylococcus aureus* by *Bauhinia forficata* link. Nat Prod Res. 2019; 1-5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1590714>.

[50] Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Bombas de efluxo multidrogas em *Staphylococcus aureus*: uma atualização. Open Microbiol J. 2013; 7: 59–71. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010059>.

PÁGINAS RESTRITAS

120 À 122



Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico e farmacológico dos extratos etanólicos e hexânicos das folhas de *Annona coriacea* Mart. frente a ensaios fitoquímicos e bioensaios, os resultados permitiram as seguintes inferências:

- A prospecção científica e tecnológica revelou que a espécie possui diversas atividades biológicas e farmacológicas.
- Os extratos EEAC e EHAC possuem diversos metabólitos secundários importantes para atividades biológicas e farmacológicas, porém o EEAC possui maior quantidade de taninos, flavanoides e fenóis e apresenta maior atividade antioxidante.
- Os extratos EEAC e EHAC possuem atividade inibidora de AChE, com destaque para o EEAC (potente inibidor).
- Os extratos EHAC e EEAC mostraram boa atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*, porém mais estudos são necessários para conhecer o mecanismo de letalidade.
- Os EEAC e EHAC possuem elevada toxicidade sobre *Artemia salina*, indicando uma possível atividade antiproliferativa.
- Os extratos EEAC e EHAC de *A. coriacea*, não possuem atividade antimicrobiana.
- Quando combinados com o antibiótico da classe das fluoroquinolonas e com o brometo de etídio, os EHAC e EEAC em concentrações subinibitórias apresentaram uma redução significativa da CIM desse antibiótico, provavelmente pelo mecanismo de inibição da bomba de efluxo NorA.
- A sinergia maior foi observada com o EEAC, que também apresentou um maior conteúdo de fenóis.
- Compostos obtidos de *A. coriacea* Mart. são promissores candidatos à pesquisa e ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos direcionados à multirresistência bacteriana, atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* bem como inibidor de AChE e atividade antiproliferativa.
- Quando associados ao fluconazol os extratos EEAC e EHAC apresentaram atividade moduladora frente a *Candida albicans* e *Candida krusei*.

- O extrato EEAC apresentou inibição da corrosão em placas de aço, minimizando a oxidação do ácido.
- A fração diclorometano dos extratos EEAC e EHAC não apresentaram atividade antimicrobiana e moduladora, quando combinados com o antibiótico da classe das fluoroquinolonas e com o brometo de etídio.



Perspectivas

PERSPECTIVAS

A descoberta de medicamentos em produtos naturais é um dos principais contribuintes para resolver os desafios globais de saúde e alcançar metas de desenvolvimento sustentável em saúde. A espécie *Annona coriacea* Mart. mostrou-se promissora apresentando diversas propriedades biológicas e farmacológicas.

Conforme os resultados encontrados e outras indagações decorrentes de estudos relatados na literatura com a espécie *Annona coriacea* Mart., vislumbramos as seguintes perspectivas para continuidade desse estudo:

- Isolar os constituintes químicos, visando a identificação dos seus princípios ativos.
- Pesquisar a atividade genotóxica e antígenotóxica.
- Realizar estudo de atividade antiproliferativa.
- Investigar a alta mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*.
- Desenvolver bioprodutos com aplicação frente as atividades mais promissoras.

Pesquisas científicas podem contribuir para a conservação da vegetação natural e a sustentabilidade dos sistemas de produção semi-naturais. Espera-se que mais atividades sejam desenvolvidas tanto em *in vitro* como *in vivo*, e que os resultados forneçam subsídios promissores para a produção de novas substâncias biologicamente ativas e que possam agregar valores a biodiversidade dos biomas brasileiros por meio do conhecimento químico e da utilização sustentável dessa espécie.



Anexos

**ANEXO A – DECLARAÇÃO DO DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE
SUBMETIDO AO INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL POR
MEIO DO NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA TECNOLÓGICA NA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ.**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA - PROPESQ
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638*

DECLARAÇÃO

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, DECLARA para as finalidades de direito, a requerimento de CLAUZENIRA BANDEIRA DA SILVA – Doutoranda, que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE com data de entrada neste órgão em 29/01/2019, cujo título denomina-se “O USO DO EXTRATO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE ANNOMA CORIACEA MART. (ANNONACEAE) EM FORMULAÇÃO COM AÇÃO LARVICIDA, SOBRE AEDES AEGYPTI, E MODULADORA DA AÇÃO ANTIBIÓTICA DAS FLUOROQUINOLONAS”, do qual a solicitante participa como inventor (a), e que está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (IN 031/13 e LPI 9.279/96 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 30 de janeiro de 2019.

Prof.^a Dr.^a Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI