

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MYRELE MOAMA GOMES DE FARIAS

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
MODULADORA DA CASCA E POLPA DO FRUTO DE *Annona squamosa* L.**

Juazeiro do Norte – CE
2018

MYRELE MOAMA GOMES DE FARIAS

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
MODULADORA DA CASCA E POLPA DO FRUTO DE *Annona squamosa* L.**

Artigo científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues

MYRELE MOAMA GOMES DE FARIAS

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
MODULADORA DA CASCA E POLPA DO FRUTO DE *Annona squamosa* L.**

Artigo científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues
Orientadora

Prof^a. Ma. Amanda Karine de Souza
Examinador 1

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Examinador 2

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DA CASCA E POLPA DO FRUTO DE *Annona squamosa* L.

Myrele Moama Gomes de Farias¹, Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues²

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo determinar o perfil químico e avaliar a atividade antibacteriana da polpa e casca do fruto de *Annona squamosa*. Para este estudo foi preparado o extrato etanólico da polpa e casca da espécie *Annona squamosa* por extração a frio com etanol e em seguida o extrato bruto foi utilizado para a determinação da prospecção fitoquímica através da adição de reagentes específicos. A avaliação da atividade antibacteriana e moduladora foi feita pela metodologia de microdiluição. O extrato etanólico da polpa de *Annona squamosa* (EEPAS) apresentou positividade para flavonas, flavonóis, xantonas e catequinas, e o extrato etanólico das cascas de *Annona squamosa* (EECAS) evidenciou a presença de taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantona, chalconas, auronas e leucoantocianidinas. O EECAS foi capaz de inibir as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* multirresistente e *Staphylococcus aureus* multirresistente. O EEPAS não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, podendo apresentar efeitos em concentrações acima de 1024 µg/mL. O extrato da casca de *Annona squamosa* exibiu atividade antibacteriana para a maioria das bactérias testadas e apresentou mais compostos fenólicos do que o extrato da polpa de *Annona squamosa*, o qual não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana nas condições estudadas, sugerindo correspondência entre a atividade antimicrobiana apresentada e o teor de compostos fenólicos totais. O EEPAS não apresentou atividade antibacteriana nas concentrações testadas mas em associação com os antibióticos demonstrou sinergismo. O EECAS apresentou sinergismo com todos os antibióticos testados e foi capaz de reduzir o crescimento microbiano de forma mais eficiente do que quando a droga foi testada isoladamente.

Palavras chaves: *Annona squamosa*. Atividade antibacteriana. Sinergismo.

PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY CASTLE AND FRUIT PULP MODULE OF *Annona squamosa* L.

ABSTRACT

The present study aims to determine the chemical profile and to evaluate the antibacterial activity of the squash and pulp of *Annona squamosa*. For this study the ethanolic extract of the pulp and bark of the *Annona squamosa* species was prepared by cold extraction with ethanol and then the crude extract was used for the determination of the phytochemical prospection through the addition of specific reagents. The evaluation of the antibacterial and modulating activity was done by microdilution methodology. The ethanol extract from the *Annona squamosa* (EEPAS) pulp showed positivity for flavones, flavonols, xanthenes and catechins, and the ethanolic extract from the shells of *Annona squamosa* (EECAS) evidenced the presence of condensed tannins, flavones, flavonols, xanthenes, chalcones, aurones and leucoanthocyanidins. EECAS was able to inhibit strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

¹ Discente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio –UNILEÃO, myrelemoama@gmail.com; Juazeiro do Norte-CE

² Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio-UNILEÃO, fabiola@leaosampaio.edu.br; Juazeiro do Norte-CE

aureus, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, multiresistant *Escherichia coli* and multiresistant *Staphylococcus aureus*. EEPAS showed no antimicrobial activity at the concentrations tested, and may have effects at concentrations above 1024 ug / mL. *Annona squamosa* shell extract exhibited antibacterial activity for most of the bacteria tested and presented more phenolic compounds than the *Annona squamosa* pulp extract, which showed no antimicrobial activity under the conditions studied, suggesting a correspondence between the antimicrobial activity presented and the total phenolic compounds content. EEPAS did not present significant results in microdilution, but in association with antibiotics there was considerable inhibition, indicating that it has compounds with synergism potential. EECAS showed clear synergism with all tested antibiotics and was able to reduce microbial growth more efficiently than when the drug was tested alone. The results indicate that the use of the *Annona squamosa* fruit peel extract alone and the pulp and bark extract in combination with antibiotics in the fight against pathogenic bacteria are promising.

Keywords: *Annona squamosa*. Antibacterial activity. Synergism.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são amplamente utilizadas desde as civilizações antigas por vários povos e de diversas maneiras. Atualmente, cerca de 80% da população utiliza recursos da medicina popular para tratamento de alguma doença tanto por seu fácil acesso, quanto pela tradição familiar e cultural desse tipo de tratamento e além de ser a única forma de recurso terapêutica para uma parte da população (GOMEZ et al., 2016; WANDERLEY et al., 2015).

Os frutos destas plantas também possuem diversos constituintes com propriedades terapêuticas e o seu consumo está sendo amplificado em todo o mundo devido a sua composição fonte de fibras, vitaminas, minerais e compostos antioxidantes (MORAIS et al., 2017; SUCUPIRA et al., 2012).

Algumas pesquisas relataram que o consumo de frutas pertencentes à família Annonaceae, e de seus subprodutos, como sementes, cascas, raízes, caules e folhas, está relacionado à redução do desenvolvimento de doenças crônico degenerativas, por possuírem substâncias antioxidantes. Esse estudo incentiva o aproveitamento dos subprodutos de frutas na aplicação em indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (MCLAUGHLIN, 2008; JIMÉNEZ et al., 2014).

A família Annonaceae é composta por cerca de 150 gêneros e cerca de 2500 espécies que estão presentes principalmente nas regiões tropicais do mundo. As espécies desta família são utilizadas para diversas ações: tratamento de epilepsia, infecção por vermes, infecção bacteriana, febre e disúria (ALMEIDA et al., 2014; CHANDRASHEKAR; KULKARNI, 2011; PAES et al., 2016).

A partir das folhas e sementes de *Annona squamosa* L., foram isolados monoterpenos e diterpenos, estes compostos estão relacionados com propriedades biológicas importantes, sendo comum o seu uso como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e anticarcinogênico (ALMEIDA, 2015; BASKARAN; PULLENCHERI; SOMASUNDARAM, 2016; NUNES, 2015).

Os principais microrganismos que geram prejuízos à saúde humana estão se tornando resistentes à uma grande parte dos antimicrobianos conhecidos, o que instiga a procura por antimicrobianos de procedência natural, por não apresentarem mecanismos de ação específicos. A ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais das plantas é devido aos seus metabólitos secundários, responsáveis por diversas atividades biológicas (PAULA, 2013; SARAIVA, 2012; SIMONETTI et al., 2016).

A resistência de várias espécies de microrganismo aos antimicrobianos altera de acordo com os países, regiões e a origem hospitalar ou comunitária das cepas. Apesar do surgimento de novos antimicrobianos, a resistência microbiana acontece em níveis elevados nos diferentes microrganismos, o que determina um grande desafio terapêutico (LOUREIRO et al., 2016; GOMES et al., 2018).

A resistência microbiana era restrita apenas aos hospitais, porém a facilidade de adquirir antibióticos tem aumentado sua taxa de ocorrência. Desta forma, é de grande importância a busca por novas opções de tratamento. A associação entre antibióticos e produtos naturais pode caracterizar uma alternativa de tratamento contra microrganismos patógenos e um grande aliado para combater a resistência microbiana. Neste contexto ressalta-se o grande avanço no uso de plantas medicinais no tratamento de diversas doenças. Estas que, por sua vez, já se consistiram, por um longo tempo, como essenciais para a terapêutica medicamentosa, atualmente retornam com força total ampliando as possibilidades de tratamento (LACERDA et al., 2016).

O presente estudo tem como objetivo determinar o perfil químico e avaliar a atividade antibacteriana e moduladora da polpa e casca do fruto de *Annona squamosa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bromatologia do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio e no Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Regional do Cariri –URCA.

2.2 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas polpas e cascas de frutos maduros da pinha (*Annona squamosa*), obtidos em feira livre no período de junho e julho de 2018 no município de Juazeiro do Norte-CE.

2.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Para obtenção do extrato etanólico foi utilizado o processo de extração a frio com etanol P.A. O extrato foi preparado com extração exaustiva das cascas e polpas dos frutos por imersão de 72 horas. Após esse período o extrato foi filtrado e o solvente destilado em evaporador rotativo a vácuo. Foi utilizado 38,53g de polpa liofilizada e 38,51g de casca liofilizada. O rendimento do extrato da polpa foi de 16,74% (6,45g) e o extrato da casca foi 3,68% (1,42g) (SIMÕES et al., 2010).

2.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os testes fitoquímicos foram utilizados para detectar a presença de metabólitos secundários como: flavonóides e taninos seguindo o método descrito por Matos (2009), os testes se baseiam na observação visual da alteração de cor e/ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos (SIMÕES et al., 2010).

2.5 MATERIAL BACTERIANO

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas linhagens padrão de bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Escherichia coli* 05 (multirresistente) e Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12624), *Streptococcus mutans* (ATCC 0446), *Bacillus cereus* (ATCC 33018) e *Staphylococcus aureus* 03 (multirresistente).

2.6 AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo com base no CLSI (2012). Ao anteceder o teste, as linhagens bacterianas foram ativadas em meio *brain heart infusion* (BHI 3,8 %) e mantidas na estufa por 24 horas. Após o primeiro cultivo o inóculo bacteriano foi padronizado a partir de uma suspensão com concentração de aproximadamente de 1×10^8 UFC/mL (turbidez da escala de McFarland). Em seguida, esta suspensão foi diluída em caldo BHI a 10 % então volumes de 100 µL foram adicionados e homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição com diluições em série. Em cada poço foi adicionado 100µL de solução de cada extrato e as concentrações finais dos extratos variaram entre 512 - 8 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após 24 h na estufa a 37 °C, a atividade antibacteriana foi detectada através do método colorimétrico, utilizando uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01 % (p/v), 25 µL desta solução foi adicionada em cada cavidade e as placas ficaram em um período de incubação de 1h em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa, ocorre devido à redução da resazurina, indica o crescimento bacteriano ou fúngico, auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada. Os experimentos foram realizados em triplicata (CLSI, 2012).

2.6.1 Atividade moduladora frente às bactérias

O teste de modulação foi realizado na presença e na ausência dos extratos através de microdiluição em triplicata. Para avaliar a atividade moduladora foram utilizados os CIM/ 8 dos extratos frente aos antibióticos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e antibióticos β-lactâmicos (cefalotina e benzilpenicilina). As linhagens bacterianas utilizadas foram inoculadas em BHI a 10% e armazenadas em estufa bacteriológica a 37° por 24 horas. O teste foi monitorado com um controle positivo contendo apenas antibióticos e os microrganismos. As concentrações adicionadas das drogas antibacterianas usadas nesse ensaio variaram de 1024-0,5µg/mL (COUTINHO et al., 2008).

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes microbiológicos foram analisados pelo ANOVA bidirecional seguido pelo teste de Bonferroni utilizando software Graphpad Prism 6.0. Os resultados em $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PERFIL QUÍMICO

O extrato etanólico da polpa de *Annona squamosa* (EEPAS) apresentou positividade para flavonas, flavonóis, xantonas e catequinas, e o extrato etanólico das cascas de *Annona squamosa* (EECAS) evidenciou a presença de taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantona, chalconas, auronas e leucoantocianidinas, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Resultado da prospecção fitoquímica do extrato etanólico da polpa e casca de *Annona squamosa*.

Classes De Metabólicos Secundários	EEPAS	EECAS
Fenóis	-	-
Taninos condensados	-	+
Antocianinas e Antocianidinas	-	+
Flavonas, Flavonóis e Xantona	+	+
Chalconas e Auronas	-	+
Flavononóis	-	-
Leucoantocianidinas	-	+
Catequinas	+	-
Flavononas	-	+

Legenda: (+) positivo; (-) negativo.

Na pesquisa realizada por Brito (2008), o extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* apresentaram positividade para alcalóides, flavonóides, flavononas, triterpenóides, esteróides, flavonas, flavonóis, xantonas, saponinas, taninos e resinas.

Plantas da família Annonaceae tem características químicas muito diversificadas e são reconhecidas como fontes de terpenóides (principalmente diterpenos), alcalóides

(especialmente os derivados do núcleo isoquinolínico), esteróides, polifenóis, flavonóides, compostos aromáticos, ácidos fenólicos, taninos, compostos benzênicos, catequinas, proantocianidina, óleos essenciais, acetogeninas, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, vitaminas, carotenos e saponinas (DIAS, 2014; SCOTTI et al., 2012).

No gênero *Annona* foram isoladas e identificadas as flavonas (luteonina) e flavonóis (caempferol, quercetina, ramnetina, rutina e isorramnetina) nas espécies *Annona crassiflora*, *Annona tomentosa*, *Annona monticola* e *Annona dolichorcharpa* (SANTOS; SALATINO, 2000).

Os flavonóides são grupos de interesse econômico e, principalmente, farmacológico, pois possuem atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas e sua síntese não ocorre na espécie humana, são exclusivos de origem vegetal. Outro metabólito secundário importante são os taninos que agem inibindo o crescimento bacteriano, provavelmente pela interação com a parede celular das bactérias, impedindo o transporte de nutrientes para a célula (GUIMARÃES, 2006; SILVA, 2015).

A propriedade mais descrita das antocianinas é sua ação antioxidante, mas também apresenta outros efeitos benéficos no organismo humano como atividade anticancerígena, alívio da inflamação crônica, diminuição da hipertensão arterial e regulação da síndrome metabólica (SANTOS, 2014).

3.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O EECAS foi capaz de inibir as cepas de *Escherichia coli* padrão e multirresistente, *Staphylococcus aureus* padrão e multirresistente, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, como mostra a Tabela 2.

Tanto o EEPAS quanto o EECAS não demonstraram atividade antibacteriana contra a cepa de *Bacillus cereus* ATCC 33018, resultados contrários foram encontrados nas folhas de *Annona squamosa* que foi capaz de inibir esta bactéria (DHOLVITAYAKHUN et al., 2013).

No estudo realizado por Aher, Shinde; Chavan (2012) o extrato das sementes de *Annona squamosa* inibiu as cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. E o extrato das folhas de *Annona squamosa* teve ação contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* multirresistente, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (ABDULMUSHIN, 2017, CHANDRASHEKAR, 2011; GHADIR, ABEER; EMAN, 2014).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) do EECAS e EEPAS com bactérias Gram positivas e Gram negativas.

BACTÉRIAS	Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato da casca ug/ mL	Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato da polpa ug/ mL
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	512	1024
<i>Escherichia coli</i>	512	1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	64	1024
<i>Bacillus cereus</i>	1024	1024
<i>Streptococcus mutans</i>	512	1024
<i>Staphylococcus aureus</i>	512	1024
<i>Escherichia coli</i> MDR	64	1024
<i>Staphylococcus aureus</i> MDR	64	1024

Nenhuma das concentrações testadas do EEPAS apresentou atividade de relevância clínica, sendo todos os resultados $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, de acordo com Silva; Antunes; Catão (2011) que utilizou a polpa de *Annona muricata* e também não apresentou efeitos significativos, este resultado pode ter ocorrido devido a pequenas concentrações de compostos fenólicos apresentados por este extrato, pois pesquisas têm relacionado à atividade antimicrobiana de fontes naturais com a presença de compostos bioativos, principalmente aos compostos fenólicos (MAIER et al., 2009; OUATTARA et al., 2011).

O EECAS foi eficaz contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo bastante ativo contra *K. pneumoniae* com CIM de $64 \mu\text{g} / \text{mL}$, no estudo realizado por Pinto (2017), resultados semelhantes foram encontrados com o extrato das folhas de *Annona squamosa* que frente a esta bactéria apresentou CIM de $78 \mu\text{g} / \text{mL}$.

O extrato da casca de *Annona squamosa* exibiu atividade antibacteriana para a maioria das bactérias testadas e apresentou mais classes de metabólitos secundários do que o extrato da polpa de *Annona squamosa*, o qual não apresentou atividade antimicrobiana nas condições estudadas, sugerindo correspondência entre a atividade antimicrobiana apresentada e o teor de compostos fenólicos totais.

As infecções provocadas por microrganismos multirresistentes estão entre as principais causas de morte no Brasil, associadas com as neoplasias, doenças respiratórias e cardiovasculares. A inclusão de antimicrobianos no tratamento representa um grande avanço para a saúde pública, porém não estão sendo totalmente eficientes contra diversos microrganismos que adquiriram resistências a estes medicamentos. O EECAS mostrou uma alta

inibição contra as bactérias *Escherichia coli* multirresistente e *Staphylococcus aureus* multirresistente mesmo em concentrações baixas como 64 ug/ mL, podendo futuramente com mais estudos se tornar uma boa solução no tratamento de enfermidades causadas por estas cepas bacterianas (GOMES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017; VIEIRA; VIEIRA, 2017).

A inibição do crescimento bacteriano pelo extrato vegetal pode estar associada as ações do conjunto de metabólitos secundários presentes na planta. Compostos fenólicos como taninos podem ser tóxicos para microrganismos devido à inativação de enzimas e proteínas transportadoras da parede celular. Enquanto, os flavonóides podem se complexar com proteínas extracelulares e interferir na expressão de genes. Já, os flavonóides lipofílicos podem romper a membrana plasmática microbiana (ALENCAR, 2015)

De acordo com Dholvitayakhun et al (2017) o extrato das folhas de *Annona squamosa* inibiu o crescimento bacteriano ao interromper a formação de peptidoglicano, ocorrendo provavelmente a morte celular devido à perda de força mecânica e lise osmótica da parede, possivelmente o efeito antibacteriano das cascas ocorram desta maneira, devido aos mesmos compostos bioativos presentes nas folhas e cascas.

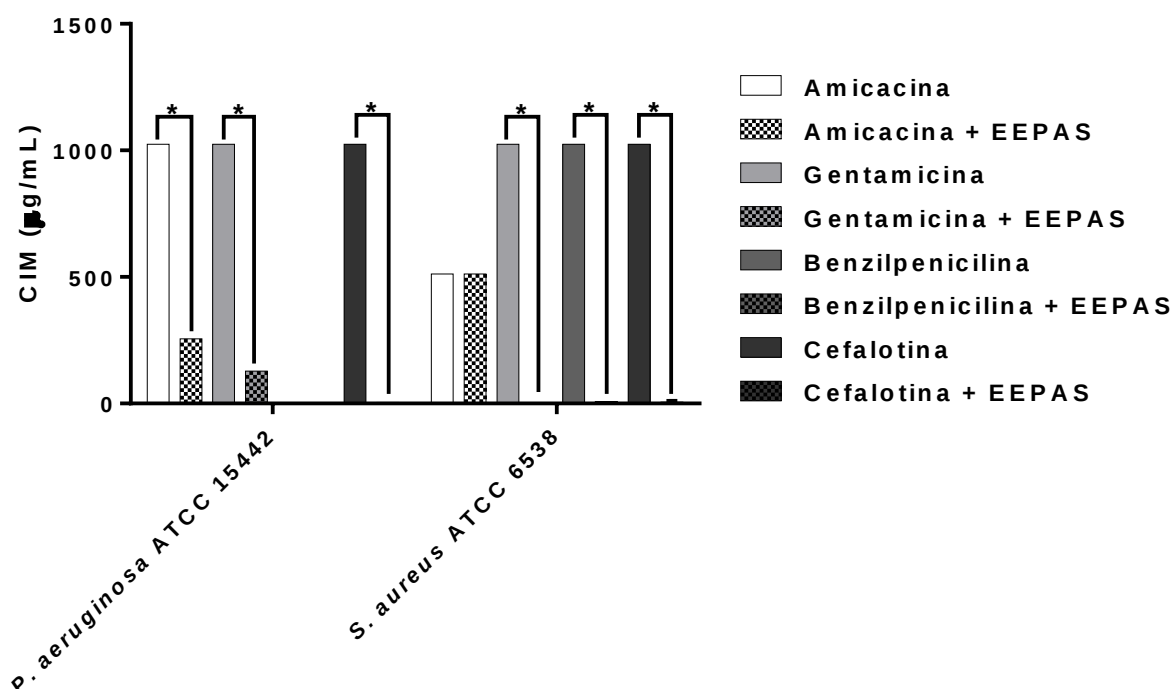
Estes resultados sugerem que as cascas da fruta tropical *Annona squamosa* pode ser fonte valiosa de compostos bioativos. Além de fornecer informações sobre o potencial farmacológico do EECAS que pode ser usado como matéria-prima para o desenvolvimento de novas drogas capazes de tratar várias doenças futuramente. Os estudos das cascas de frutas são importantes, pois ao se descobrir seus efeitos benéficos ao organismo humano, a população pode começar a utilizar esta parte da planta e com isso diminuir a quantidade de resíduos gerados e contribuir para a sustentabilidade do país.

3.3 ATIVIDADE MODULADORA

Por não haver estudos na literatura para a avaliação da atividade moduladora do extrato etanólico da polpa e casca de *Annona squamosa*, esse estudo procura investigar a ação dos extratos em associação com diferentes antibióticos frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O EEPAS não apresentou ação antibacteriana isoladamente, mas em associação com os antibióticos teve uma moderação ação antibacteriana, isso indica que os compostos apresentam potencial de sinergismo, não demonstrando efeito apenas com a amicacina no combate a *Staphylococcus aureus* que não ocorreu variação do antibiótico isolado e da amicacina com o extrato.

Gráfico 1. –atividade moduladora do EEPAS em associação com antibióticos aminoglicosídeos e β -lactâmicos contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.



ANOVA bidirecional seguida pelo pós-teste de Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 6,0. * $p < 0,0001$.

O extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* na pesquisa realizada por Souza et al (2013) não mostrou atividade antibacteriana clinicamente relevante, com MIC ≥ 1024 mg / mL. No entanto, o extrato combinado com alguns aminoglicosídeos mostrou um efeito sinérgico contra as cepas multirresistentes *E. coli* 27 e *S. aureus* 358.

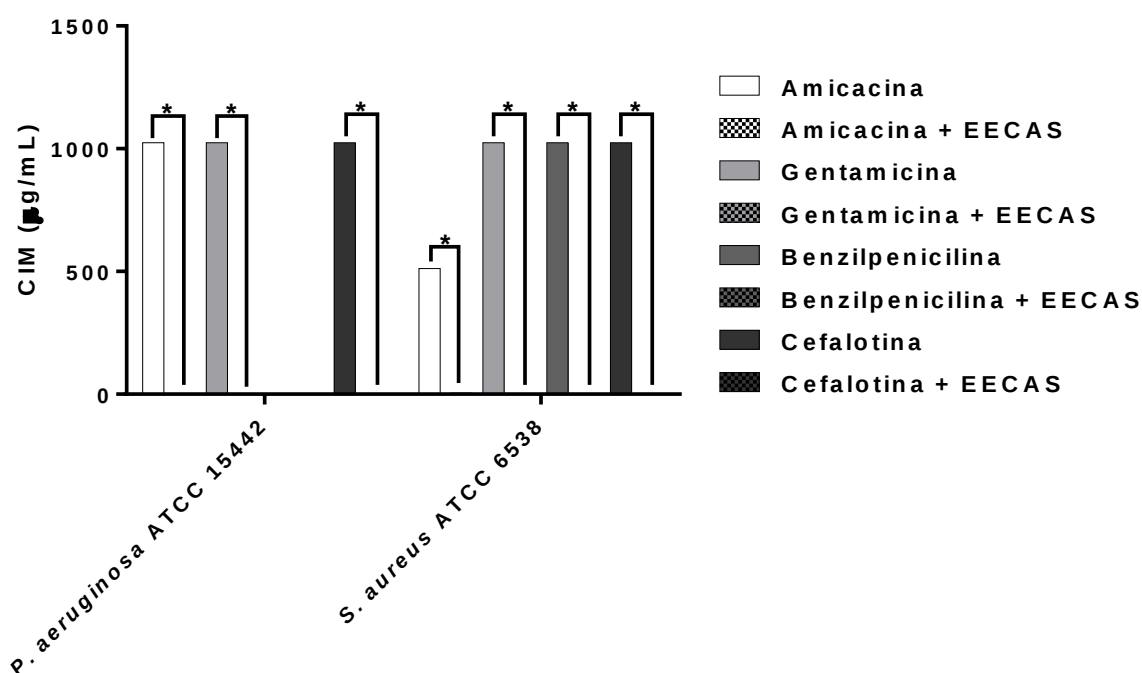
No combate a *Pseudomonas aeruginosa* o EEPAS apresentou-se bastante eficiente em associação com todos os antibióticos, e com melhor resultado em combinação com a cefalotina, variando de 1024 para 4 ug/mL e com menor ação com a amicacina, que de 1024 ug/mL variou para 256 ug/mL.

Na utilização contra *Staphylococcus aureus*, o EEPAS demonstrou sinergismo em associação com gentamina, benzilpenicilina e cefalotina, diminuindo de 1024 ug/mL do controle dos antibióticos para em torno de 4-8 ug/mL em combinação com o extrato da polpa.

Produtos naturais podem alterar o efeito dos antibióticos, seja aumentando ou diminuindo a atividade antibiótica, alguns compostos naturais como os flavonóides e taninos alteram a permeabilidade da membrana, favorecendo a penetração de antibióticos. A interação com as enzimas bacterianas pode também estar relacionado com o mecanismo de sinergismo de produtos naturais com antibiótico (BURT, 2004; WENDAKOON; SAKAGUCHI,1995).

Na pesquisa realizada por Júnior (2016), O extrato das folhas de *Annona coriácea* demonstrou efeito antagônico quando associada aos aminoglicosídeos contra as linhagens multirresistentes e padrão de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando um resultado contrário ao encontrado no EECAS e EEPAS.

Gráfico 2 –atividade moduladora do EECAS em associação com antibióticos aminoglicosídeos e β -lactâmicos contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.



ANOVA bidirecional seguida pelo pós-teste de Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 6.0. * $p < 0,0001$.

Nos resultados obtidos com *Staphylococcus aureus* houve interação do EECAS com todos os antibióticos testados, inibindo o crescimento microbiano de forma mais eficiente do que quando a droga foi testada isoladamente. Ocorrendo sinergismo associado com os antibióticos benzilpenicilina, cefalotina e gentamicina, pois estes antibióticos isolados não conseguiu inibir as bactérias nas concentrações testadas, mas em associação com o EECAS a concentração necessária pra inibição foi de apenas 2 µg/mL (Gráfico 2) e com a amicacina sua ação foi menor reduzindo de 512 µg/mL para 4 µg/mL

Na utilização do EECAS no combate a *Pseudomonas aeruginosa*, foi evidenciando sinergismo em todos os antibióticos testados (Gráfico 2). Apenas no benzilpenicilina que isolado já conseguiu inibir o crescimento na menor concentração testada, mas o extrato em

associação com os antibióticos amicacina, gentamicina e cefalotina conseguiu reduzir de 1024ug/ mL do controle para 2 ug/ mL, apresentando um forte sinergismo.

Em correlação a esta pesquisa teve o estudo realizado por Bento (2010) com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona muricata* que apresentou sinergismo com os antibióticos Gentamicina e amicacina contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistente.

Estudos recentes também demonstraram ocorrência de sinergismo entre produtos naturais de outras famílias e drogas antimicrobianas como Mendes (2015) com a espécie *Alpinia zerumbet*, Aguiar (2015) da espécie *Lantana caatingensis* e Lacerda (2016) com a espécie *Bauhinia unguolata*.

4 CONCLUSÃO

O EPPAS não apresentou atividade antibacteriana isoladamente nas concentrações testadas. No entanto, o extrato combinado com antibióticos mostrou um efeito sinérgico. O EECAS demonstrou ação antibacteriana tanto isoladamente quanto em associação com os antibióticos.

Os resultados obtidos indicam que o extrato da casca do fruto de *Annona squamosa* pode ser utilizado isoladamente e o extrato da polpa e casca em associação com antibióticos no combate a bactérias patogênicas. Dessa forma, devido aos resultados apresentados sugere ensaios como de toxicidade na tentativa de desenvolver novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias.

REFERÊNCIAS

- ABDULMUSHIN, M. S. The Effect of Alkaloidal Fraction from *Annona squamosa* L. against Pathogenic Bacteria with Antioxidant Activities. **Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 4, p. 301-307, 2017.
- AGUIAR, U.N et al . Chemical composition and modulation of antibiotic activity of essential oil of *Lantana caatingensis* M. (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 74, n.1, p. 165-170, 2015.
- AHER, P. S.; SHINDE, Y. S.; CHAVAN, P. P. in vitro evaluation of antibacterial potential of *annona squamosa*.l. against pathogenic bacteria. **International journal of Pharmaceutical Sciences and research**, v. 3, n. 5, p. 1457-1460, 2012.

ALENCAR, L. C. B et al. Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p. 111-116, 2015.

ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 258-264, 2014.

ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. Monografia (Bacharel em Química) - Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2015.

BASKARAN, R.; PULLENCHER, D.; SOMASUNDARAM, R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLCESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 82, n.1, p. 121-127, 2016.

BRITO, H. O. et al. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Revista Brasileira de farmácia**, v. 89, n. 3, p. 180-184, 2008.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and possible applications in food - a review . **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223 – 253, 2004.

CHANDRASHEKAR, C.; KULKARNI, V.R. Isolation characterization and Antimicrobial activity of *Annona Squamosa* leaf. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 6, p. 1831-1832, 2011.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition**. CLSI document M07-A9. Wayne, PA, 2012.

COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

DHOLVITAYAKHUN, A et al .Using scanning and transmission electron microscopy to investigate the antibacterial mechanism of action of the medicinal plant *Annona squamosa* Linn. **Journal of Herbal Medicine**, v. 7, n.1, p. 31-36, 2017.

DHOLVITAYAKHUN, A et al. Potential applications for *Annona squamosa* leaf extract in the treatment and prevention of foodborne bacterial disease. **Natural Product Communications**, v.8, n.3, p. 385–388, 2013.

DIAS, D. R. C. **efeito do ultrassom em parâmetros de qualidade do suco de graviola (*Annona muricata* L.)** Dissertação (Mestrado em nutrição) -Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

GHADIR, A. C.; ABEER, F. A.; EMAN, S. R. Evaluation of the antioxidant and antibacterial properties of various solvents extracts of *Annona squamosa* L. leaves. **Arabian Journal of Chemistry**, v.7, n. 2, p. 227-233, 2014.

GOMES, F. M. S. et al. Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains. **Microbial Pathogenesis**, v.115, n. 1, p. 175-178, 2018.

GOMEZ, M.; ROCHA, E. A.; GOMBERG, E. Análise das publicações etnobotânicas sobre plantas medicinais da Mata Atlântica na Região Sul do Estado da Bahia, Brasil. **Revista Fitos**, v. 10, n. 2, p. 95-219, 2016.

GUIMARÃES, P. M. et al. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semiárido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.

JIMÉNEZ, V. M. et al. Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. **Food Research International**, v. 65, n. 1, p. 42-46, 2014.

JÚNIOR J.G. et al. Chemical Characterization and Cytoprotective Effect of the Hydroethanol Extract from *Annona coriacea* Mart. (Araticum) **Pharmacognosy**. v. 8, n.4, p. 253-257, 2016

LACERDA, G.M et al. Atividade moduladora sobre antibióticos pelo extrato aquoso das folhas de *Bauhinia unguolata* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 3, p. 1-10, 2016.

LÔBO K. M. S et al .Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 12, n.2, p. 227-233, 2009.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MAIER, T et al. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1. p. 551-559, 2009.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3ª edição. Fortaleza, Edições UFC, 2009.

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

MENDES, F. R.S. et al. Essential oil of (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. (Zingiberaceae): chemical composition and modulation of the activity of aminoglycoside antibiotics.. The **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 3, p. 259-263, 2015.

MORAIS, E. C. et al. Compostos bioativos e características físico-químicas de polpa de araticum in natura e pasteurizada. **Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 1-9, 2017.

NUNES, C. R. **Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antineoplásica de *Annona muricata* L.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal com ênfase em Química de Alimentos) -

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

OLIVEIRA, L. M. S. et al. perfil de resistência bacteriana aos carbapenêmicos nas clínicas de um hospital universitário. **Gleneayre equestrian program**, v. 1, n. 2, p. 56-58, 2017.

OUATTARA, L. et al. Antioxidant and antibacterial activities of three species of *Lannea* from Burkina faso. **Journal of Applied Sciences**, v.11, n. 1, p. 157-162, 2011.

PAES, M. M. et al. Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 945-980, 2016.

PAULA, I. M. B. **Determinação da composição química e da atividade antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* Linn avaliando o potencial para preparação de enxaguatório bucal.** Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

PEREIRA, A. V. et al. Análise da atividade antimicrobiana de taninos totais de plantas aromáticas do Nordeste brasileiro. **Revista AGROTEC**, v. 36, n. 1, p. 109-114, 2015.

PINTO, N.C.C et al .Cytotoxicity and bacterial membrane destabilization induced by *Annona squamosa* L. extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 2053-2073, 2017.

SANTOS, A. C. A et al. Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: revisão sistemática. **Revista interdisciplinar**. V. 7, n. 3, p. 149-156, 2014.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar Flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytocjemistry**, v. 55, n. 6, p. 567-573, 2000.

SARAIVA, R. M. C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente a bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas.** Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2012.

SCOTTI, L. et al. chemotaxonomy of three genera of the Annonaceae family using self-organizing maps and c nmr data of diterpenes. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2146-2152, 2012.

SILVA, F. R, ANTUNES, R. M. P, CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *annona muricata* l. (Annonaceae). **Revista de biologia e farmácia**, v .6, n. 2, p. 27-36, 2011.

SILVA, R. L. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 23, n. 1, p. 34-46, 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SIMONETTI, E. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 9-18, 2016.

SOUZA H.H.F et al. Phytochemical composition, antibacterial and modulatory of antibiotic activity of the extract and fractions from *Annona squamosa* L. **Ethnobiology and Conservation**, v.2, n. 9, p. 1-8, 2013.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

VIEIRA, P. N.; VIEIRA, S. L. V. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. **UNIPAR**, v. 21, n. 3, p. 209-212, 2017.

WANDERLEY, L. S. M. et al. uso de plantas medicinais por indivíduos da comunidade do valentina-PB. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 13, n. 2, p. 99-105, 2015.

WENDAKOON, C.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of the amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection** ,v. 58, n. 3,p. 280 – 283, 1995.