

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CICERO PAULO OLIVEIRA DOS SANTOS JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E AVALIAÇÃO
ANTIBACTERIANA E MODULADORA ASSOCIADO COM A LUZ DE LED AZUL
DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L.
(ANNONACEAE)**

Juazeiro do Norte – CE
2019

CICERO PAULO OLIVEIRA DOS SANTOS JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E AVALIAÇÃO
ANTIBACTERIANA E MODULADORA ASSOCIADO COM A LUZ DE LED AZUL
DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L.
(ANNONACEAE)**

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

Orientadora: Dra. Fabíola Fernandes Galvão
Rodrigues.

Co-orientadora: Ma. Rakel Olinda Macedo da Silva

CICERO PAULO OLIVEIRA DOS SANTOS JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E AVALIAÇÃO
ANTIBACTERIANA E MODULADORA ASSOCIADO COM A LUZ DE LED AZUL
DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L.
(ANNONACEAE)**

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

Orientadora: Prof. Dra. Fabíola Fernandes
Galvão Rodrigues.

Co-orientadora: Ma. Rakel Olinda Macedo da Silva

Data de aprovação: 09/12/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa: Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues
Orientadora

Profa: Ma. Tassia Thais Al Yafawi
Examinador 1

Profa: Esp. Lívia Maria Garcia Leandro
Examinador 2

Dedico este trabalho a minha família, pois foram minha base para tudo o que aprendi nessa longa trajetória da graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pois é por meio D'ele, por Ele e para Ele são feitas todas as coisas.

Agradeço a todos da minha família por sempre ter dado o apoio e ser minha base para todas as minhas decisões.

Agradeço em especial a minha mãe Valdineide Alves Rodrigues por ser guerreira e sempre estar comigo em qualquer situação durante a graduação e para a vida, me dando incentivo, amor e atenção.

Agradeço a meu avô Valter *In memorian*, que foi a inspiração para que esse trabalho fosse concluído, e também todo o seu amor e carinho dado enquanto vivo.

Agradeço aos meus irmãos por toda atenção e ajuda que me foi prestada durante toda a minha graduação.

Agradeço aos meus amigos que por muitas vezes presenciaram as lutas passadas, mas também cada vitória conquistada na graduação e durante a execução desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos de faculdade e futuros colegas de profissão: Aparecida, Lara, Dionara, Jayne, Eduarda, Israel, Danyelle, Roberta e Helena, que deram muitos incentivos, comemoraram comigo todas as vitórias e me ajudaram a passar por cada momento difícil.

Agradeço em especial a minha professora e orientadora a Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues, que de forma ousada me fez apaixonar pelo mundo da pesquisa de Produtos Naturais e por mostrar que na vida do pesquisador necessita de muita dedicação.

Agradeço também em especial a minha co-orientadora a Ma. Rakel Olinda Macedo da Silva, por sempre ter estado presente quando necessitei de auxílio e por ser uma ótima profissional a quem tenho muito apreço.

Agradeço aos demais professores: Yhan, Leticia, Roberto, Tassia, Allan, Lívia, Fabrina, Walber, que ao longo dessa jornada foram a base de ensino para me tornarem o profissional que sou.

Agradeço as técnicas do Laboratório de Microbiologia da UNILEÃO: Carol, Ana Paula e Bruna por sempre que precisei estavam dispostas a me ajudar.

Agradeço também a Universidade Regional do Cariri – URCA pela parceria em realização dos testes e por cederem as cepas bacterianas.

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E AVALIAÇÃO
ANTIBACTERIANA E MODULADORA ASSOCIADO COM A LUZ DE LED AZUL
DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L.
(ANNONACEAE)**

Cicero Paulo Oliveira dos Santos Junior¹
Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues²
Rakel Olinda Macedo da Silva³

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo obter o perfil químico e avaliar a toxicidade, e a ação antibacteriana e moduladora associado com a luz de LED azul do extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* L. (Annonaceae). O extrato das folhas de *Annona muricata* foi obtido através da imersão de etanol por 72h seguido da evaporação do solvente com rendimento de 0,91%. Os metabólitos secundários foram identificados através de adição de reagentes específicos. Os ensaios de toxicidade frente a *Artemia salina*, foi avaliado em triplicata com diferentes concentrações. Para o teste microbiológico utilizou-se a metodologia de microdiluição usando cepas padrões de: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e (ATCC 12624), *Bacillus cereus* (ATCC 33018), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). A modulação foi realizada com a utilização dos antibióticos: cefazolina, benzilpenicilina, amicacina e gentamicina. As concentrações testadas variaram de 512 a 0,5 µg/ mL. Os resultados microbiológicos e toxicológicos foram analisados através do software Prism 6.0. O extrato de *Annona muricata* L. apresentou metabólitos em sua constituição como: flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas e taninos condensados. O extrato apresentou toxicidade elevada com CL₅₀= 41,66 µg/mL. O resultado da CIM apresentou-se para todas as cepas testadas ≥1024 µg/mL. Na modulação os resultados variaram entre sinergismo e antagonismo frente aos antibióticos testados em associação ao LED. Diante do exposto, as folhas de *Annona muricata* L., possui uma gama de compostos químicos com potencial biológico, elevado teor tóxico tornando-se uma fonte promissora para a atividade citotóxica contra células tumorais, como também uma alternativa no controle microbiano.

Palavras-chave: *Annona muricata*. Atividade antibacteriana. Luz azul de LED. Toxicidade

**CHEMICAL CHARACTERIZATION, TOXICITY AND ANTIBACTERIAL AND
MODULATOR ASSESSMENT ASSOCIATED WITH THE BLUE LED LIGHT OF
THE ETHANOLIC EXTRACT OF LEAVES OF ANNONA MURICATA L.
(ANNONACEAE)**

Cicero Paulo Oliveira dos Santos Junior¹
Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues²
Rakel Olinda Macedo da Silva³

1-Discente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, c-paulo12@hotmail.com, Juazeiro do Norte- CE

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

3-Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, rakelolinda@leaosampaio.edu.br, Juazeiro do Norte- CE

ABSTRACT

This work aimed to obtain the chemical profile and to evaluate the toxicity, and the antibacterial and modulating action associated with the blue LED light of the ethanolic extract of the leaves of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Annona muricata* leaf extract was obtained by immersing ethanol for 72h followed by evaporation of the solvent with 0.91% yield. Secondary metabolites were identified by addition of specific reagents. Toxicity tests against *Artemia salina* were evaluated in triplicate with different concentrations. For microbiological testing the microdilution methodology was used using standard strains of: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and (ATCC 12624), *Bacillus cereus* (ATCC 33018), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). Modulation was performed using the following antibiotics: cefazolin, benzylpenicillin, amikacin and gentamicin. The concentrations tested ranged from 512 to 0.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Microbiological and toxicological results were analyzed using Prism 6.0 software. The extract of *Annona muricata* L. presented metabolites in its constitution as: flavones, flavonols, xanthenes, chalcones, aurones, flavononols, leucoanthocyanidins, catechins, flavonones and condensed tannins. The extract showed high toxicity with $\text{LC}_{50} = 41.66 \mu\text{g} / \text{mL}$. The MIC result was presented for all strains tested $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$. In the modulation the results varied between synergism and antagonism against the antibiotics tested in association with the LED. Given the above, the leaves of *Annona muricata* L., have a range of biologically potential chemical compounds, high toxic content making it a promising source for cytotoxic activity against tumor cells, as well as an alternative in microbial control.

Keywords: *Annona muricata*. Antibacterial activity. Blue LED light. Toxicity.

1 INTRODUÇÃO

Dados históricos mostram que os antepassados possuíam o conhecimento sobre as propriedades oriundas das plantas e esse conhecimento terapêutico tem-se dissipado ao longo dos tempos. O uso de plantas consideradas medicinais é bastante difundido no Brasil onde grande parte da população utiliza produtos naturais como único recurso terapêutico (LEITE et al., 2015; MESSIAS et al., 2015).

Esse uso é por consequência da produção de compostos químicos produzidos a partir do metabolismo secundário, que para algumas espécies vegetais é utilizado para sua própria defesa e também contra diversos microorganismos como: bactérias, fungos e parasitas. Os óleos e extratos obtidos de plantas tem interesse científico devido aos efeitos biológicos no organismo humano como a atividade contra bactérias causadoras de infecções. Esses componentes ativos, são compostos químicos que estão distribuídos em diversas classes tais como os terpenos (BARBOSA et al., 2017; ROSA et al., 2016).

O aumento de infecções causadas por bactérias e o uso irracional de antibacteriano fez com que surgissem microorganismos resistentes aos antibióticos convencionais e essa necessidade de combater a resistência microbiana tem gerado grande preocupação a

Organização Mundial da Saúde (LIMA et al., 2017). Com a dificuldade no tratamento de bactérias resistentes aos antibióticos, torna-se a busca de novas substâncias que possuam ação antibacteriana e que possam ser utilizadas para combater esses agentes como as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MATIAS et al., 2017).

A bactéria *Staphylococcus aureus* considerada grande patógeno humano onde cerca de 30% da população é colonizada pela mesma, é uma das principais causadoras de graves doenças como a endocardite infecciosa e a bacteremia, também causa outras patologias de pele e doenças hospitalares. A *Pseudomonas aeruginosa* é uma grande causadora de infecções hospitalares, infecções no trato respiratório e urinário, bem como colonização de cateteres, sondas e feridas. Essa espécie tem grande capacidade de adaptação em locais desfavoráveis (CARDINAL et al., 2015; INGRAHAM; INGRAHAM, 2011; TONG et al., 2015; ZINGARETTI et al., 2018).

Junto a essas substâncias, o *Light Emithing Diodes* (LED) tem-se tornado agente promissor na atuação antibacteriana no tratamento de cicatrização de infecções cutâneas, porém ainda não é utilizado frequentemente na prática clínica. O LED possui potencial de irradiação segura, com consume de energia baixa e vida útil longa. A luz de LED pode ser utilizada para diversas doenças inflamatórias, pois age como antimicrobiano e antiinflamatório, que depende do seu comprimento de onda (MEYER et al., 2010; PEREIRA et al., 2017).

Além do aumento da resistência bacteriana, a auto ingestão de plantas medicinais pode levar ao um quadro de toxicidade pelo seu uso abusivo, o que pode gerar quadros patológicos aos seres humanos e animais. Segundo a Sinitox (2012), no Brasil no ano de 2012 ocorreu cerca de 1.026 casos de quadros de intoxicação por plantas medicinais, ocupando o 13º lugar em número de casos de intoxicação. Uma das espécies vegetais que apresenta potencial terapêutico e toxicidade é a espécie *Annona muricata* L. conhecida popularmente como graviola (ARAUJO et al., 2014; CAMPOS et al., 2016).

A graviola é uma planta de origem tropical pertencente à família Annonaceae, considerada uma espécie onde todas suas partes são utilizadas na medicina natural para a terapêutica de diversas doenças com destaque para a atividade antitumoral, e seus frutos são utilizados comercialmente para produção de doces, sucos e sorvetes. Essa espécie, tem uso milenar desde os indígenas que utilizavam para fins terapêuticos, e apresenta uma gama de atividades biológicas tais como: citotóxica, imunossupressora, antiparasitária e antibacteriana (ALFAIA; ALMEIDA, 2016; FREITAS; MORAES; SILVA, 2017).

Portanto, torna-se relevante o estudo das principais classes de componentes químicos encontrados nas folhas dessa espécie, possibilitando relacionar as classes químicas com

algumas atividades biológicas, e também contribuir para a população acadêmica e a comunidade acerca das atividades presentes nas folhas. Desta forma, o objetivo desse estudo foi obter o perfil químico e avaliar a toxicidade, atividade antibacteriana e moduladora associada com a luz de LED azul do extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* L. (Annonaceae).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO, MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

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.

Foram utilizadas folhas de graviola (*Annona muricata* L), onde as folhas foram obtidas no município de Juazeiro do Norte-CE, coletadas as 16:00h com localização geográfica S 7°12'59,12676" (LATITUDE), W 39° 18'33,966" (LONGITUDE), no período de setembro de 2019. Uma exsicata do material vegetal foi preparada para a identificação pelo Herbário Dárdano Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri-URCA.

2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

A obtenção do extrato etanólico foi por extração a frio com etanol P.A. Foram preparadas 330g de folhas frescas com extração exaustiva por imersão de 72 horas. Após esse período a mistura foi filtrada e o solvente destilado em evaporador rotativo a vácuo (SIMÕES et al., 2017).

2.2.1 Prospecção Fitoquímica

Os testes fitoquímicos foram utilizados para detectar a presença de metabólitos secundários como: flavonóides e taninos e alcalóides, 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., 2017; MATOS, 2009).

2.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE POR *Artemia salina*

A toxicidade foi testada contra o microcrustáceo *Artemia salina* através do método proposto por Meyer et al., (1982). O teste foi realizado em triplicata, com diferentes concentrações, acompanhado de um controle positivo preparado com água marinha e dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), e um controle negativo com água marinha e DMSO (Dimetilsufóxido). Após 24 horas foi feita a leitura de larvas mortas. O cálculo da CL_{50} foi realizado por regressão linear, sendo considerado significativo quando $CL_{50} < 1000 \mu g/mL$ (COSTA et al., 2010).

2.4 MATERIAL BACTERIANO

Os microorganismos utilizados nos testes foram obtidos em parceria com o 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), e Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12624), *Bacillus cereus* (ATCC 33018) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

2.5 AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo com base no CLSI (2003). Ao anteceder o teste, as linhagens bacterianas foram ser 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 100 μL de solução de cada extrato e as concentrações finais dos extratos variam entre 512 - 8 $\mu g/mL$. 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, 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, 2003).

2.5.1 Atividade moduladora frente a antibióticos

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 as CIM/ 8 do extrato frente aos antibióticos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e antibióticos β -lactâmicos (cefazolina 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 micro-organismos. As concentrações adicionadas das drogas antibacterianas usadas nesse ensaio variam de 1024-0,5 μ g/mL (RODRIGUES et al., 2013).

2.5.2 Avaliação da atividade moduladora com exposição à luz de Led azul

O aparelho que foi utilizado durante o procedimento experimental com LED é o *Light Emithing Diodes- LED*, da marca NEW Estética®. Foi utilizada a luz azul, com um comprimento de onda pré-determinado pelo aparelho de 415nm.

Para a realização destes testes, inicialmente foram utilizadas as mesmas metodologias referentes ao teste de avaliação da atividade antibacteriana e moduladora por contato direto. As placas foram submetidas à luz de LED azul durante vinte minutos e posteriormente serão incubadas a 37 °C, durante 24h. Os testes foram realizados em triplicata e para determinação da CIM foi utilizada a resazurina sódica (PEREIRA et al., 2017a).

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes microbiológicos e toxicológico 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

O extrato das folhas de *Annona muricata* L., obteve um rendimento de 0,91% após a evaporação de todo o solvente. A composição química do extrato apresentou positividade para 10 grupos de compostos químicos, sendo observados na Tabela 1.

Tabela 1: Grupos de compostos químicos identificados no extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* L.

Classes de Metabólitos Secundários															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EEAm	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Fonte: próprio autor. 1: Fenóis; 2: Taninos hidrolisáveis; 3: Taninos Condensados; 4: Antocianinas; 5: Antocianidinas; 6: Flavonas; 7: Flavonóis; 8: Xantonas; 9: Chalconas; 10: Auronas; 11: Flavononóis; 12: Leucoantocianidinas; 13: Catequinas; 14: Flavononas; 15: Alcalóides. (+) presente; (-) ausente.

O extrato etanólico apresentou compostos químicos como: flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas e taninos condensados. Ao realizar o mesmo estudo do perfil químico com o extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* coletados no município de Camocim de São Félix – PE, Simões (2015) verificou a presença de terpenos, flavonóides, e taninos condensados.

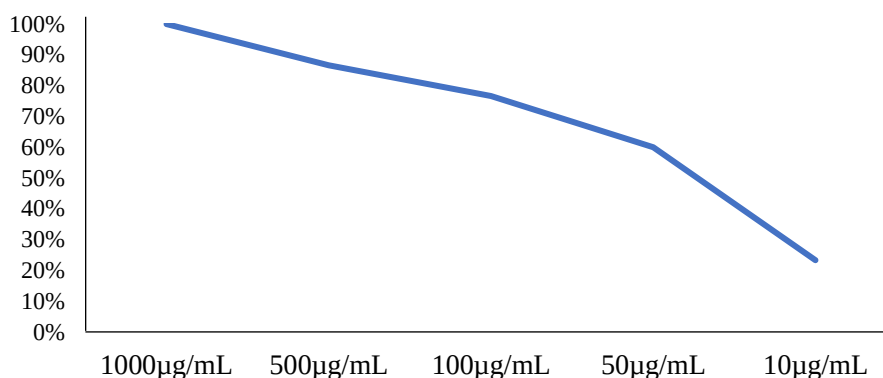
Em outro estudo realizado por Bento et al., (2016) confirma a presença dos taninos condensados, xantonas, flavonas, flavononóis e flavonóis, utilizando extrato hidroalcólico das folhas da graviola coletadas na região da chapada do Araripe no município de Crato-CE. A graviola possui alguns desses compostos como os taninos e flavonóis em altas concentrações, conferindo a planta atividade biológica como ações antibacteriana, antiinflamatória, antioxidante (SOUZA et al., 2018).

No presente trabalho após a adição de reagentes específicos não foi observado a presença de alcalóides, entretanto estudo feito por Poma et al., (2011) com o extrato aquoso das folhas de graviola mostrou a presença dos alcalóides utilizando metodologias mais complexas. Outra pesquisa realizada utilizando as folhas de *Annona squamosa* (ATA) também apresentou positividade para os alcalóides (BRITO et al., 2008).

No ensaio da toxicidade por *Artemia salina* a graviola conseguiu matar os microcrustáceos em todas as diluições, onde em algumas concentrações foram capazes de matar mais de 50% da população de *A. salina*, exceto na de 10µg/mL, que apresentou morte em cerca de 23,3% do total da população, como mostra no Gráfico 1. Portanto, a concentração letal que foi capaz de matar 50% de toda a população de larvas (CL₅₀) foi a partir da concentração

50µg/mL, sendo considerado uma alta toxicidade com $CL_{50} = 41,66\mu\text{g/mL}$, porém promissora para células cancerígenas.

Gráfico 1: Análise da porcentagem de larvas de *A. salina* mortas.



Fonte: próprio autor

No estudo realizado por Silva et al., (2015), o extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* L apresentou alta toxicidade quando avaliado frente a *A. salina*, onde na concentração de 1000 µg/mL matou 100% da população das larvas, e apenas a concentração de 200 µg/mL apresentou um resultado de 23,3%, sendo considerado tóxica com $CL_{50} = 324,07 \mu\text{g/mL}$. Logo, os resultados desse estudo corroboram com outra pesquisa, onde foi observado a morte de 50% a partir da concentração de 250 µg/mL até a de 1000 µg/mL onde obteve uma média de 9,66% de larvas mortas, porém sua CL_{50} foi considerada baixa (ALFAIA; ALMEIDA, 2016).

Essa característica citotóxica da graviola é devido a presença de acetogeninas anonáceas (ACGs), uma classe de compostos naturais derivadas dos ácidos graxos com ampla atividade biológica encontrada na família Annonaceae, e em diversas partes de suas plantas incluindo *Annona muricata*, que confere a planta ação citotóxica a diversas linhagens de células tumorais. A anonacina é a acetogenina mais abundante na espécie e também a mais tóxica pois inibe a cadeia respiratória mitocondrial (MORAES, 2016).

Os resultados da atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Annona muricata* L. (EEAm), utilizando a metodologia de microdiluição está demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima do EEAm frente as cepas bacterianas Gram negativas e Gram positivas.

BACTÉRIAS	CIM (µg/mL)
	EEAm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	≥1024
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	≥1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	≥1024
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12624)	≥1024
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 33018)	≥1024
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	≥1024

Fonte: Próprio autor.

O extrato de *Annona muricata* não apresentou significado clínico de relevância para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, pois apresentaram resultado da CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$.

Pesquisas realizadas com a família Annonaceae utilizando a metodologia de microdiluição, Rabêlo et al., (2014), utilizou extrato das folhas e talos de *Annona cherimola* Mill e obteve resultados semelhantes a esta pesquisa, onde não obteve atividade para a bactéria *Escherichia coli*. Em outro estudo com a espécie realizado por Sousa (2016) utilizando extrato de *Annona jahnii* Saff, frente as linhagens padrões de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana, considerado pelo autor apenas atividade bacteriostática.

Estudo realizado por Tintino et al., (2013) utilizando o extrato etanólico e hexânico das raízes de *Costus cf. arabicus* coletados no município de Crato-CE, utilizando cepas padrões de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, para ambos extratos obteve CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ para todas as cepas testadas, corroborando com a presente pesquisa.

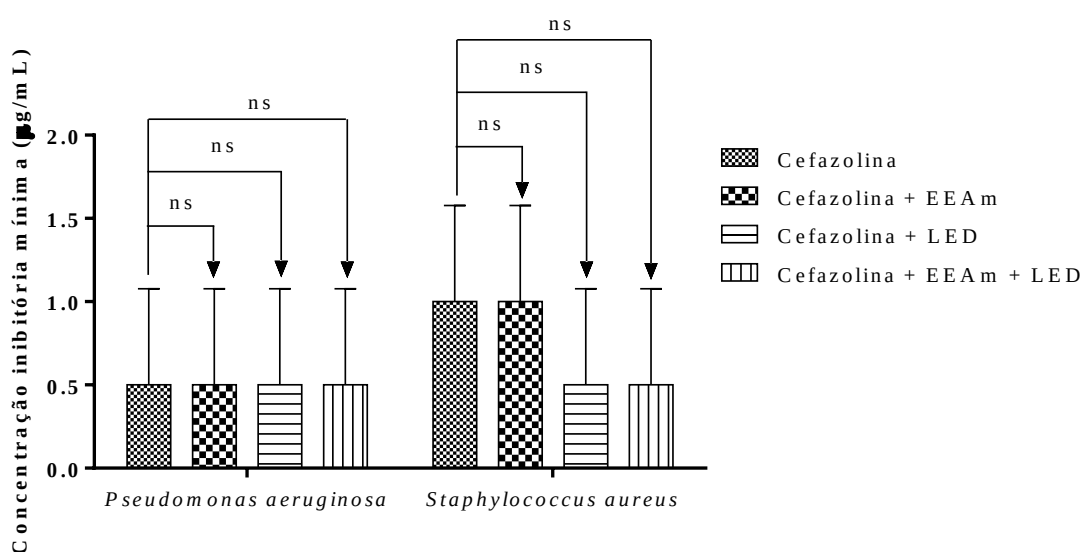
Um estudo realizado por Silva (2011), onde foi realizado através da metodologia de difusão de disco com diferentes tipos de extratos de partes de *Annona muricata*, até mesmo do extrato das folhas frente as cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou formação de halos de inibição em nenhuma cepa testada.

Os resultados da CIM podem ser explicados pela quantidade presente do composto ativo no extrato das folhas como os terpenos, assim como os efeitos sazonais como as condições

climáticas e solo em que a planta se encontra. Em contrapartida segundo Simões (2015) até o presente momento ainda não foram encontrados resultados em estudos científicos mais aprofundados sobre a análise da ação antimicrobiana utilizando a concentração inibitória mínima.

Nos testes de modulação do EEAm utilizando o antibiótico β -lactâmico (Cefazolina) em associação ao LED azul (Gráfico 2), não apresentou significado relevante frente as cepas padrões de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* pois com a utilização do produto natural em associação ao LED + antibiótico apresentaram a mesma CIM, assim como apenas a utilização do produto natural + antibiótico, exceto para a *S. aureus* que apresentou CIM superior a *Pseudomonas aeruginosa*, e resultado utilizando apenas o antibiótico, sem efeito potencializador ou antagônico.

Gráfico 2: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do antibiótico cefazolina na presença e na ausência do EEAm frente as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em associação com a luz azul de LED.

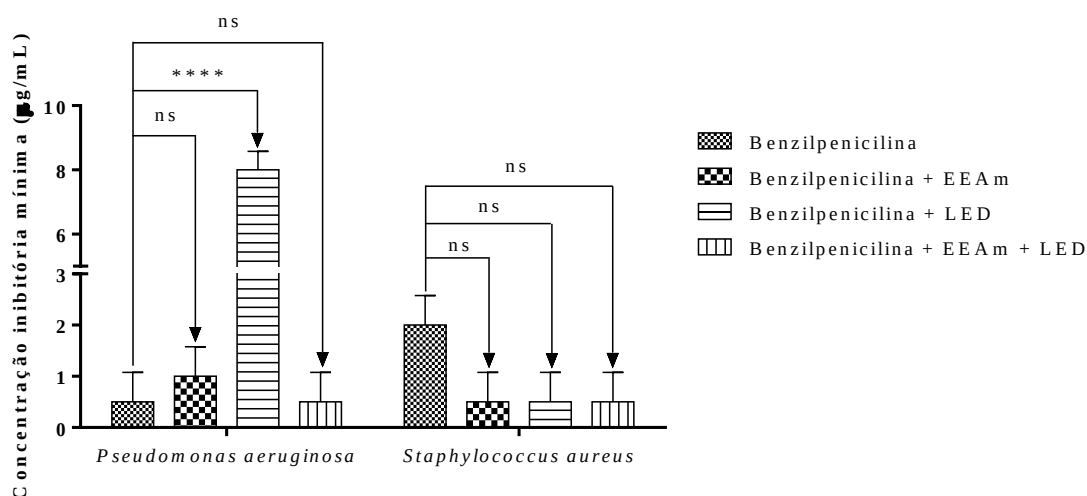


Legenda: ns: não significativo.

Os resultados da modulação utilizando benzilpenicilina frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, observou-se diferentes resultados, onde para a ação do EEAm associado ao antibiótico apresentou efeito antagônico com pequena diferença da CIM, e efeito antagônico significativo quando comparado a ação do LED azul mais o antibiótico e apenas a ação do benzilpenicilina.

Para a cepa de *S. aureus*, não houve efeito significativo em nenhuma combinação, exceto pela ação do produto natural em associação ao antibiótico, onde o produto natural conseguiu potencializar o efeito do antibiótico, porém esse valor permanece insignificante por ter CIM semelhantes (Gráfico 3).

Gráfico 3: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do antibiótico benzilpenicilina na presença e na ausência do EEAm frente as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em associação com a luz azul de LED.

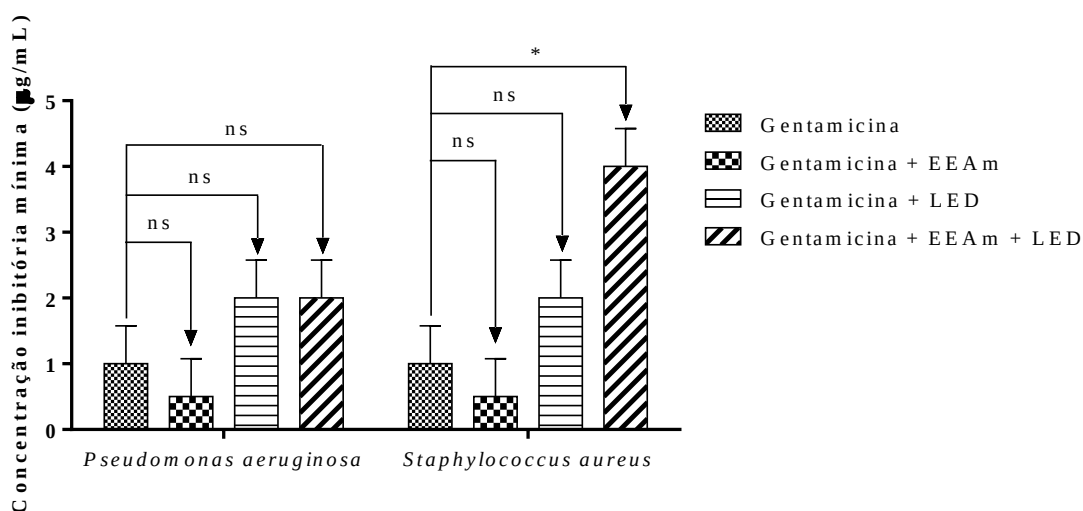


Legenda: ns: não significativo. **** valor estatisticamente significativo com $p < 0,0001$

Os resultados utilizando o aminoglicosídeo gentamicina, não apresentou estatisticamente relevância significativa no resultado para a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, onde para a utilização do produto natural mais o antibiótico, o mesmo conseguiu modular a ação da gentamicina, onde apresentou diminuição pequena da CIM se comparado ao efeito causado apenas com o antibiótico como mostra no Gráfico 4. Na combinação com a luz azul de LED, a CIM não apresentou diferença significativa.

O teste da modulação frente a *S. aureus*, se apresentou estatisticamente significante quando comparado a ação isolada do antibiótico gentamicina e a ação do produto natural associado antibiótico e a luz de LED azul, onde o produto natural mais a luz de LED diminuiu a ação farmacológica da gentamicina. Para as demais combinações não expressou resultado modulatório significativo.

Gráfico 4: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do antibiótico gentamicina na presença e na ausência do EEAm frente as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em associação com a luz azul de LED



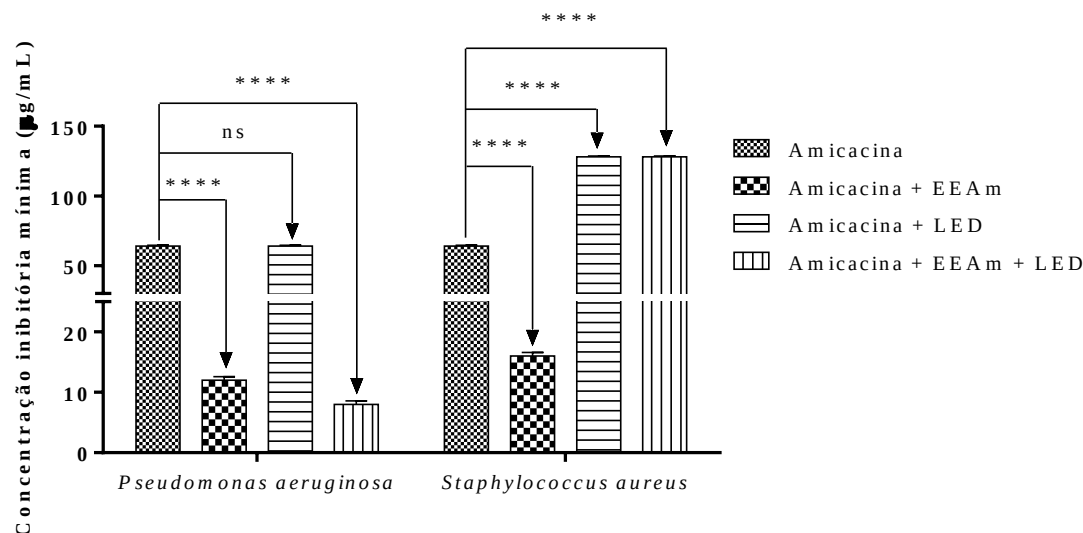
Legenda: ns: não significativo. * valor estatisticamente significativo com $p < 0,0114$

O resultado obtido na modulação frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando o aminoglicosídeo amicacina, apresentou resultados significativamente relevantes, quando comparado a ação do produto natural mais o antibiótico, obtendo sinergismo, onde o efeito do fármaco foi potencializado. Outro efeito significativo, foi a ação do fármaco mais o produto natural e a luz de LED, a luz azul de LED teve um efeito antagônico comparado com apenas a ação do fármaco. Todavia não houve significância no resultado da modulação do antibiótico com o LED azul comparado a ação do antibiótico sem o LED, apresentando a mesma CIM.

Para a cepa padrão de *S. aureus*, o extrato etanólico das folhas da graviola potencializou o efeito do antibiótico obtendo uma diminuição da CIM, comparado a ação sozinha do antibiótico. Em todas as outras associações ao LED azul, não obteve resultado significativo, apenas se comparado com a ação da amicacina isolado, pois o LED antagonizou o efeito do antibiótico, apresentando um aumento na CIM como mostra no gráfico 5.

Os resultados foram expressos em média aritmética $\pm$ desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pos-test *Bonferroni* utilizando o software *Graphpad Prism.*, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Gráfico 5: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do antibiótico amicacina na presença e na ausência do EEAm frente as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em associação com a luz azul de LED



Legenda: ns: não significativo. **** valor estatisticamente significativo com $p < 0,0001$

A utilização de produtos naturais como riqueza natural, corrobora para o surgimento e aprimoramento de técnicas de tratamento com base nos metabólitos secundários presentes nos produtos naturais, onde esses compostos são comumente conhecidos por apresentarem efeitos que contribuem ao organismo humano, de forma inibitória ou antagônica nos alvos moleculares (ARAÚJO et al., 2012; LACERDA et al., 2016).

Os flavonóides são substâncias sintetizadas pelas plantas como resposta de infecção microbiana e são eficazes a diversos microorganismos. Essa característica dada aos flavonóides é por consequência da capacidade de formação de complexos proteicos solúveis que se ligam a parede celular bacteriana como podem também causar rupturas na membrana plasmática dos microorganismos facilitando a ação das drogas microbianas (MATIAS, 2010).

Na pesquisa realizada por Tintino et al (2015), utilizando extrato do fruto de *Morinda citrifolia* L. onde foi identificado metabólitos iguais como: flavonoides, triterpenos, demonstrou um resultado parecido com este estudo, onde observou sinergismo com a ação do extrato mais os aminoglicosídeos gentamicina e amicacina para a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

É comprovado que bactérias Gram positivas (como a *S. aureus*) possuem uma maior facilidade de penetração em sua parede celular, deixando mais susceptível a ação de diversos compostos químicos, já as bactérias Gram negativas (como a *Pseudomonas aeruginosa*)

possuem uma camada mais externa de lipopolissacarídeos que impede a entrada e consequentemente a ação desses compostos químicos (NOGUEIRA, 2014).

A classe de antibióticos dos aminoglicosídeos atuam na subunidade 30S dos ribossomos bloqueando-a, impedindo assim a síntese proteica. Portanto, os metabólitos presentes no extrato das plantas modulam a entrada do antibiótico na bactéria, facilitando a atuação no seu sítio de ação sendo considerado efeito sinérgico (SOBRAL et al., 2016).

Os efeitos antagônicos presentes neste estudo, pode ser explicado pela capacidade de quelação dos antibióticos em associação aos metabólitos presentes no extrato, o que pode aumentar ou inibir a ação farmacológica dos antibióticos em vários alvos fazendo com que haja aumento da CIM, indicando que o antagonismo é um efeito sinérgico multialvo, podendo cooperar para um efeito antagônico (AQUINO et al., 2016; SOUSA et al., 2016).

A fototerapia é promissora para a diminuição do uso excessivo de antibacterianos sintéticos e consequentemente a resistência bacteriana. Segundo Moreira (2009), a cor azul emitida pelos aparelhos de LED, possui atividade antibacteriana comprovado contra microorganismos através de mecanismos como stress oxidativo, alterações de homeostase, mudanças na permeabilidade, síntese de DNA e RNA, despolarização de membrana e alcalinização citoplasmática, o que foi capaz de obter a inativação da bactéria *Propionibacterium acnes* (PEREIRA et al., 2017b).

De acordo com Matias et al (2017), a fototerapia ocorre devido a mecanismos bioquímicos de alterações de membrana, pois o LED consegue inibir a respiração celular através da mitocôndria, ocorrendo a dissolução bacteriana, e consequentemente a incapacidade de divisão celular bem como a inativação de enzimas celulares. Todavia, a baixa intensidade da luz de LED pode ser arriscada a saúde, pois pode promover uma proliferação celular, o que acarreta um efeito antagônico, o que pode ser explicado com os resultados antagônicos obtidos nesta pesquisa.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, as folhas de *Annona muricata* L., possui uma gama de compostos químicos que auxiliam na terapêutica de doenças sendo, importante para organismo humano. É de grande relevância saber como utilizar a graviola, podendo ser extremamente tóxica ao organismo humano devido a presença de compostos químicos, entretanto, essa característica citotóxica é promissora para o controle de células cancerígenas. O EEAm apresentou baixo efeito bacteriano, porém quando associado a antibióticos de classes

diferentes, obteve-se uma melhora no resultado. Portanto, é importante ressaltar que o uso do LED também pode caracterizar ação antagonista com o uso do extrato, podendo diminuir o efeito terapêutico do antibiótico e facilitar para uma possível resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ALFAIA, D. P. S; ALMEIDA, S.S.M.S. Avaliação fitoquímica, análise citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas de *Annona muricata* L.(Annonaceae). **Biota Amazônia**, v. 6, n. 1, 2016.
- AQUINO, P., et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. **ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA**. V. 21, n. 1, 2016.
- ARAUJO, K.R.M. et al. Plantas medicinais no tratamento de doenças respiratórias na infância: uma visão do saber popular. **Revista rene**. V. 13. N. 3, 2012.
- ARAUJO, E.J.F et al. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 35, n.3, 2014.
- BARBOSA, H.M. et al. Abordagem Fitoquímica De Metabólitos Secundários Em *Solanum Acanthodes* (Solanaceae) Hook. **Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 4, n. 1, 2017.
- BENTO, E.B., et al. Estudo etnofarmacológico comparativo na região do Araripe da *Annona muricata* L. (Graviola). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 21, n. 1, 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, 2008.
- CARDINAL, L.M.S et al. Análise da terapia antimicrobiana empírica em infecções de corrente sanguínea por *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital universitário. **Revista Sociedade brasileira Clínica Médica**. V. 13, n. 4, 2015.
- CAMPOS, S.C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**. V. 18, n. 1, 2016.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically**. 6. ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7-A6, 2003.
- COSTA, J. G. M et al. (2010). Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. *Pharmacognosy magazine*, 6(24), 331.

FREITAS, E. C.; MORAES, M. O. B.; SILVA, A. C. M. Metabólitos secundários presentes na *Annona muricata* L e suas propriedades nutricionais e funcionais em oncologia. **RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 11, n. 61, 2017.

INGRAHAM, J.L; INGRAHAM, C.A. **Introdução a microbiologia**: uma abordagem baseada em estudos de casos, 3. Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

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, 2016.

LEITE, I.A. et al. A etnobotânica de plantas medicinais no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Biodiversidade**, v. 14, n. 1, 2015.

LIMA, Y.A. et al. Potencial antimicrobiano da *Schinus terebinthifolius raddi* (Aroeira da praia) e sua utilização para aplicações biomédicas. **International Nursing Congress**, v. 1, n. 1, 2017.

MATIAS, E.F.F. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da bacteriana à aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A. (velame), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) e *Cordia verbanacea* DC. (erva-baleeira)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular). Universidade Regional do Cariri. Crato-CE. 2010.

MATIAS, E.F.F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. Associado as luzes de LED. **Revista Interfaces**, V. 5, n. 14, 2017.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3ª ed. Fortaleza: Editora da UFC; 2009.

MESSIAS, M.C.T.B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, 2015.

MEYER B.N, et al. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45: 31-34.

MEYER, P.F, et al. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Fisioterapia Brasil**. V. 11, N. 6, 2010.

MORAES, I.V.M. **Extração de compostos bioativos da folha da Graviroleira (*Annona muricata* L.) e concentração dos extratos por ultra e nanofiltração**. 2016. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. 2016.

MOREIRA, M.C. **Utilização de conversores eletrônicos que alimentam LEDs de alto brilho na aplicação em tecido humano e sua interação terapêutica**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2009.

NOGUEIRA, R.D.V. **Potencial modulador *in vitro* do extrato etanólico de *Punica granatum* L. sobre a atividade de antibióticos**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande-PB. 2014.

PEREIRA, N. L. F. et al. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia uniflora* L in association with led lights. **Elsevier. Microbial Pathogenesis**, v. 174, n. 1, 2017a.

PEREIRA, N. L. F. et al. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, n. 1, 2017b.

POMA, E.M., et al. Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L.(guanábana) de Cuzco. **Ciencia e Investigación**. V. 14, n. 2, 2011.

RABÊLO, S.V., et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Atemoia* (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.3, n.1, 2014.

RODRIGUES, F. F.G. et al. Study of the interference between *Plectranthus* species essential oils from Brazil and aminoglycosides. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, 2013.

ROSA, C.S. et al., 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 Medicinais**, v. 18, n. 1, 2016.

SANTOS, M. A. I. et al. Efeito de diferentes métodos de extração sobre a atividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos da folha de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, p. 1, 2016.

SILVA, E.M.F., et al. Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**.v. 36, n. 2, 2015.

SILVA, F.R. **Avaliação da atividade antibacteriana de extrato de *Annona muricata* L (Annonaceae)**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande-PB. 2011.

SIMÕES, C.F.S. **Perfil Fitoquímico e Estudo das Atividades Antimicrobiana, Citotóxica e AntiInflamatória de *Annona muricata* L.** 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2015.

SIMÕES, C.M.O., et al. **Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento**, Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas) [online]. Registros de Intoxicações/ **dados nacionais/ 2012 Disponível em** <http://www.focruz.br/sinitox/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=411> (acesso em 30/10/2014).

SOBRAL, M.A.F., et al. Atividade antibacteriana e moduladora *in vitro* de extrato metanólico e hexânico de *beta vulgaris* spp. (Linnaeus). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 21, n. 1, 2016.

SOUSA, A.T.L., et al. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *Melissa Offcinalis*. **Revista Ciência de la Salud**. V. 14, n.2, 2016.

SOUSA, G.P. **Estudo químico e atividade antioxidante e antibacteriana de Annona jahnii Saff. (Annonaceae)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Roraima. Boa Vista-RR. 2016.

SOUZA, D.O., et al. Phytochemical Analysis and Central Effects of *Annona Muricata* Linnaeus: Possible Involvement of the Gabaergic and Monoaminergic Systems. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. V. 17, n. 4, 2018.

TINTINO, S.R., et al. Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto de *Morinda citrifolia* L. **ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA**. V. 20, n. 3, 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**. V. 11, n. 2, 2013.

TONG, S. Y. C. et al. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, 2015.

ZINGARETTI, A. E. Q. et al. Sensibilidad a carbapenemes y producción de carbapenemasas en especies de *Pseudomonas* de origen ambiental. **Revista de Ciência y Tecnología**, v. 20, n. 30, 2018.