



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
– PIBIC

**Avaliação do efeito do extrato aquoso das folhas de
Annona muricata em modelos de inflamação cutânea**

Relatório Final

Período da bolsa: de (agosto de 2019) a (julho de 2020)

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica
PIBIC/CNPq

Orientador: Enilton Aparecido Camargo

Autor: David Nascimento Palmeira

SUMÁRIO

• Introdução.....	07
• Objetivos.....	08
• Metodologia.....	11
• Resultados e discussões.....	21
• Conclusões.....	21
• Perspectivas de futuros trabalhos.....	22
• Referências bibliográficas.....	29
• Outras atividades.....	30

• INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta que se inicia no tecido lesionado, a qual é responsável pela produção de sintomas característicos que acarretam alterações na homeostase tanto do fluxo sanguíneo quanto do tecido, desempenhando um importante papel de defesa do organismo contra agentes externos e internos (MANTHIRAM et al.,2017). Trata-se de um complexo processo fisiológico, regulado por diversas vias de sinalização e que necessita da interação de células de diferentes tipos, modulando uma vasta gama de respostas celulares, incluindo maturação e função das células imunes, bem como a homeostase dos tecidos (JUDY D. DAY et al., 2018).

Os processos inflamatórios são necessários para a vigilância imunológica, reparação e regeneração após a lesão (VODOVOTZ et al., 2008). Para isto engatilham uma resposta do organismo produzindo uma série de agentes defensivos, dentre estes linfócitos, monócitos, macrófagos intestinais, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos. Tais agentes, produzem mediadores que têm funções pró-inflamatórias (IL-1,IL-6,TNF-) ou funções anti-inflamatórias (IL-4, IL-11), havendo ativação de receptores que desencadeiam as vias de sinalização intracelular, tais como a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e fator nuclear kappa-B (NF-κB) (LINLIN CHEN, et al., 2018), sendo que estes mecanismos são utilizados na modulação da resposta inflamatória.

Estes processos inflamatórios são controlados por diversos mediadores químicos, com cada qual desempenhando um papel específico, desencadeando, modulando e extinguindo o processo inflamatório (TEIXEIRA et al., 2003), tornando-se desta forma alvo das intervenções medicamentosas da grande maioria dos fármacos existentes no mercado (MEDZHITOV, 2008).

Os diversos mediadores envolvidos nessa resposta desempenham um importante papel mantendo um equilíbrio no intuito de tão logo promover o processo resolutivo. Entretanto, quando ocorre uma exacerbação da resposta, seja por conta da gravidade

da lesão ou por uma incapacidade resolutive do sistema imune, podem ser originadas alterações graves nos tecidos normais, as quais estão associadas com o desenvolvimento e a patologia de diversas doenças como artrite reumatoide, asma, diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas e câncer (SCRIVO et al., 2011).

A fim de modular e impedir que haja exacerbação do processo inflamatório, há no mercado diversos medicamentos como os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e glicocorticoides. Estes medicamentos devem ser capazes de restringir e reverter a inflamação de origem sistêmica ou local. Os glicocorticoides são potentes anti-inflamatórios, mas a variedade de efeitos que produzem no organismo limita o seu uso clínico a condições em que o uso de outros fármacos é impossibilitado. Os AINES devem ser eficazes, analgésicos potentes, terem ação antipirética e serem seguros para o uso humano. Esta classe de droga age sobre as vias do ácido araquidônico por inibição das ciclo-oxigenases (COX) envolvidas nos mecanismos patogênicos da dor, inflamação e febre (HILARIO, TERRERI, LEN, 2006). Contudo, quando usados por um longo período, tendem a ser deletérios por apresentarem sérias reações adversas como distúrbios gastrointestinais, problemas cardiovasculares, além do alto custo com o tratamento (FARSCHI, GHIASI G. 2010).

Diante do exposto acima, as plantas medicinais têm sido de grande valia para a pesquisa e produção de medicamentos que venham a ser uma alternativa aos medicamentos anti-inflamatórios já existentes no mercado. Estas plantas são fonte de diversos compostos bioativos, os quais vêm sendo empregados há muitos séculos na cultura popular e diversas pesquisas nas últimas décadas têm demonstrado a existência e eficácia destes compostos bioativos (HAVSTEEN et al., 1983).

O Sistema Único de Saúde (SUS), desde o ano de 2007, oferece fitoterápicos derivados de plantas e desde o ano de 2013 o Ministério da Saúde (MS) disponibiliza a utilização de medicamentos fitoterápicos na rede de saúde pública. No ano de 2009, fora disponibilizado pela Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) uma lista de plantas medicinais com potencial de se tornarem geradores de produtos que interessem ao SUS (DIORGE J. M. et al., 2015)

Na área da saúde, é de suma importância que haja indicações para o uso de plantas medicinais. A necessidade da busca por medicamentos que venham a apresentar uma carga de efeitos colaterais menores que os medicamentos tradicionais no combate à inflamação, somado à disponibilização de fitoterápicos e à recomendação do uso de plantas medicinais pela rede de saúde pública favoreceu o aumento na utilização de compostos derivados de plantas medicinais em estudos *in vivo* e *in vitro* de grupos científicos, valendo ressaltar que estas plantas são utilizadas há gerações pela população que muitas das vezes não tem acesso adequado à saúde pública e tem como única opção para o tratamento de suas chagas, o uso comprovação científica das plantas medicinais disponíveis em cada região do país (LORENZI E MATOS, 2002). Além disso, é importante destacar que os compostos bioativos extraídos de plantas também têm potencial para produzir reações adversas e o estudo destas reações é imprescindível, bem como o direcionamento apropriado do uso das preparações de produtos naturais oriundos de plantas.

A *Annona muricata* L., planta popularmente conhecida como graviola e amplamente utilizada na medicina popular para uma série de doenças, especialmente câncer e doenças parasitárias. Esta planta apresenta distribuição mundial, sendo encontrada principalmente em regiões tropicais, sendo a Venezuela e o Brasil importantes produtores desta espécie. No Brasil, a região Nordeste é a maior produtora de graviola devido às condições climáticas (SOUZA, 2006).

A gravioleira constitui-se de uma árvore de aproximadamente 6 m de altura, copa pequena e poucos ramos, folhas com disposição alternada, e arrançadas em um único plano (filotaxia alterna dística) de tamanho 12-16 de comprimento por 4-8 cm de largura, com presença de pêlos de cor ferrugíneos e brilhantes. Possui flores de aproximadamente 6 cm, de cor amarelada, sépalas em número de três e pétalas disposta em duas séries de três de coloração amarelada. Seus estames e os carpelos numerosos são dispostos em um receptáculo hemisférico, sendo os estames localizados na porção basal e os carpelos na apical (PRANCE; SILVA, 1976; CAVALCANTE, 1976; STEYEMARK et al., 1997). Seus frutos são grandes, normalmente chegando a pesar até 8 kg (CAVALCANTE, 1976) e sendo consumidos *in natura* e também na forma de sorvete, sucos e compotas.

Suas folhas são empregadas na medicina popular para diversas doenças e sintomas com o uso de variados métodos. O decocoto das folhas é muito utilizado contra diarreia e espasmos, e o chá é empregado como agente emagrecedor, como medicação contra alguns tipos de câncer, como sedativo, expectorante e broncodilatador (QUEIROZ et al., 1988). Suas sementes são usadas com função emética e adstringente, e suas cascas como antidiabéticas e espasmolíticas (LORENZI; MATOS, 2002). As flores e as folhas são utilizadas para tosse e problemas no trato respiratório inferior (MORS et al., 2000). As folhas da *A. muricata* são utilizadas na medicina popular por possuírem ações parasiticida, antirreumática, antinevrálgica, adstringente e anti-emética (DE CARVALHO et al., 2000).

A *Annona muricata* é rica em compostos bioativos que apresentam atividades antitumoral, antifúngica, antiviral e de inibição de enzimas, cujas funções estão intimamente relacionadas com a conformação molecular destes ciclopeptídeos (WU et al., 2007); além de outras atividades como antibacteriana, antiparasitária, antiespasmódica, citotóxica, hipotensiva, vasodilatadora (DE CARVALHO et al., 2000), imunossupressora (KIM et al., 1998) e pesticida (KIM et al., 1998; ABDULLAH; SINA, 2003).

Suas folhas são ricas em acetogeninas e polifenóis e são bem caracterizadas por tratar cistite, diabetes, dor de cabeça e insônia (MOGHADAMTOUSI et al., 2015). O extrato da polpa da *A. muricata* foi descrito por seu potencial anticarcinogênico (SILVA; NEPOMUCENO, 2011) e suas sementes apontadas como potencial fonte de compostos bioativos (DA SILVA, 2014).

Algumas das ações atribuídas tradicionalmente a graviola encontram respaldo em evidências científicas. Estudos *in vitro* mostraram, para preparações das folhas da *A. muricata*, descrita por seu efeito quimiopreventivo em linhagem de células de câncer colorretal (PAYDAR et al., 2017), por sua atividade antioxidante (BASKAR, et al., 2007), no controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *Toxoplasma gondii* (MIRANDA, 2018), pela citotoxicidade em carcinoma epidermóide oral (STEPHANE L., 2019), além de efeito antibacteriano (BUSSMANN et al., 2010) e antiviral (GAVAMUKULA et al., 2014).

Estudos *in vivo* mostraram, para preparações relacionadas à *A. muricata*, resultados promissores por seus efeitos hipoglicemiantes (ADEWOLE; CAXTON-

MARTINS, 2006); antitumorogênico(HAMIZAH et al., 2012;MOGHADAMTOUSI, et al.,2015); proteção do sistema gastrointestinal (MOGHADAMTOUSI et al.,2014) e hepático (ARTHUR et al., 2012);; anti-inflamatório(POMA et al., 2011); antinoceptivo (ROSLIDA et al., 2012); ansiolítico e antiestresse (OVIEDO et al., 2009) e hipotensivo (NWOKOCHA et al., 2012). Há também estudos clínicos na literatura relacionados ao potencial hipoglicemiante (ARROYO et al.,2009) e anticarcinogênico (HANSRA et al., 2014).

Há estudos publicados na literatura a respeito da atividade anti-inflamatória das folhas da *Annona muricata*. Fora encontrada redução do edema de pata induzido por carragenina em ratos pelo tratamento na concentração de 1,5 mg por kg do extrato aquoso das folhas, redução esta em relação ao fármaco indometacina (POMA et al, 2011). Também foi relata redução de edema de orelha induzido por xileno em camundongos na dose de 3 mg por kg quando tratados com o extrato etanólico das folhas (FOONG; HAMID, 2012). Por fim, fora descrito redução de edema de pata induzido por carragenina em ratos na dose de 400 mg por kg quando tratados com extrato etanólico das folhas da *A. muricata* (SOUSA et al.,2010).

Tendo em vista que o tratamento disponível no mercado farmacêutico para modular a inflamação apresenta diversos efeitos indesejados bem como a potencialidade farmacológica de preparações da folha da *A. muricata* destacados acima, o presente estudo buscou investigar o efeito deste frente ao edema de orelha induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) em camundongos. Adicionalmente, considerando-se importância de se estudar as plantas nativas e exóticas brasileiras, afim de contribuir para a pesquisa na área e até mesmo preservação destas; bem como espera-se que este projeto contribua também para agregar conhecimento a respeito dos compostos bioativos das folhas provenientes de plantas exóticas do nordeste, a exemplo da folha da *A. muricata*, e que através deste estudo, seja possível fomentar novas pesquisas e novos métodos relacionados à graviola e demais espécies proveniente da flora brasileira.

- **OBJETIVOS**

- **OBJETIVO GERAL:**

O objetivo geral do projeto foi investigar o efeito anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de *Annona muricata* (EAAM) e possíveis mecanismos subjacentes em camundongos.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

I- Avaliar o efeito tópico do EAAM no edema e na atividade de mieloperoxidase em modelo de inflamação tópica por 12-O-tetradecanoilforbol-13-1cetato;

II- Avaliar o efeito tópico do EAAM nas alterações oxidativas, atividade de enzimas antioxidantes e alterações histológicas em modelo de inflamação tópica induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

- **METODOLOGIA**

- **ANIMAIS**

Camundongos Swiss machos (20-30 g) foram obtidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. Os animais foram mantidos entre 21 e 23°C, com livre acesso a comida e água sob um ciclo de 12 horas claro / escuro. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Sergipe (número 9256010719).

- **MATERIAL VEGETAL: COLETA, PROCESSAMENTO E EXTRAÇÃO**

As folhas da *Annona muricata* L. foram coletadas no campus da Universidade Federal de Sergipe e uma exsicata foi depositada no Herbário da UFS sob o número ASE 35586. O material vegetal foi seco a 40°C por 72 horas. Após, o material seco foi submetido a moagem em equipamento Willey, rendendo 300 g de pó seco. Este pó foi submetido a infusão na quantidade de 100 g por litro de água destilada a 100°C. Após o resfriamento (25 °C), a infusão foi filtrada sob pressão reduzida, recuperando 1,8 L de solução. Esta solução foi submetida a liofilização (Equipamento LS3000-Terroni) para obter o extrato seco (28,2 g) com um rendimento de 9,4% (m/m). Esta etapa foi conduzida pelo Prof. Dr. Marcelo Duarte no Departamento de Farmácia da UFS

• **MODELO DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA**

Os animais (n = 6-8) foram anestesiados com isoflurano inalatório e 10 µL de TPA (1 µg / orelha dissolvido em acetona; Sigma Aldrich, EUA) foram aplicados nas superfícies interna e externa da orelha direita com ponteira de polipropileno. Após 5 min, foram aplicados 10 µL de EAAM (0,3, 1 ou 3 mg / orelha, dissolvido em solução salina) ou dexametasona (0,05 mg / orelha; Aché, Brasil). A orelha esquerda recebeu apenas os veículos e cada animal foi utilizado como controle próprio. Após 6 horas, os animais foram sacrificados e foram obtidos sítios da orelha de 8 mm de diâmetro com um *punch* de metal. O peso da orelha foi medido (em mg) e o edema foi calculado subtraindo a massa da orelha direita da orelha esquerda (OLIVEIRA et al. 2017).

Essas amostras de tecido foram submetidas à avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO), análise histológica, quantificação do total de hidroperóxidos e atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase.

A atividade do MPO foi determinada em homogenatos da orelha, preparados em tubos teste na presença de tampão fosfato [50 mmol/L, pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)]. Alíquotas do homogenato foram centrifugadas as 12.000 g. Em placa de 96 poços, alíquotas do sobrenadante foram adicionados à

solução de di-hidroclorato de *o*-dianisidina (0,167 mg/mL em tampão fosfato 50 mmol/L contendo 0,005% de peróxido de hidrogênio). Os valores de absorvância (460 nm) foram registrados durante 3 min e os resultados foram expressos como unidades de MPO (UMPO)/sítio de orelha, considerando-se que 1 UMPO se refere à quantidade de enzima que degradada 1 μmol de H_2O_2 /minuto (BRADLEY et al., 1982; OLIVEIRA et al. 2017).

A análise histológica foi realizada em cortes de 5 μm obtidos da orelha de camundongo, que foram corados com hematoxilina e eosina (Laborclin, Brasil). As fotografias foram avaliadas por um patologista especialista que não possuía informações sobre a identificação do grupo, para determinar os parâmetros histopatológicos. Para avaliação do número médio de células inflamatórias, um total de 15 campos por animal foram analisados com ampliação de x400. Para obter a espessura da epiderme, foi realizada análise quantitativa de imagens randomizadas de três cortes histológicos (quatro medidas/corte) de cada animal, utilizando o software UTHSCSA Image Tool14®. Os resultados foram expressos como a média de células inflamatórias ou espessura da epiderme por campo histológico.

A quantificação dos hidroperóxidos totais foi realizada como descrito anteriormente (Jiang et al. 1992). O homogenato da orelha foi misturado por 30 min com reagente FOX protegido por luz (composto por 0,25 mmol / L de xilenol laranja, 0,25 mmol / L de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 4,4 mmol / L de hidroxitolueno butilado (BHT) , Sigma Aldrich, EUA, enriquecido com metanol e ácido sulfúrico (97%), Merck, Brasil. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi medido a 560 nm. O hidroperóxido total foi expresso em $\mu\text{mol} / \text{L}$ com coeficiente de extinção molar de $4,3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da SOD foi determinada como descrito anteriormente (MADESH;BALASUBRAMANIAN 1998). Resumidamente, amostras de orelha foram homogeneizadas em PBS e centrifugadas (14.000 x g, 30 minutos, 4°C). Em seguida foram pipetadas em microplaca e, posteriormente, adicionados brometo de metiltiazolildifenil tetrazolio (1,25 mmol/L), ácido dietilenotriaminopenta acético (1 mmol/L) e pirogalol (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$). Depois de 5 minutos, dimetilsulfóxido foi adicionado

na microplaca e a absorbância foi registrada a 570 nm e corrigida pela concentração de proteínas e os resultados foram expressos em U/ μ g de proteína.

A atividade da catalase foi determinada pela medição do consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 0,3 mol/ L) como descrito anteriormente (NELSON; KIESOW 1972). Amostras de homogenato de orelhas foram e centrifugadas (14.000 x g, 30 minutos, 4°C), colocadas em microplaca de quartzo, contendo tampão fosfato (50 mmol/L, pH: 7.0) e H_2O_2 (0,3 mol/L). Na sequência, foi registrada a degradação do H_2O_2 pela absorbância a 240 nm em espectrofotômetro e o resultado foi normalizado pelo teor de proteínas e expresso em $\Delta\text{E}/\text{minuto}/\mu\text{g}$ de proteína.

O teor de proteína dos tecidos foi determinado pelo método de Bradford, utilizando o reagente de ensaio de proteína Bio-Rad®.

• ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm SEM. A avaliação estatística dos dados foi realizada com o GraphPad Prism 7.0. Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Não houve impedimento para a aplicação de testes paramétricos; portanto, os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

• RESULTADOS E DISCUSSÕES

O modelo de inflamação cutânea induzida por TPA foi utilizado. O TPA induz resposta inflamatória na epiderme da orelha dos camundongos semelhante a apresentada em doenças inflamatórias cutâneas (GÁBOR, 2002). Esta resposta gera aumento na produção de determinadas proteínas pró-inflamatórias, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), da liberação de citocinas pró-

inflamatórias (TNF- α , IL1 β , e IL-6) e aumento da permeabilidade vascular com consequente formação de edema (DE YOUNG et al., 1989).

No presente estudo, a aplicação do TPA (1 μ g/orelha) dissolvido em acetona (veículo) na orelha dos camundongos aumentou a massa dos sítios as orelhas, no tempo de 6 horas pós-administração, comprovando a indução do edema (dados mostrados na Figura 1 na forma da variação [delta] de massa de $22,5 \pm 1,1$ mg/sítio). O edema foi caracterizado como o aumento da massa tecidual da orelha de camundongos, devido à exsudação de proteínas plasmáticas e líquido para o meio extravascular, como resultante das alterações na microcirculação local, notadamente a vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular (DHALENDRA;SATAPATHY;ROY, 2013).

A formação do edema foi reduzida com a aplicação tópica concomitante do EAAM nas doses de 1,0 e 3,0 mg/orelha, quando comparado ao veículo (Figura 1). O tratamento concomitante com a droga usada como controle positivo, dexametasona (0,05 mg/orelha), também promoveu inibição da formação do edema de ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo veículo. Este resultado mostra o efeito antiedematogênico do EAAM.

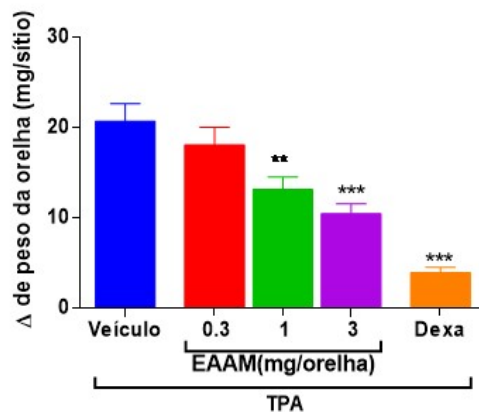


Figura 1: Efeito do extrato aquoso da *Annona muricata* (EAAM) no edema de orelhas inflamadas pela administração de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Os camundongos receberam tratamento tópico com EAAM (0,3, 1,0 ou 3,0 mg/orelha), dexametasona (Dexa, 0,05 mg/orelha) ou veículo (acetona), concomitantemente à administração de TPA (1 µg/orelha). Os dados foram expressos como a média ± E.P.M. para a variação da massa dos sítios de orelhas (edema) subtraindo-se a orelha ipsilateral da orelha contralateral. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey **P<0,01 e ***P<0,001, em relação grupo veículo).

Outro parâmetro importante da resposta inflamatória aguda é a migração de leucócitos. Assim foi aferido indiretamente o infiltrado de neutrófilos na orelha pela dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) no mesmo tecido usado para avaliação do edema. A administração tópica de TPA (1 µg/orelha) dissolvido em acetona, elevou a atividade da MPO, quando comparado ao grupo tratado topicamente apenas com acetona (controle, P<0,001, Fig. 2). Devido à sua importância no processo inflamatório e na lesão tecidual, a aferição da atividade de mieloperoxidase tem sido amplamente utilizada como um marcador de infiltração de neutrófilos (ROMAN;WENDLAND; POLANCZYK, 2008), pois essa enzima é encontrada predominantemente em grânulos azunófilos destes leucócitos. A MPO catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio e íons cloreto em ácido hipocloroso, promovendo reações de oxidação de ácido desoxirribonucleico, proteína e lipídios (PODREZ E; ABU-SOUD H.M.;HAZEN S.L., 2000).

Nas orelhas tratadas, concomitantemente, com as doses do EAAM (1,0 ou 3,0 mg/sítio) ou dexametasona, foi observada menor atividade de MPO (P<0,001 em comparação ao grupo veículo, respectivamente; Fig. 2), sendo que a dose de EAAM na dose de 0,3 mg/sítio não apresentou diferença significativa em relação ao grupo veículo. Estes dados indicam que o EAAM reduz o componente celular da resposta inflamatória cutânea aguda induzida pelo TPA.

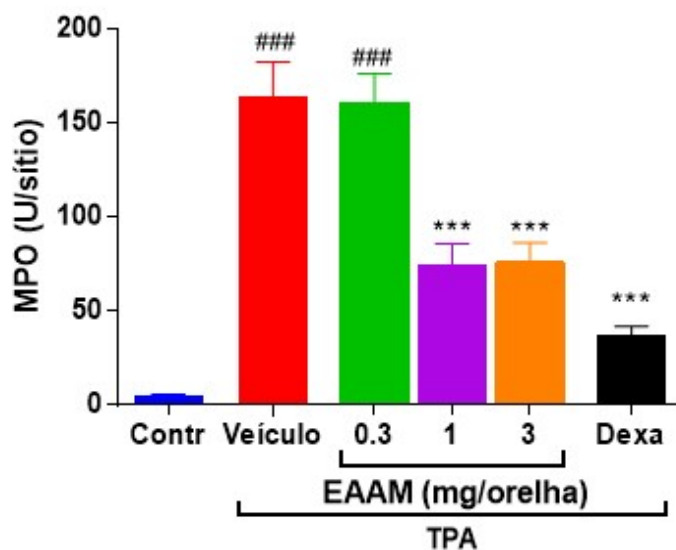


Figura 2: Efeito do extrato aquoso da *Annona muricata* (EAAM) na atividade de mieloperoxidase (MPO) em orelhas inflamadas pela administração de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Os camundongos receberam tratamento tópico com EAAM (0,3, 1,0 ou 3,0 mg/orelha), dexametasona (Dexa, 0,05 mg/orelha) ou veículo (acetona), concomitantemente à administração de TPA (1 µg/orelha). Os dados foram expressos como a média ± E.P.M. e para os valores de unidades (U) de MPO, para n=6-8 animais. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey (###P<0,001, em relação grupo controle (sem indução de inflamação); ***P<0,001, em relação grupo veículo).

Na sequência, realizou-se o estudo histológico de cortes do tecido coletados de camundongos após a administração de acetona (sem inflamação; Contr.) e com a inflamação induzida por TPA, sendo tratados com veículo (grupo TPA), EAAM na maior dose (3 mg/sítio) ou com dexametasona (Fig. 3).

Nos cortes demonstrativos do grupo Contr. foi possível observar a arquitetura normal do tecido da orelha (Fig. 3A e 3E). Nos cortes histológicos do grupo TPA foi observada intensa presença de edema, hiperemia e infiltrado leucocitário (Fig. 3B e 3F). Estas alterações foram observadas de forma menos frequente nas orelhas inflamadas com TPA e tratadas com EAAM (Fig. 3C e 3G) ou com dexametasona (Fig. 3D e 3H). Estes resultados confirmam o efeito anti-inflamatório do EAAM, observados na forma de redução de edema (Fig. 1) e da atividade de MPO (Fig. 2).

Outros estudos demonstraram o efeito anti-inflamatório de preparações das folhas de *A. muricata* e corroboram o presente estudo. De Souza et al. (2010) mostraram que o tratamento com o extrato etanólico das folhas da *A. muricata* reduziu o edema de pata e o exsudato pleural e infiltração de leucócitos induzidos por carragenina em ratos. O tratamento tópico com o extrato etilacetato das folhas da *A. muricata* também melhorou a cicatrização induzida por excisão, com redução da infiltração de neutrófilos e macrófagos e aumento da deposição de colágeno (MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

A decoção das folhas de *A. muricata* provocou efeito anti-inflamatório na inflamação induzida por TPA, que foi associado a modulação da liberação de óxido nítrico (QUILEZ et al., 2015). Apesar destas descrições de efeito anti-inflamatórios para as folhas desta planta, a participação do estresse oxidativo não está esclarecida.

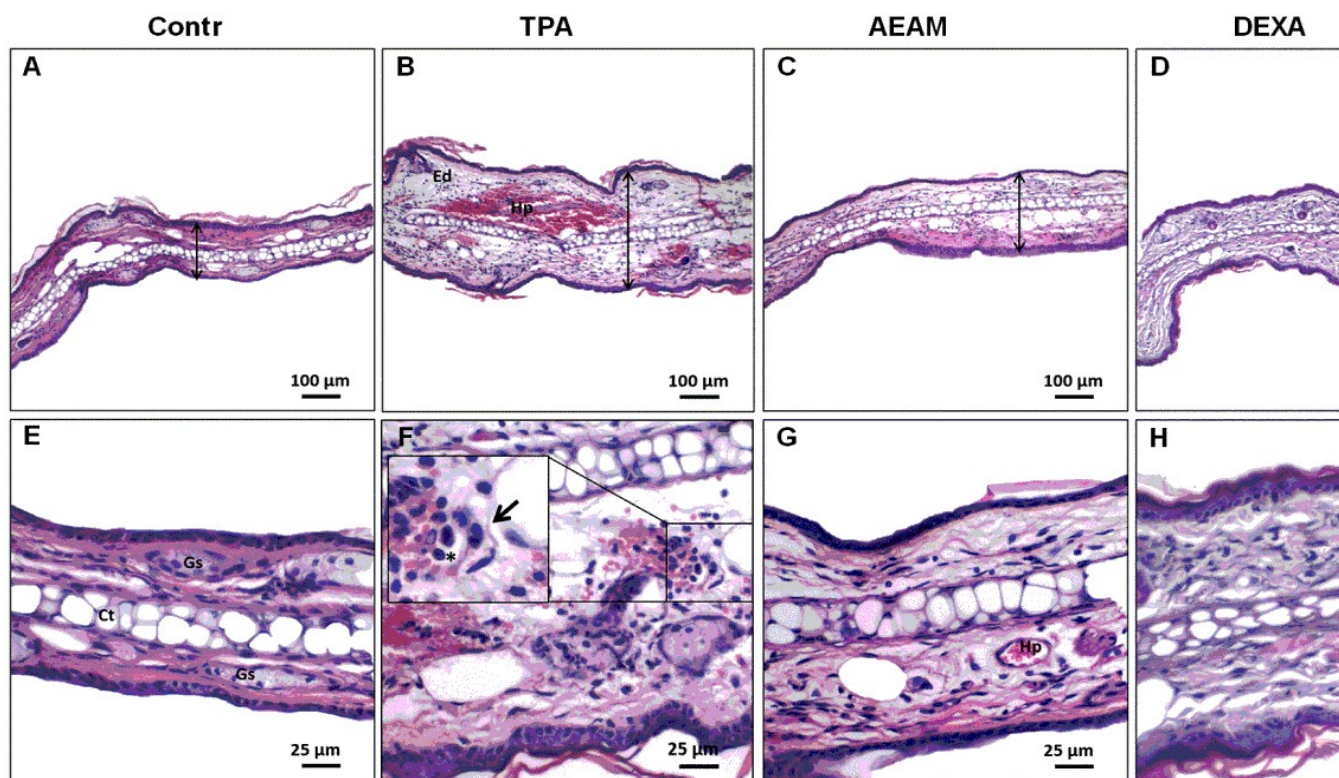


Figura 3: Imagens representativas das alterações histopatológicas em orelhas de camundongos inflamadas com 12-O-tetradecanoilforboleta-13-acetato (TPA) e tratadas com o extrato aquoso de folhas de *Annona muricata* L. (AEAM). Imagens histológicas representativas da orelha em ampliações de 100x (A-D) e 400x (E-H). Ct: cartilagem hialina; Gs: glândulas sebáceas; Ed: edema intersticial; Hp: hiperemia; Seta: infiltrado de leucócitos; Seta dupla: espessura do tecido dermoepidérmico; Dexa (dexametasona). As orelhas de controle (Contr) receberam apenas tratamento com veículo.

Como os radicais livres são importantes mediadores da resposta inflamatória e foram identificados compostos antioxidantes (quercetina 3-glucosídeo, rutina, ácido clorogênico, catequina e ácido gálico) por HPLC no lote de EAAM usado no presente estudo, fez-se relevante a avaliação do estresse oxidativo nas orelhas inflamadas com TPA. Foi utilizada a quantificação de hidroperóxidos para esta avaliação, que são produtos derivados da peroxidação lipídica formados durante os processos bioquímicos de peroxidação dos ácidos graxos insaturados, o que pode acarretar uma série de feitos deletérios também relacionados ao processo inflamatório e de estresse oxidativo.

O tratamento tópico com TPA (1 µg/orelha) dissolvido em acetona, elevou quantidade de hidroperóxidos totais, quando comparado ao grupo tratado topicamente

apenas com acetona ($P < 0,001$), denotando a presença de alterações oxidativas. Foi observada menor quantidade de hidroperóxidos nas orelhas tratadas concomitantemente com as doses do EAAM de 0,3 ($P < 0,05$ em comparação ao grupo veículo) ou 1,0 e 3,0 mg/sítio ($P < 0,001$ em comparação ao grupo veículo) (Fig. 4).

Estes resultados mostram que houve alterações oxidativas induzidas pelo TPA e estas foram menos presentes nas orelhas tratadas com o EAAM. É conhecido que o estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. Essa resposta leva à oxidação biomolecular, acarretando a perda de função biológica e ao desequilíbrio homeostático, manifestando-se como dano oxidativo de células e tecidos. Quando isto se torna um processo crônico, ou seja, contínuo, pode contribuir para o surgimento de patologias como aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (BARBOSA, et al. 2010).

Para que haja uma adequada proteção diante de uma geração excessiva de radicais livres, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante que tem por função impedir ou minimizar eventuais danos causados por EROs (espécies reativas de oxigênio) ou espécies reativas não-radicaais, dividindo-se em sistema enzimático e não-enzimático.

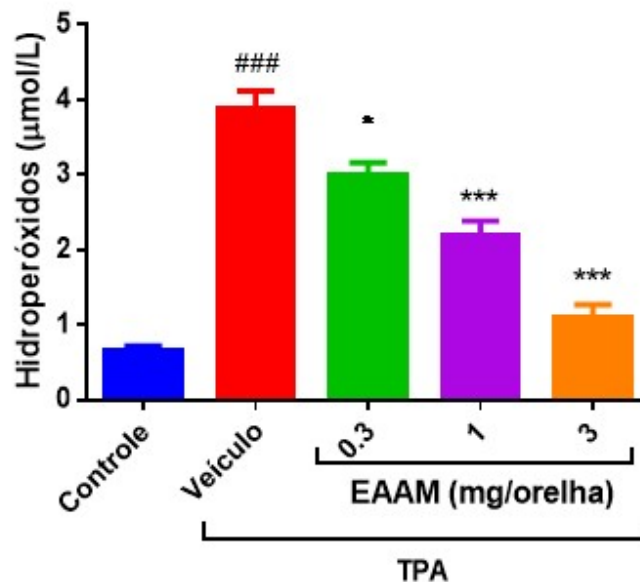


Figura 4: Efeito do extrato aquoso da *Annona muricata* (EAAM) na quantificação de hidroperóxidos em orelhas inflamadas pela administração de 12-Otetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Os camundongos receberam tratamento tópico com EAAM (0,3, 1,0 ou 3,0 mg/orelha), dexametasona (Dex. 0,05 mg/orelha) ou veículo (acetona), concomitantemente à administração de TPA (1 µg/orelha). Os dados foram expressos como a média ± E.P.M. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey (###P<0,001 em relação ao grupo controle; *P<0,05; **P<0,01 e ***P<0,001, em relação grupo veículo).

O sistema de defesa enzimático opera com diversas enzimas, dentre elas a superóxido dismutase e catalase, que catalisam a detoxificação das EROs formadas, barrando no início a cadeia de reações que levariam a propagação e amplificação do dano oxidativo (JASIULIONIS;SILVA., 2014).

A atividade dessas enzimas foi mensurada. O resultado referente a atividade da catalase está demonstrado na Figura 5. A administração tópica de TPA (1 µg/orelha) dissolvido em acetona, reduziu a atividade da enzima catalase, quando comparado ao grupo tratado topicamente apenas com acetona (P<0,001). Nas orelhas tratadas, concomitantemente, com a dose de EAAM (3 mg/sítio) foi observada maior atividade de catalase (P<0,05) em comparação ao grupo veículo, respectivamente; Fig. 5).

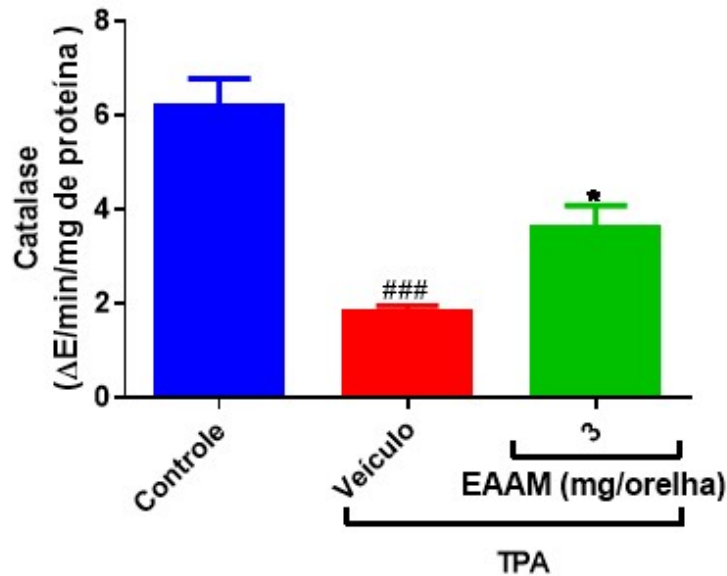


Figura 5: Efeito do extrato aquoso da *Annona muricata* (EAAM) na atividade da enzima catalase em orelhas inflamadas pela administração de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Os camundongos receberam tratamento tópico com EAAM (3 mg/orelha) ou veículo (acetona), concomitantemente à administração de TPA (1 µg/orelha). Os dados foram expressos como a média ± E.P.M. e ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey (###P<0,001 em relação ao grupo controle; *P<0,05 em relação grupo veículo).

A enzima catalase é a principal reguladora do metabolismo do peróxido de hidrogênio, sendo que este, quando em altas concentrações, possui alta toxicidade, porém quando em baixas concentrações é de fundamental importância para a realização de sinalização na proliferação celular, apoptose, metabolismo de carboidratos e ativação de plaquetas (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S., 1997).

Em relação a atividade da superóxido dismutase, foi observada redução da atividade após a administração tópica de TPA (1 µg/orelha) dissolvido em acetona (p<0,05 em comparação ao grupo controle). Contudo, nas orelhas tratadas, concomitantemente, com o EAAM (3 mg/sítio) não foi observada alteração da atividade desta enzima quando comparado ao grupo TPA (Fig.5).

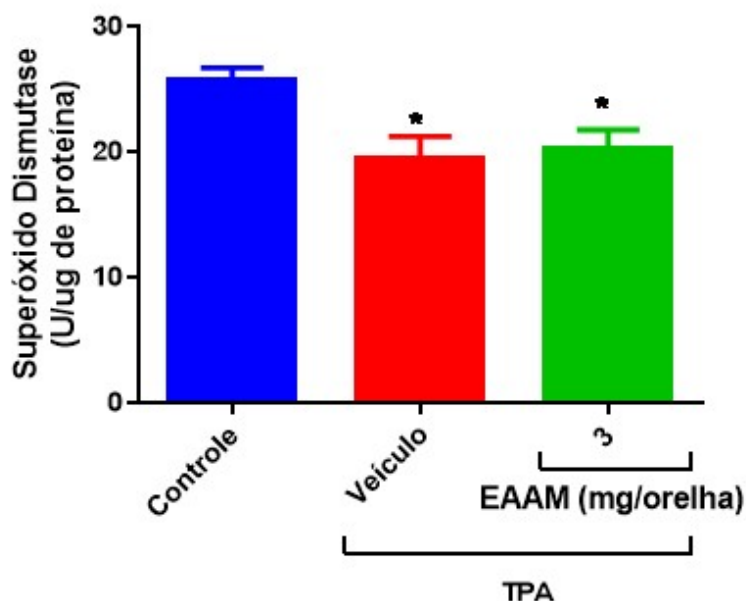


Figura 5: Efeito do extrato aquoso da *Annona muricata* (EAAM) na atividade da enzima SOD em orelhas inflamadas pela administração de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Os camundongos receberam tratamento tópico com EAAM (3 mg/orelha) ou veículo (acetona), concomitantemente à administração de TPA (1 µg/orelha). Os dados foram expressos como a média ± E.P.M. e ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey (*p<0,05 em relação ao grupo controle).

A enzima superóxido dismutase é responsável por catalisar a conversão de espécies reduzidas de elétrons de oxigênio molecular em peróxido de hidrogênio e oxigênio (BARBOSA et al.,2010).

A análise de hidroperóxidos, em conjunto com as análises de atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, indicam em parte o *status* oxidativo do tecido inflamado e se o extrato de EAAM estudado fora hábil em promover uma ação antioxidante. Como o efeito antioxidante do EAAM foi caracterizado pela redução dos hidroperóxidos totais e restabelecimento parcial da atividade da catalase (mas não da superóxido dismutase) pode-se afirmar que seu efeito antioxidante envolve a alteração da atividade da catalase. Esta caracterização é importante porque a alteração do conteúdo e/ou forma de lipídios na pele pode ocorrer no decurso do processo

inflamatório e a peroxidação lipídica representa uma importante forma de modificação oxidativa destas moléculas (URSO; CLARKSON, 2003).

Outras medidas complementares podem ser realizadas como a medida da expressão proteica de catalase e superóxido dismutase, ou a atividade e a expressão de outras enzimas importantes como a glutathione peroxidase, transferase e redutase, bem como a relação entre a concentração de glutathione oxidada/reduzida.

Em suma, os resultados mostraram que EAAM diminui o processo inflamatório induzido pelo TPA, modulando o edema e infiltrado inflamatório, em parte por modular as alterações oxidativas na orelha.

Este conhecimento é de importância não apenas para o conhecimento científico atrelado à possibilidade de uso terapêutico do EAAM como uma alternativa aos fármacos presentes no mercado, mas também é relevante para o estudo e utilização de fitoterápicos de forma consciente e comprovada cientificamente. A *Annona muricata* é uma planta comumente encontrada no Brasil e muito utilizada para diversas finalidades tanto na medicina tradicional, quanto na indústria alimentícia (BARATA et al., 2013; CORIA-TÉLLEZ et al., 2016). Os resultados obtidos neste estudo agregam mais conhecimento aos estudos a respeito da *Annona muricata*, fomentando pesquisas no seu potencial anti-inflamatório e antioxidante. Por fim, o presente estudo destaca a potencialidade deste produto natural para tratar condições inflamatórias e dolorosas. Ademais, servirá de base para estudos futuros direcionados para melhor compreender as ações do EAAM em outras doenças.

• CONCLUSÕES

Ao final deste estudo pôde-se concluir que o extrato aquoso das folhas de *Annona muricata* induziu efeitos anti-inflamatório e antioxidante tópicos, através da redução de infiltrado inflamatório de neutrófilos, redução da formação de edema e das alterações histológicas. Estes efeitos foram alcançados contando com a modulação da atividade da catalase e da peroxidação lipídica analisada indiretamente pela quantidade de hidroperóxidos.

Assim, pode-se afirmar que o estudo obteve êxito ao utilizar o extrato aquoso das folhas de *A. muricata* para tratar a inflamação induzida pelo modelo experimental proposto.

- **PERSPECTIVAS DE FUTUROS TRABALHOS**

Diante dos resultados promissores aqui expostos a cerca do efeito anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de *A. muricata*, aliado a efeitos antioxidantes aqui também expostos anteriormente, novos estudos poderão ser realizados para aferir seus efeitos em outros modelos animais que analisam a resposta inflamatória aguda tópica. Por fim, este estudo será encaminhando tanto para apresentações em congressos e jornadas científicas quanto para publicação como artigo científico em revista científica.

- **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDULLAH, F.; SINA, I. **The potential of soursop seed extract *Annona muricata* Linn as a biopesticide against aphids *Aphis gossypii* glover (Homoptera: Aphididae) on chilly.** Malaysian Journal of Science, v.22, n.2, p.11-16, 2003.

ABDULLAH, M. et al. **The Value of Caspase-3 after the Application of *Annona muricata* Leaf Extract in COLO-205 Colorectal Cancer Cell Line.** Gastroenterology Research and Practice, v. 2017. p. 1–5, 2017.

ADEWOLE, S.O., CAXTON-MARTINS, E.A., 2006. **Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic B-cells of Streptozotocin-treated diabetic rats.** Afr. J. Biomed. Res. 9,173-187. ansiolítica en ratones. Rev. Colomb. Cienc. Quím, Farma. 38, 105-120.

ARROYO, J. et al., 2009. **Efecto hipoglicemiante coadyuvante del extracto etanólico de hojas de Annona muricata L (guanábana), en pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento de glibenclamida.** An. Fac. Med. 70,163-167

ARTHUR, F.K. et al., 2012. **Evaluation of hepatoprotective effect of aqueous extract of Annona muricata (Linn.) leaf against carbon tetrachloride and acetaminophen-induced liver damage.** J. Nat. Pharm. 3, 25-30.

BARATA, L. E. S.; ALENCAR, A. A. J.; TASCONE, M.; Tamashiro, J. **Brazilian Medicinal Plants. IV. Annona muricata L. (Graviola).**

BARBOSA, KIRIAQUE BARRA FERREIRA et al . **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** Rev. Nutr., Campinas , v. 23, n. 4, p. 629-643, Aug. 2010 .

BASKAR R, et al. **In vitro antioxidant studies in leaves of Annona species.** Exp Biol. 2007 May;45(5):480-5

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T.S. **In vitro antioxidant studies in leaves of Annona species.** Indian Journal of Experimental Biology, v.45, p.480-485, 2007.

BRADLEY, P. P., PRIEBAT, D. A., CHRISTENSEN, R. D., & ROTHSTEIN, G. (1982). **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker.** *Journal of Investigative Dermatology*, 78(3), 206-209.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**, 2ª ed. Ed. Museu Paraense.

CORIA-TÉLLEZ, A. V. et al. **Annona muricata: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity.** *Arabian Journal of Chemistry*, 22 jan. 2016.

DE CARVALHO, J.M.; DOS SANTOS, A.F.; SANT'ANA, A.E.G. **Estudo da atividade moluscicida da *Annona muricata*.** XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Anais do Congresso, QB-028, 2000.

DE YOUNG, L. M. et al. **Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents.** *Agents and Actions*, v. 26, n. 3–4, p. 335–341, mar. 1989.

DE SOUSA, O.V., VIEIRA, G.D., DE JESUS, R.G., DE PINHO, J., YAMAMOTO, C.H., & ALVES, M.S. (2010). **Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models.** *International Journal of Molecular Science*, 11(5), 2067–2078. <https://doi.org/10.3390/ijms11052067>

DIORGE J. Marmitt et al., **Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L. (guanábana) de Cuzco.**

FARSHCHI A, GHIASI G. **Comparison the analgesic effects of single dose administration of tramadol or piroxicam on postoperative pain after cesarean delivery.** *Acta Med Iran* 2010;48:148-53.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo , v. 43, n. 1, p. 61-68, Mar. 1997 .

FOONG, CHAN PIT; HAMID, ROSLIDA ABDUL. **Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves.** *Rev. bras. farmacogn.*, Curitiba , v. 22, n. 6, p. 1301-1307, Dec. 2012

GÁBOR, M. **The Mouse Ear as a Model for Cutaneous Irritation.** Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology, v. 21, n. 3, p. 191–202, 1 jan. 2002.

HAMIZAH, S. et al., 2014. **Patient with metastatic breast cancer achieves stable disease for 5 Years on graviola and xeloda after progressing on multiple lines of therapy.** Adv. Breast Cancer Res. 3, 84-87.

HAVSTEEN,B. et al.; **Biochem. Pharmacol.** 1983, 32, 1141.

HILARIO, MARIA ODETE ESTEVES; TERRERI, MARIA TERESA; LEN, CLÁUDIO ARNALDO. **Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxygenase 2.** J. Pediatr. (Rio J.), Porto Alegre , v. 82, n. 5, supl. p. S206-S212, Nov. 2006 .

HISS, LORRAINE STEPHANE. **Extratos de folhas de annona muricata são citotóxicos e reduzem a proliferação celular em carcinoma epidermóide oral in vitro.** 2019. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2019 Investigación 14, 29-33.

KIM, G.S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L.L.; WU, F.E.; SASTRODIHARDJO, S.; MCLAUGHLIN J.L. **Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of Annona muricata in honour of professor G.H. Neil Towers 75th birthday.** Phytochemistry, v.49, p.565-571, 1998.

LINLIN CHEN, et al. **Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs.** Oncotarget, 2018, Vol. 9, (No. 6), pp: 7204-7218.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

MADESH, M., & BALASUBRAMANIAN, K. A. (1998). **Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide.** *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 35(3), 184-188.

MAUL, A.A.; COUTINHO, C.B.M.; BRAZZACH, M.L.; SILVA, C.M. **Extração super crítica das sementes de graviola.** XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, UFPE, Recife, Anais do Congresso, p.174, 2000.

MEDZHITOV, R. 2008. **Origin and physiological roles of inflammation.** *Nature*, v.454, p.428–435.

MIRANDA, NATÁLIA CARNEVALLI DE. **Efeito do extrato bruto etanólico da planta *Annona muricata* L. (Graviola) e suas frações no controle da infecção in vitro e in vivo por *Toxoplasma gondii*.** 2018. 73 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia.

MOGHADAMTOUSI S.Z. et al., ***Annona muricata* leaves induce g1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells.** *J. Ethnopharmacol.* 2014;156:277–289.

MOGHADAMTOUSI S.Z. et al., **The chemopotential effect of *Annona muricata* leaves against azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect of acetogenin annomuricin E in HT-29 cells: A bioassay-guided approach.** *PLoS ONE.* 2015.

MOGHADAMTOUSI SZ, et al. ***Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities.** *Int J Mol Sci.* 2015 Jul 10;16(7):15625-58.

MOGHADAMTOUSI, S.Z., HAJREZAIE, E.R.M., KARIMIAN, M., ABDULLA, M.A. & KADIR, H.A. (2015). ***Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence.** *International Journal of Surgery*, 18, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2015.03.026>.

MORTON, J.S. et al., In: **Fruits of warm climates. Possible mechanisms of action of the hypotensive effect of *Annona muricata* (soursop) in normotensive Sprague–Dawley rats.** *Pharm. Biol.* 50(11), 1436-1441.

NELSON, D. P., & KIESOW, L. A. (1972). **Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV).** *Analytical biochemistry*, 49(2), 474-478.

OLIVEIRA, A. S. et al. **The ethanol extract of *Leonurus sibiricus* L. induces antioxidant, antinociceptive and topical anti-inflammatory effects.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 206, p. 144–151, 12 jul. 2017.

OVIEDO, V. et al., 2009. **Extracto y fracción alcaloidal de *Annona muricata* con actividad de tipo.**

PODREZ E, ABU-SOUD HM, HAZEN SL. **Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis.** *Free Radic Biol Med.* 2000; 28 (12): 1717-25.

POMA, E. et al., 2011. **Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L. (guanábana) de Cuzco.**

QUILEZ, A., MONTESERRAT-DE LA PAZ, S., DE LA PUERTA, R., FERNANDEZ-ARCHE, M., & GARCÍA-GIMÉNEZ, M. (2015). **Validation of ethnopharmacological use as anti-inflammatory of a decoction from *Annona muricata* leaves.** *African Journal of Traditional and Complementary Alternative Medicine*, 12, 14–20. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v12i4.3>

ROMAN, RAQUEL MELCHIOR; WENDLAND, ANDREA ELISABET; POLANCZYK, CARISI ANNE. **Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica.** *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo , v. 91, n. 1, p. e12-e19, July 2008 .

R.W. BUSSMANN et al. **Townesmith Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies** J. Ethnopharmacol., 132 (2010), pp. 101-108.

ROSLIDA, A.H. et al., 2012. **Antinociceptive and antiulcerogenic activities of the ethanolic extract of Annona muricata leaf.** Brazilian J. Pharmacogn. 1, 1-12.

SCRIVO R. et al., **Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases.** Autoimmun Rev. 2011;10(7):369-374.

SILVA, A. C. UNESP. **Potencial de resíduos agroindustriais como fontes de compostos bioativos.** Aleph, p. 109 f. : il. color., gráfs., tabs., 10 out. 2014.

SILVA, CAMILA TAINAH DA; JASIULIONIS, MIRIAM GALVONAS. **Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer.** Cienc. Culto. São Paulo, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014

SILVA, L. M.; NEPOMUCENO, J. C. **Efeito modulador da polpa da graviola (Annona muricata) sobre a carcinogenicidade da mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em Drosophila melanogaster.** v. 1, n. 8, p. 15, 2011.

SILVA, L.C.N.; MENDONÇA, S.M.L.; NASCIMENTO, R.L.; LIMA, I.S.; SANT'ANA, A.E.G. **Isolamento dos constituintes voláteis dos frutos da Annonaceae, Annona muricata (graviola).** XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Anais do Congresso, PN-126, 1997.

STEYEMARK, J.A; MAAS, P.J.M.; BERRY, P.E.; JOHNSON, D.M.; MURRAY, N.A; RAINER, H. **Annonaceae in Flora of the Venezuelan Guayana**. The Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, vol 2, pp.423, 1997.

WÉLÉ, A.; ZHANG, Y.; CAUX, C.; BROUARD, J.P.; POUSSET, J.L.; BODO, B. **Annomuricatin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata***. *Comptes Rendus Chimie*, v.7, n.10-11, p.981-988, 2004.

WOODWARD, D. F.; JONES, R. L.; NARUMIYA, S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: **classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress**. *Pharmacological Reviews*, v. 63, n. 3, p. 471–538, set. 2011.

WU, L.; LU, Y.; ZHENG, Q.T.; TAN, N.H.; LI, C.M.; ZHOU, J. **Study on the spatial structure of annomuricatin A, a cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata***. *Journal of Molecular Structure*, v.827, p.145-148, 2007.

WU; Y.C. **Cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata***. U.S. Patent Application 31/07/2003,.

Y. GAVAMUKULYA, et al. **Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola)**. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 7 (2014).

OUTRAS ATIVIDADES

- Elaboração e submissão de trabalhos para apresentação em congressos;
- Análise do banco de dados ;

- Treinamento relacionado à pesquisa bibliográfica, revisões sistemáticas e indução do modelo da metanálise proposta;
- Participação das reuniões científicas da pesquisa, com o intuito da análise e discussão dos dados referentes a coleta e orientação para submissão de resumos e artigos científicos.