



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

JOSÉ GERALDO DE ALENCAR SANTOS JÚNIOR

**PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOPROTETORA
E ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS
FOLHAS DE *Annona coriacea* Mart. (ARATICUM)**

**FORTALEZA – CEARÁ
2016**

JOSÉ GERALDO DE ALENCAR SANTOS JÚNIOR

PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOPROTETORA E
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona
coriacea* Mart. (ARATICUM)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Anima da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes.

Coorientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho.

FORTALEZA – CEARÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Santos Júnior, José Geraldo de Alencar.

Perfil químico e avaliação da atividade citoprotetora e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona coriacea* Mart. (ARATICUM) [recurso eletrônico] / José Geraldo de Alencar Santos Júnior. – 2016.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo em formato PDF do trabalho acadêmico com 77 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientação: Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes.

Coorientação: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1. *Annona coriacea*. 2. Cloreto de mercúrio. 3. Flavonoides. 4. Antimicrobiana.
5. Aminoglicosídeos. I. Título.

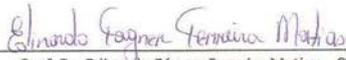


ATA – DEFESA DE DISSERTAÇÃO

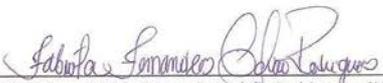
Ata de Defesa de Dissertação do aluno **JOSÉ GERALDO DE ALENCAR SANTOS JÚNIOR**. Aos dezessete dias do mês de junho de 2016, às 14h00, reuniu-se a banca de Defesa de Dissertação composta pelos Professores Doutores: Henrique Douglas Melo Coutinho (Universidade Regional do Cariri, Coorientador, Presidente), José Galberto Martins da Costa (Universidade Regional do Cariri, examinador), Edinaldo Fágner Ferreira Matias (Centro Universitário Leão Sampaio, examinador) e Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues (Centro Universitário Leão Sampaio, examinadora), perante a qual **JOSÉ GERALDO DE ALENCAR SANTOS JÚNIOR**, aluno regularmente matriculado no Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal – MPBiotec, Ponto Focal Ceará, defendeu, para o preenchimento do requisito de mestre, sua Dissertação intitulada “**Perfil químico e avaliação da atividade citoprotetora e antimicrobiana no extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona coriacea* Mart. (ARATICUM)**”, a defesa da referida Dissertação ocorreu das 14h00 às 14:40, tendo o mestrando sido submetido à sabatina, dispondo de cada membro da banca de tempo para tal. Finalmente, a banca se reuniu em separado e concluiu por considerar o mestrando APROVADO por sua dissertação e sua defesa ter recebido, por unanimidade, o conceito SATISFATORIO.

Eu, Henrique Douglas Melo Coutinho, que presidi a Banca de Dissertação, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros, e dou fé. Em Crato, 17 de junho de 2016.


Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – URCA
(Presidente)


Prof. Dr. Edinaldo Fágner Ferreira Matias – CULS
(Examinador)


Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa – URCA
(Examinador)


Profa. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues – CULS
(Examinadora)

Aos meus pais: José Geraldo e Maria Evaneide, por me apoiarem em todas as minhas escolhas e SEMPRE acreditarem em meus projetos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Agradeço à orientação do Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho da Universidade Regional do Cariri - URCA, e ao Prof. Fernando Gomes Figueredo, por ter colaborado durante todo o projeto juntamente com o colaborador Prof. Cunha.

Quero agradecer também as minhas irmãs Maria Joyceneide Alves e Maria Julya Alves, que embora não tivessem conhecimento disto, mas iluminaram de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar de mais conhecimentos. E não deixando de agradecer de forma grandiosa a meus pais, José Geraldo de Alencar Santos e Maria Evaneide Alves, a quem eu rogo todas as noites a minha existência.

Às minhas amigas Janyketchuly, Nara Luana e Najla por tornarem os momentos mais divertidos e pela amizade, agradeço pela companhia em todas as viagens e pela ótima convivência durante todo o mestrado.

A Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte - FMJ, pelas contribuições para que esse estudo fosse realizado.

Ao colega Vandenberg pela sua colaboração nos testes microbiológicos, agradeço muito pela disponibilidade em ajudar durante a realização dos mesmos.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado”.

(Roberto Shinyashiki)

RESUMO

A família Annonaceae inclui 112 gêneros com aproximadamente 2.150 espécies tropicais e subtropicais, espalhadas por todo o planeta. Dos gêneros existentes, há 29 registrados no Brasil, compreendendo cerca de 260 espécies, destacando-se o *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae), popularmente conhecida como araticum, é encontrada nas regiões Sudeste, Norte e Nordeste do Brasil, especialmente no Ceará. As folhas são usadas na medicina popular como carminativa, estomáquica, antirreumática e anti-helmíntica por via oral e, externamente, em compressas e bochechos, no tratamento de estomatite, nevralgias e cefaleias, bem como, na forma de cataplasma em furúnculos e úlceras para induzir a supuração. Este trabalho teve como objetivo identificar o perfil químico e avaliar a atividade antimicrobiana e citoprotetora contra a toxicidade do cloreto de mercúrio do extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona coriacea* Mart. (EHAC). A caracterização dos componentes químicos foi realizada através da análise em cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo com as cepas de *Staphylococcus aureus* (Rosenbach), *Escherichia coli* (T. Escherich) e *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter). Para avaliação da atividade moduladora dos antibióticos aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina), os antibióticos foram diluído seriadamente nos poços contendo o meio de cultura *Brain Heart Infusion Broth* – BHI a 10% e a suspensão com o inóculo da cepa multirresistente, com o EHAC na concentração subinibitória (CIM/8). A atividade citoprotetora frente ao cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) foi verificada com placas de microdiluição que foram incubadas por 24h a 37 °C. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada utilizando placas de Petri com BHI para transferência das soluções incubadas em placas de microdiluição. A análise em CLAE revelou a presença de flavonóides como luteolina (1,84%) e quercetina (1,19%) em elevadas concentrações ($p < 0,05$). O extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona coriacea* Mart - EHAC apresentou CIM $\geq 512 \mu g/ml$ e ação antagônica na modulação com aminoglicosídeos ($p < 0,0001$), também apresentou atividade citoprotetora às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* ($p < 0,0001$) frente ao metal pesado cloreto de mercúrio, sendo essa ação atribuída às propriedades quelantes dos flavonóides encontrados na identificação química. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o extrato hidroalcoólico de *Annona coriacea* Mart. apresenta atividade citoprotetora sobre as cepas testadas, como também pode apresentar efeito antagônico quando associado aos aminoglicosídeos.

Palavras-chave: *Annona coriacea* Mart. Cloreto de mercúrio. Flavonóides. Antimicrobiana. Aminoglicosídeos.

ABSTRACT

The Annonaceae family includes 112 genera with about 2,150 tropical and subtropical species, spread across the planet. Of existing genres, there are 29 registered in Brazil, comprising about 260 species, highlighting the *Annona coriacea* Mart. (*Annonaceae*), popularly known as soursop, is found in the Southeast, North and Northeast of Brazil, especially in Ceará. The leaves are used in folk medicine as a carminative, stomachic, anti-rheumatic and anti-helminth orally and externally compresses and rinsing in the treatment of stomatitis, neuralgia and headache as well as in the form of poultice in boils and ulcers to induce suppuration. This study aimed to identify the chemical profile and evaluate the antimicrobial activity and cytoprotective against the toxicity of mercury chloride hydroalcoholic extract of *Annona coriacea* Mart. leaves (EHAC). The characterization of the chemical components was performed by analysis in high-performance liquid chromatography - HPLC. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by the microdilution broth method with strains of *Staphylococcus aureus* (Rosenbach), *Escherichia coli* (T. Escherich) and *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter), to evaluate the modulatory activity of aminoglycoside antibiotics (gentamicin and amikacin), antibiotics were serially diluted in the wells containing culture medium Brain Heart Infusion Broth - BHI 10%, and the inoculum suspension with multiresistant strain with EHAC in subinhibitory concentration (MIC/8). The cytoprotective activity against mercuric chloride (HgCl_2) was checked with microdilution plates were incubated for 24h at 37 °C. The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined using Petri dishes with agar BHI for transferring the solutions incubated in microdilution plates. The HPLC analysis revealed the presence of flavonoids as luteolin (1.84%) and quercetin (1.19%) at high concentrations ($p < 0.05$). The hydroalcoholic extract of *Annona coriacea* Mart. - EHAC presented MIC $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ and antagonistic action in the modulation with aminoglycosides ($p < 0.0001$), also showed cytoprotective activity to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* ($p < 0.0001$) compared to heavy metal mercury chloride with significance, and this action attributed to the chelating properties of the flavonoids found in chemical identification. The results of this study showed that hydroalcoholic extract of *Annona coriacea* Mart. has cytoprotective activity on the tested strains, and may also have an antagonistic effect when associated with aminoglycosides.

Keywords: *Annona coriacea* Mart. Mercuric chloride. Flavonoids. Antimicrobial. Aminoglycoside.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	<i>Annona coriacea</i> Mart.....	21
Figura 2 -	Mecanismos de ação dos componentes dos produtos naturais.	22
Figura 3 -	Mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos.....	28
Figura 4 -	Espécie de <i>Annona coriacea</i> Mart., em (a) pode ser observado à árvore, em (b) o fruto.....	35
Figura 5 -	Folhas de <i>Annona coriacea</i> Mart. usadas para obtenção do extrato e identificação.....	36
Figura 6 -	Placa de microdiluição indicando a CIM após introdução de resazurina.....	40
Figura 7 -	Visualização do crescimento em placas de Petri após 72 h das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Escherichia coli</i> ATCC 9027.....	41
Quadro 1 -	Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.....	38
Gráfico 1 -	Perfil em cromatografia líquida de alto desempenho do extrato hidroalcoólico de araticum (<i>Annona coriacea</i> Mart.).....	42
Gráfico 2 -	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos aminoglicosídeos na presença e na ausência do extrato de <i>Annona coriacea</i> Mart. em uma concentração CIM/8, frente a cepas multirresistente de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Gráfico 3 -	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos aminoglicosídeos na presença e na ausência do extrato de <i>Annona coriacea</i> Mart. em uma concentração CIM/8, frente a cepas padrões de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
Gráfico 4 -	Concentração Bactericida Mínima (CBM) do cloreto de mercúrio na presença e na ausência do extrato de <i>Annona coriacea</i> Mart. em uma concentração CIM/8, frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (infusão de cérebro e coração)
CE	Sigla do Estado do Ceará, Brasil
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM/8	Concentração subinibitória
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	<i>Escherichia coli</i>
EHAC	Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Annona coriacea</i>
FMJ	Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte
HIA	<i>Heart Infusion Agar</i>
p	Nível de significância
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
URCA	Universidade Regional do Cariri

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	JUSTIFICATIVA	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	USO DE PRODUTOS NATURAIS NO BRASIL.....	18
3.2	DADOS BOTÂNICOS.....	19
3.2.1	Família Annonaceae	19
3.2.2	<i>Annona coriacea</i> Mart.	20
3.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	21
3.3.1	Taninos	22
3.3.2	Flavonoides	23
3.3.3	Terpenos	23
3.3.4	Alcaloides	24
3.4	MICROBIOLOGIA E INFECÇÃO.....	24
3.5	AMINOGLICOSÍDEOS.....	26
3.6	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	27
3.7	RESISTÊNCIA A AMINOGLICOSÍDEOS.....	29
3.8	INTOXICAÇÃO POR METAIS PESADOS.....	29
3.8.1	Cloreto de mercúrio	30
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL.....	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
5	METODOLOGIA	33
5.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	33
5.2	MATERIAL PERMANENTE E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	33
5.3	DROGAS, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	34
5.4	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA.....	34
5.5	PREPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO.....	35
5.6	IDENTIFICAÇÃO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE.....	36
5.7	MATERIAL BACTERIANO.....	37
5.8	PREPARO DA SOLUÇÃO INICIAL E DAS SOLUÇÕES DE TESTE.....	38
5.9	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E	39

	MODULAÇÃO DOS AMINOGLICOSÍDEOS.....	
5.10	TESTE DE ATIVIDADE CITOPROTETORA FRENTE AO CLORETO DE MERCÚRIO.....	40
5.11	ANALISE ESTATÍSTICA.....	41
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXOS	61
	ANEXO A – COMPROVANTE SUBMISSÃO ARTIGO 1.....	62
	ANEXO B – ARTIGO SUBMETIDO.....	64

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa para produção de novos fármacos a partir de produtos naturais envolvem diversos campos do conhecimento biotecnológico e vários métodos de análise, desde a coleta e identificação do material, até à triagem biológica em ensaios farmacológicos, determinação do princípio ativo e mecanismo de ação pelo qual o efeito farmacológico é exercido (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

A necessidade de pesquisas com produtos naturais motiva a substituição de substâncias químicas sintéticas por materiais naturalmente de baixo custo e de fácil acesso, uma vez que os benefícios da pesquisa podem contribuir com a conservação da vegetação natural e sustentabilidade dos sistemas de produção seminatural (CHOU et al., 2006).

A família Annonaceae inclui 112 gêneros com aproximadamente 2.150 espécies tropicais e subtropicais, espalhadas por todo o planeta. Dos gêneros existentes, há 29 registrados no Brasil, compreendendo aproximadamente 260 espécies, destacando-se o *Annona*. *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae), popularmente conhecida como araticum, é encontrada nas regiões Sudeste, Norte e Nordeste do Brasil, especialmente no Ceará (SOUSA, 2003). As folhas são usadas na medicina popular como carminativa, estomáquica, antirreumática e anti-helmíntica por via oral e, externamente, em compressas e bochechos, no tratamento de estomatite, nevralgias e cefaleias, bem como, na forma de cataplasma em furúnculos e úlceras para induzir a supuração (LORENZI; MATOS, 2002).

O desenvolvimento de infecções bacterianas em humanos inclui uma variedade de bactérias. Dentre elas o *Staphylococcus aureus* (Rosenbach) é a espécie mais importante causadora de infecções e diferentes tipos de intoxicações, representa o agente etiológico mais comum de infecções na pele, pulmões, ossos e no sistema sanguíneo (DEURENBERGER et al., 2007; GELATTI et al., 2009). A espécie *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) é a principal causa de infecções hospitalares, possui toxinas e enzimas na sua estrutura que proporcionam significativo aumento na sua virulência, tornando-a resistentes a antibióticos,

agredindo o trato urinário, ouvidos e olhos (MURRAY et al., 2008). *Escherichia coli* (T. Escherich) é a espécie mais comum do gênero *Escherichia*, associado a infecções graves do trato urinário, meningite e gastroenterite (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2008).

Há muitos anos, os metais pesados têm sido utilizados em diversas atividades, apesar de sua toxicidade ter sido bem relatada, a exposição a estes elementos tem aumentado principalmente em países menos desenvolvidos (JARUP, 2003; PAULA, 2012). A contaminação por metais pesados tem sido alvo de muitos estudos com a finalidade de desvendar os mecanismos envolvidos em sua toxicidade e seus efeitos nocivos para os seres vivos (COGO et al., 2009).

O mercúrio é o único metal que em temperatura ambiente e em condições normais de pressão pode ser encontrado no estado líquido, formando vapores incolores e inodoros. Pode estar associado a outros elementos químicos formando compostos orgânicos (metilmercúrio), sendo também encontrado na forma de compostos inorgânicos ou sais (CARDOSO et al., 2001). Dentre estas formas, as mais comumente encontradas no ambiente são o mercúrio metálico, sulfeto de mercúrio, cloreto de mercúrio e o metilmercúrio (AZEVEDO, 2002).

O mercúrio, é um dos sérios poluentes ambientais, constitui um dos metais mais tóxicos, as fontes potenciais de mercúrio são resultantes da mineração do ouro, atividades industriais, queima de lixo, fundições e garimpo (ESTEVES, 1998; LEMOS et al., 1998), exploração mineral e refino do metal, indústrias de polpa e papel, indústrias de plástico e eletrônica, práticas agrícolas, hospitais e indústrias de medicamentos de mercúrio (AZEVEDO, 2002).

Tendo em vista o uso popular de suas folhas, bem como registros na literatura comprovando algumas atividades biológicas apresentadas por *Annona coriacea* Mart., resolveu-se pela realização da análise da atividade antimicrobiana e citoprotetora contra cloreto de mercúrio, e o perfil químico do extrato hidroalcoólico das suas folhas.

2 JUSTIFICATIVA

As observações populares a respeito do uso e eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, mantendo assim, a prática do consumo de fitoterápicos, validando informações que foram acumuladas durante séculos (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002).

As plantas medicinais vêm sendo consideradas como opções terapêuticas com várias aplicabilidades, em virtude de alguns produtos naturais com ação antimicrobiana apresentarem baixo risco de resistência, justificado pela sua composição complexa de constituintes, que dificulta a adaptabilidade microbiana (DAFERERA; ZIOGASB; POLISSIOU, 2003).

Dentre as justificativas para o desenvolvimento de novos antimicrobianos a partir de produtos naturais, a resistência microbiana é considerada a principal por se definir como a capacidade de multiplicação de microrganismos, mesmo com a presença de antimicrobianos em concentrações elevadas (WANNMACHER, 2004), associada ao uso crescente e inadequado de antimicrobianos, e procedimentos que favorecem a invasão de microrganismos multirresistentes (SCHAECHTER et al., 2002).

Embora a família *Annonaceae* seja bastante estudada, poucos foram os trabalhos encontrados na literatura acerca da espécie *Annona coriacea* Mart. As substâncias majoritárias desta família estão presentes em diferentes partes destas plantas tais como folhas, frutos, sementes e raízes.

O conhecimento popular da utilização desta planta está no consumo de seu fruto que possui grande potencial nutritivo e são apreciados pela sua polpa comumente consumidos *in natura* ou sob a forma de doces, geleias, sucos, licores e tortas (BARBALHO et al., 2012). E na utilização da folha com ação carminativa, estomáquica, antirreumática e anti-helmíntica e anti-inflamatória (LORENZI; MATOS, 2002).

Assim, o trabalho se justifica pelo pouco estudo sobre a utilização das folhas desta planta, e pela tentativa de observar as atividades do extrato hidroalcoólico das folhas, em especial sobre cepas bacterianas e frente ao cloreto de mercúrio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 USO DE PRODUTOS NATURAIS NO BRASIL

Ao longo dos tempos vem-se observando o aumento da utilização de plantas para fins medicinais como prevenção de doenças, tratamento e cura, essa terapia alternativa é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade. A biodiversidade é uma fonte importante de substâncias biologicamente ativas e o uso de produtos naturais bioativos surgem como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo que, a maioria dos fármacos em uso clínico, ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química a partir de produtos naturais (BARREIRO; SILVA, 2009).

O Brasil tem um consumo de plantas de flora nativa com propriedades farmacológicas ainda não comprovadas, o que mostra ser um problema sério de saúde pública, em relação a este fato vem se destacando a preocupação da toxicidade das plantas medicinais. No entanto, comparando com os medicamentos usados nos tratamentos convencionais, na maioria das vezes essas plantas são utilizadas para diferentes fins medicinais (VALDIR; ANGELO; MARIA, 2005).

O consumo de medicamentos fitoterápicos decorre basicamente do fato de que representam formas de terapia mais econômicas que aquelas oferecidas pela indústria farmacêutica e a medicina alopática, ganhando destaque em países em desenvolvimento, como o Brasil, que ocupa posição privilegiada devido à riqueza da sua biodiversidade, estimulando pesquisas por novos produtos com maior atividade farmacológica, menor toxicidade e mais biocompatíveis (CASTILHO; MURATA; PARDI, 2007).

A maioria das pessoas que usam produtos naturais acredita que são extremamente seguros, somente pelo fato de serem naturais. Isso explica a importância de estudos multidisciplinares envolvendo extratos e óleos essenciais de

plantas com propriedades químicas e farmacológicas desconhecidas, para que assim amplie o conhecimento, de como agem, quais seus efeitos tóxicos e colaterais (ERNST; WEIHMAYR, 2000).

As plantas devem ser comercializadas, consumidas ou secas, imediatamente após a colheita, objetivando-se minimizar as perdas das substâncias ativas, pois a partir do momento da colheita inicia-se um processo de degradação dessas substâncias devido ao aumento da atividade enzimática. A perda imediata de água ainda tem como benefício a facilidade de armazenamento e transporte, o que contribui para regularização da oferta e comercialização da planta (BARBOSA et al., 2006).

3.2 DADOS BOTÂNICOS

3.2.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae pertence ao grupo das plantas Eucotiledôneas, clado das Magnolideas. Este clado é constituído por quatro ordens, Canallales, Laurales e Piperales, sendo a ordem Magneliales representada pelas famílias Magnoliaceae, Myristicaceae e Annonaceae (SOUZA; LORENZI, 2008).

Classificação taxonômica segundo Cronquist (1981), Reino: Plantae; Divisão: Magnoliophyta; Classe: Magnoliopsida; Subclasse: Magnoliidae; Ordem: Magnoliales; Família: Annonaceae Juss.

Os espécimes de Annonaceae são plantas de hábito arbóreo raramente arbusto, subarbusto ou lianas; folhas alternas, dísticas, simples, sem estípulas, margem inteira. Inflorescência cimosas, às vezes reduzida a uma única flor; flores usualmente grandes e vistosas, em geral bissexuadas, diclamídeas; cálice trímero-tetrâmero, diassépalo; corola formada por 1-2 verticilos de 3 (-4) pétalas. Fruto

apocárpico ou sincárpico, bacáceo ou menos frequentemente folicular (Anaxagorea, Xylopia) (SOUZA; LORENZI, 2008).

Annonaceae é muito rica na biodiversidade de substâncias químicas como: substâncias aromáticas, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, substâncias benzênicas, catequinas, pró-antocianidina, óleos essenciais, terpenos, esteroides, alcaloides, acetogeninas, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, vitaminas, carotenos, saponinas, entre outros (LIMA, 2007; LUNA, 2006; REIS, 2011).

3.2.2 *Annona coriacea* Mart.

Annona coriacea Mart. (Annonaceae), popularmente conhecida como araticum, o nome araticum é derivado do tupi e significa “árvore rija e dura, fruto do céu, saboroso, ou ainda fruto mole”, visto que sua polpa é branca, viscosa e mole quando maduro. Ocorre, normalmente, em áreas secas e arenosas, é encontrada nas regiões Sudeste, Norte e Nordeste do Brasil, especialmente no Ceará, chega a alcançar entre quatro e oito metros de altura, tem crescimento lento e costuma frutificar quando chega aos dois metros (BARREIRA et al., 2002).

Dependendo da região, seu fruto leva o nome de pinha, ata, marolo, condessa, bruto, cabeça-de-negro, entre outros, quando chega a este ponto, costuma cair dos galhos e pode ser coletada do chão. A fruta é coberta por uma casca marrom, bem grossa, e contém inúmeras sementes pretas e lisas presas à polpa. É consumida ao natural, mas a polpa é muito utilizada também para sucos, sorvetes e doces (BARBALHO et al., 2012).

Figura 1 – *Annona coriacea* Mart.



Fonte: google.com/imagens

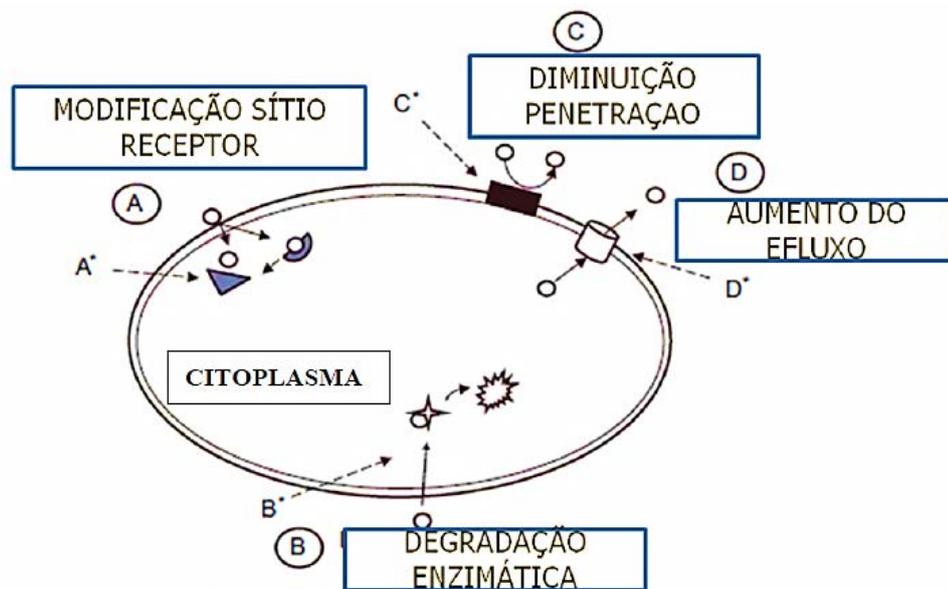
3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas são responsáveis pela produção de compostos químicos importantes para o seu metabolismo. Esses compostos são classificados em metabólitos primários e secundários, os secundários encontram-se presentes em concentrações bem menores nas plantas a maioria deles tais como os alcaloides, terpenoides, antocianinas, esteroides, flavonoides, quinonas e ligninas têm encontrado aplicações comerciais como fármacos, corantes, aromas, inseticidas, etc. (BURT, 2004; COLLIN, 2001; VERPOORTE; MEMELINK, 2002). Conhecidos

pela sua atividade antisséptica, bactericida, fungicida e virucida, propriedades medicamentosas e flavorizantes, eles são usados em embalsamentos, conservação dos alimentos, como antibióticos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatório, antiespasmódico e anestésico local (BAKKALI et al., 2008).

Nos locais específicos da célula bacteriana que são considerados sítios de ação para os componentes primários e secundários dos produtos naturais, estes podem atuar sobre a capacidade de desintegração da membrana citoplasmática, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Podendo em algumas vezes ocorrer mais de um mecanismo em uma mesma célula bacteriana (BURT, 2004).

Figura 2 - Mecanismos de ação dos componentes dos produtos naturais



Fonte: Burt (2004).

3.3.1 Taninos

Atuam como defensores das plantas contra o ataque de herbívoros, tornando seu sabor desagradável, principalmente quando ainda não estão maduras o suficiente. As propriedades antimicrobianas nos taninos estão associadas com a hidrólise de uma ligação éster do ácido gálico, que serve como um mecanismo de

defesa natural contra as infecções microbianas. A propriedade antimicrobiana do ácido tânico também pode ser utilizada no processamento de alimentos para aumentar a sua vida útil (HO et al, 2001).

3.3.2 Flavonoides

Os flavonoides são substâncias redutoras (SIMÕES; SCHENKEL, 2004) derivados das chalconas. Ocorrem nas plantas em uma variedade de formas estruturais, todas contendo 15 átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$) em seu núcleo básico (HARBONE, 1984). Eles derivam compostos químicos com esqueletos do tipo flavonas, flavonóis, antocianidinas e catequinas, entre outros (DEWICK, 2002). Os flavonoides são uma classe muito extensa de produtos naturais distribuída no reino vegetal. Estão presentes em todas as partes das plantas, desde raízes até as flores e frutos.

Devido à capacidade de estabilizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, os flavonoides têm sido considerados potentes antioxidantes naturais, isso se deve aos grupos hidroxilas ligados à estrutura do anel aromático (ARAÚJO, 2004). Segundo Fehlberg et al. (2009) os flavonoides como O-glicosídeos de quercetina apresentam atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

3.3.3 Terpenos

São hidrocarbonetos que ocorrem em plantas e animais como múltiplos de uma unidade estrutural básica, o isopreno, formados pela condensação de unidades de difosfato de dimetilalila. Eles são classificados como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos e tetraterpenos que possuem respectivamente 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 átomos de carbonos em sua estrutura (DEWICK, 2002).

3.3.4 Alcaloides

Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas, mas também, em menor quantidade em micro-organismos e animais. Eles são classificados de acordo com o aminoácido precursor, que podem ser ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, histidina, ácido antranílico, triptofano e reações de aminação (DEWICK, 2002).

Rios, Recio e Vilar (1988) fizeram um levantamento das atividades biológicas observadas em alcaloides aporfínicos e pró-aporfínicos, entre os alcaloides já isolados no gênero *Annona*, a anonáina e a estefarina apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, a glaziovina apresentou atividades sobre *Escherichia coli*.

3.4 MICROBIOLOGIA E INFECÇÃO

Os agentes biológicos infecciosos podem entrar em contato com o organismo humano por diversas formas. Uma delas envolve a presença de artigos contaminados (fômites). A constituição destes inclui artefatos que tenham recebido a carga infectante e possam disseminá-la para um novo hospedeiro (BALTHAZAR; SANTOS, 1997).

As bactérias que mais provocam mortes no mundo são *Staphylococcus aureus* (Rosenbach) meticilina-resistente (MRSA), *Staphylococcus aureus* (Rosenbach) vancomicina-resistente (VRSA), *Escherichia coli* (T. Escherich), *Klebsiella pneumoniae* (Trevisan) e *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter), visto que são resistentes a múltiplas drogas. Os processos infecciosos causados por esses microrganismos geralmente estão associados com alta letalidade e altos custos de tratamento (ROCHA et al., 2011)

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, imóveis, não formadores de esporos, que dão origem a células arredondadas com cerca de um micron de diâmetro. Quando observados em microscopia óptica, aparecem geralmente como células únicas, pares ou agrupadas, com aparência de cacho de uvas. A maioria das espécies são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, com multiplicação rápida na maioria dos meios de cultura a 37 °C, mas indicam melhor formação de pigmento, que lhes é característico, em temperatura entre 20 e 25 °C. As colônias em meio sólido têm formas arredondadas e aparências rugosas elevadas e brilhantes, com coloração amarelo-ouro (BROOKS et al., 2009; LEVISON, 2010).

A maioria das espécies de *Staphylococcus* é benigna ou tem simbiose do tipo comensalismo com o hospedeiro (LENZI; VANNIER-SANTOS, 2005). Outras causam supurações, abscessos, e diversas infecções piogênicas e até sepse fatal. Espécies do gênero *Staphylococcus* são capazes de provocar hemólise, coagulação do plasma e produzir enzimas e toxinas extracelulares. Uma toxina entérica termoestável, produzida por *Staphylococcus aureus* (Rosenbach) é responsável pela contaminação alimentar mais comumente reportada. É comum encontrá-lo na região nasofaríngea; de adultos saudáveis portadores persistentes (aproximadamente 25%), e com maior incidência entre hospitalizados. Sua dispersão é comum, sendo responsável por diversas infecções hospitalares (COURA, 2008; VERONESI; FOCACCIA, 2009).

Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) é um patógeno oportunista esta espécie é um dos patógenos mais isolados em casos de infecções hospitalares, sendo uma bactéria de difícil controle devido a sua fácil disseminação pelo ambiente (KONEMAN et al., 2001), conseguindo se reproduzir em água e outros ambientes com poucos nutrientes (SANT'ANA et al., 2003) e possui a capacidade de adquirir resistência a múltiplos antimicrobianos (KONEMAN et al., 2001). O uso intensivo de antibióticos contribuiu para o aumento da seleção de bactérias resistentes, inclusive em ambientes aquáticos. Desta forma, estas bactérias podem representar um reservatório de resistência, bem como um meio para a propagação e evolução de genes de resistência (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008).

Das cinco espécies do gênero *Escherichia*, *Escherichia coli* (T. Escherich) é a mais frequentemente isolada em amostras clínicas humanas. De grande interesse científico, deve-se aos estudos da *E. coli* K12 parte dos conhecimentos sobre metabolismo intermediário, recombinação genética, replicação do DNA, transcrição do RNA, síntese e exportação de proteínas e da patogenicidade das bactérias. Representa um importante agente patogênico de infecções tanto adquiridas na comunidade quanto hospitalares (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2005; EISENSTEIN; ZALEZNIK, 2000).

E. coli faz parte da microbiota intestinal de indivíduos sadios, causando infecções extra-intestinais e intestinais (cepas diarreicogênicas não constituintes da microbiota), tanto em pessoas saudáveis como em imunocomprometidas (PROCOP; COCKRILL III, 2004). Há pelo menos seis variedades de *E. coli* diarreicogênicas denominadas:

- ETEC - *E. coli* enterotoxigênica;
- EHEC – *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7);
- EIEC – *E. coli* enteroinvasiva; *E. coli* enteroaderente com três subtipos distintos:
 - EPEC – *E. coli* enteropatogênica;
 - EaggEC – *E. coli* enteroagregativa; e
 - DAEC – *E. coli* difusamente aderente.

3.5 AMINOGLICOSÍDEOS

Os aminoglicosídeos compõem uma classe de moléculas que apresentam um núcleo aminociclitol que pode ser estreptidina ou a 2–desóxiestreptamina. O primeiro aminoglicosídeo, estreptomicina, o nome aminoglicosídeo se deve ao fato da molécula ser constituída por dois ou mais amino-açúcares unidos por ligação

glicosídica à hexose ou aminociclitol, que habitualmente está em posição central (JANA; DEB, 2006).

A atividade bactericida destes antibióticos se deve a sua capacidade de inibir a síntese proteica por se ligarem à subunidade ribossomal 30S, incapacitando o ribossomo bacteriano para a tradução, o que resulta em morte celular (KOTRA; HADDAD; MOBASHERY, 2000), sendo ativos prioritariamente contra bacilos Gram – negativos e cocos Gram – positivos aeróbicos (MINGEOT-LECLERCQ; GLUPCZYNSKI; TULKENS, 1999). Além disso, os aminoglicosídeos podem causar danos à membrana por alterar sua composição e permeabilidade, alterar as concentrações iônicas da célula e interferir nos processos de replicação e transcrição (FOURMY et al., 1996).

As vantagens dessa classe de antibiótico são: possuir um amplo espectro antimicrobiano, rápida ação bactericida e capacidade de agir sinergicamente com outras drogas o que pode ocasionar uma superação da resistência bacteriana e ser bastante útil no tratamento de graves infecções hospitalares. Além de possuir um custo relativamente baixo, estabilidade química e não provocar reações alérgicas. Em relação às desvantagens, esse antibiótico é inativo contra bactérias anaeróbias, não é absorvido oralmente (devido à natureza catiônica), tendo que ser administrado por via parenteral, intramuscular ou intravenosa, bem como possui limitações terapêuticas devido a sua toxicidade (nos sistemas coclear e/ou vestibular, e nos rins) (JANA; DEB, 2006).

3.6 RESISTÊNCIA BACTERIANA

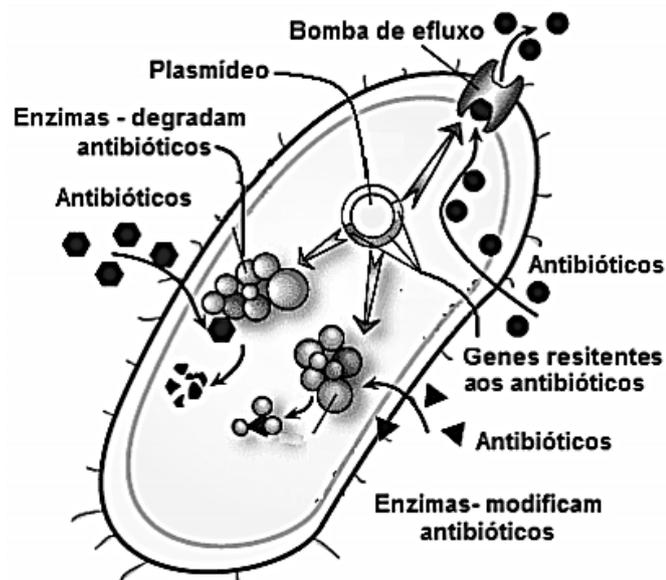
O uso indiscriminado e abusivo de medicamentos no controle de microrganismos nos últimos anos vem resultando em uma questão de saúde pública, tendo em vista a evolução da resistência de bactérias às drogas e conseqüentemente a perda da eficácia dos antibacterianos (DIAS; MONTEIRO, 2010). Neste contexto, o uso incorreto dos antimicrobianos, uma das principais

causas do aparecimento da resistência, pode estar associado a fatores como doses subterapêuticas, inefetividade da droga selecionada.

Na tentativa de um controle mais eficaz de micro-organismos, algumas atitudes estão sendo tomadas, como a redução do uso de antibióticos. Arelada a isso, pesquisadores tem testado produtos naturais isolados e em associação com os medicamentos originais (SOUSA et al., 2010), almejando uma potencialização da ação dos mesmos e minimização dos efeitos indesejáveis.

Esse conhecimento do potencial antimicrobiano de produtos naturais faz-se necessário para um melhor entendimento das suas propriedades, comprovação de sua eficácia e desenvolvimento de drogas mais complexas, de difícil adaptação (DAFERERA; ZIOGASB; POLISSIOU, 2003).

Figura 3 - Mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos



Fonte: Todar (2011).

3.7 RESISTÊNCIA À AMINOGLICOSÍDEOS

O uso excessivo e inadequado de algumas drogas para o tratamento de doenças patogênicas em humanos tem ocasionado o aumento da incidência de resistência microbiana, principalmente quando é utilizada apenas uma classe de antimicrobiano durante um longo período (FLUIT; SCHMITZ, 1999; ZEMBOWER et al., 1998).

A pressão seletiva pelo uso de aminoglicosídeos pode provocar mutações nos genes que por sua vez alteram a expressão das enzimas, resultando na capacidade de modificar/inativar os aminoglicosídeos. As bactérias podem adquirir o DNA exógeno por meio de mecanismos de transdução, transformação e conjugação, ocorrendo a transferência do gene em plasmídeos ou transposons (AHMED; SHIMAMOTO, 2004). Existem três mecanismos gerais de resistência aos aminoglicosídeos: (1) redução da concentração intracelular do antibiótico nas células bacterianas, geralmente por um bombeamento da droga para fora da célula por uma bomba de efluxo ou pela alteração da permeabilidade; (2) alteração do alvo molecular do antibiótico, geralmente resultante de uma mutação espontânea no gene que codifica o alvo ou substituição do gene alvo por um gene exógeno; (3) inativação enzimática do aminoglicosídeo. Existem outros mecanismos de resistência que não se enquadram nesses três tipos, além disso, pode ocorrer mais de um mecanismo (na mesma estirpe e ao mesmo tempo) no caso de algumas classes de drogas (AZUCENA; MOBASHERY, 2001; JANA; DEB, 2006; WALSH, 2000).

3.8 INTOXICAÇÃO POR METAIS PESADOS

Um dos problemas mais sérios que afetam o meio ambiente é a poluição química de natureza orgânica ou inorgânica, decorrente dos despejos residenciais e

industriais. A poluição aquática, uma das mais sérias, provoca mudanças nas características físicas, químicas e biológicas das águas, as quais interferem na sua qualidade, impossibilitando o seu uso para o consumo humano (FELLENBERG, 1980).

A atividade de uma substância tóxica depende sempre de sua concentração no organismo, independente do mecanismo de intoxicação. Embora alguns metais sejam biogénicos, isto é, sua presença é essencial para permitir o funcionamento normal de algumas rotas metabólicas, a maioria dos metais pesados, se ingeridos em concentrações demasiadas, são venenos acumulativos para o organismo (JORDÃO et al., 1999).

A intoxicação por metais pesados provoca um conjunto específico de sintomas e um quadro clínico próprio. Os dois principais mecanismos de ação dos metais pesados, no ser vivo, são formação de complexos com os grupos funcionais das enzimas, que prejudica o perfeito funcionamento do organismo, e a combinação com as membranas celulares, que perturba ou em alguns casos mais drásticos, impede completamente o transporte de substâncias essenciais, tais como os íons Na^+ e K^+ , e de substâncias orgânicas (JORDÃO et al., 1999). Devido à alta permeabilidade da placenta, o feto também sofre todos os males da intoxicação por metais pesados (FELLENBERG, 1980).

3.8.1 Cloreto de mercúrio

Mercúrio (Hg) é conhecido como um perigoso poluente ambiental e a toxicidade dos compostos de mercúrio se devem, principalmente, à afinidade por grupos tiólicos de biomoléculas endógenas (CLARKSON, 1997).

O mercúrio (Hg) é um metal pesado de aspecto inodoro e prateado, pertencente à família química dos metais do grupo IIb da tabela periódica, juntamente com cádmio e zinco. Normalmente é encontrado nas seguintes formas: mercúrio metálico (Hg^0), mercúrio (I) e mercúrio (II), nas quais os átomos perdem um ou dois elétrons, respectivamente, formando o cátion mercurioso (Hg_2^{+2}) e o cátion

mercúrico (Hg^{+2}). Estes dois últimos formam diversos compostos orgânicos e inorgânicos (NASCIMENTO; CHASIN, 2001).

Por possuir uma característica lipossolúvel o mercúrio é altamente difusível, passando pelas membranas celulares, barreira hemato-encefálica e placentária chegando aos órgãos alvo. Quando na corrente sanguínea, o mercúrio sofre rápida oxidação nas hemácias e nos tecidos por meio da catalase e peroxidase, uma vez oxidado une-se fortemente ao grupamento $-\text{SH}$ e como consequência, inativa enzimas por sua toxicidade, o que pode levar a lesão tecidual além de interferir em vários processos metabólicos (GILMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2007).

O mercúrio inorgânico pode ser encontrado em diferentes estados quando combinados com outros elementos químicos dentre eles se destacam o cloreto de mercúrio, também designado de cloreto mercúrico ou sublimado corrosivo, é um sal branco que apresenta a fórmula HgCl_2 , caracterizando um composto muito tóxico (AZEVEDO, 2002). Tem baixa lipofilidade e com isso pouca capacidade de ultrapassar as membranas celulares (CLARKSON; VYAS; BALLATORI, 2007).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização o perfil químico e avaliação do potencial da atividade antimicrobiana e citoprotetora frente cloreto de mercúrio do extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona coriacea* Mart. (Araticum).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato hidroalcoólico da espécie *Annona coriacea* Mart. e identificar o perfil químico;
- Quantificar os compostos fenólicos e flavonoides por análise em cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE;
- Avaliar a eficácia do extrato referente a diversas concentrações a qual irá determinar se existe a inibição do crescimento de espécies de bactérias com perfil padrão e resistente;
- Verificar a eficácia do extrato na modulação da resistência bacteriana à aminoglicosídeos;
- Avaliar a atividade citoprotetora do extrato frente ao cloreto de mercúrio sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com perfil padrão.

5 METODOLOGIA

5.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Estácio Juazeiro do Norte - FMJ/CE, no Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia da Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato-CE, e na Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

5.2 MATERIAL PERMANENTE E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Autoclave de esterilização a vapor quente;
- Balança analítica de precisão;
- Banho Maria;
- Condensador rotativo a vácuo;
- Estufa de secagem e esterilização;
- Estufa microbiológica de cultura;
- Liofilizador;
- Materiais de biossegurança;
- Pipetas automáticas;
- Placas de microdiluição estéreis;
- Shimadzu proeminence *HPLC system*;
- Tubos Eppendorfs;
- Tubos tipo Falcon;
- Vidrarias gerais.

5.3 DROGAS, REAGENTES E SOLUÇÕES

As substâncias utilizadas nos ensaios encontram-se relacionadas a seguir:

- Acetonitrila (Sigma, EUA);
- Ácido fórmico (Sigma, EUA);
- Amicacina (Sigma, EUA);
- Brain Heart Infusion Broth (BHI; Kasvi, Índia);
- Cloreto de mercúrio (Synth, Brasil);
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Merck, Alemanha);
- Etanol (Dinâmica, Brasil);
- Gentamicina (Sigma, EUA);
- Resazurina (Sigma, EUA).

5.4 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA

O material vegetal foi coletado na cidade do Crato em área de cerrado na Chapada do Araripe, Estado do Ceará, Brasil, e comparado com uma amostra representativa da espécie *Annona coriacea* Mart. da família Annonaceae, existente no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) do Departamento de Ciências Biológicas (URCA), sob registro nº 12.022.

Figura 4 - Espécie de *Annona coriacea* Mart., em (a) pode ser observado um espécime, em (b) o fruto



(a)



(b)

Fonte: Autor.

5.5 PREPARAÇÃO E OBTENÇÃO DO EXTRATO

As folhas foram trituradas e imersas em Etanol + água (50%: 50%) por 72h em temperatura ambiente. Após este período, o extrato foi filtrado e o líquido destilado em Rota-evaporador, para evaporação do etanol. Uma vez destilado, o extrato foi liofilizado em aparelho marca Liotop, modelo L101 e, em seguida o extrato foi acondicionado em vidro âmbar, identificado por EHAC (extrato hidroalcoólico de *Annona coriacea*) e armazenado. O rendimento do extrato foi de 3,53%.

Figura 5 – Folhas de *Annona coriacea* Mart. usadas para obtenção do extrato e identificação



Fonte: Autor.

5.6 IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE

As análises cromatográficas foram realizadas na Universidade Federal de Santa Maria (Rio Grande do Sul) com equipamento *Shimadzu proeminence HPLC system* (SIL-20A). As análises cromatográficas de fase inversa sob as condições de gradiente utilizando coluna C18 (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de 5 µm de diâmetro; A fase móvel foi água contendo 2% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), e o gradiente de composição foi a seguinte: 17% de (B) até 10 min. e alteradas para se obter 20%, 30%, 50%, 60%, 70% , 20% e 10% de (B) a 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min., respectivamente, seguindo o método descrito por Kamdem et al. (2013) com modificações.

O extrato hidroalcoólico do Araticum (*Annona coriacea*) foi analisado em uma concentração de 15 mg/ml.

Foi investigada a presença de compostos fenólicos e flavonoides como o ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido cumarínico, catequina, epicatequina, quercetina, quercitrina, rutina e luteolina. A identificação destes compostos foi efetuada por comparação de seu tempo de retenção e espectro de absorção no UV com os dos padrões comerciais.

A taxa de fluxo foi de 0,6 ml/min., volume de injeção de 50 µl e o comprimento de onda foi de 271 nm para o ácido gálico, 276 nm para o ácido cumarínico, 280 nm para catequina e epicatequina, 327 nm para ácidos cafeico e clorogênicos, e 365 nm para a quercetina, quercitrina, rutina e luteolina. As amostras e fase móvel foram filtradas através de filtro de 0,45 µm de membrana (Millipore) e, em seguida, se desgaseificou.

As soluções de referências padrões foram preparadas na fase móvel de CLAE numa concentrações de 0,025 - 0,300 mg/ml para catequina, epicatequina, quercetina, quercitrina, rutina e luteolina; e 0,030-0,350 mg/ml para cafeico, cumarínico, clorogênico e ácido gálico.

Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata. O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foi calculado com base no desvio padrão e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes, tal como definido por Kamdem et al. (2013). LOD e LOQ foram calculados como $3,3$ e $10 \sigma/S$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração.

5.7 MATERIAL BACTERIANO

Foram utilizadas três linhagens padrões de cepas microbianas provenientes da “*American Type Culture Collection*” *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853; *Escherichia coli* ATCC 9027. Para avaliar a atividade modulatória do produto natural foram usados os seguintes

isolados bacterianos multirresistentes: *Staphylococcus aureus* SA 358; *Pseudomonas aeruginosa* PA 03; *Escherichia coli* EC 06. As cepas foram mantidas com *Heart Infusion Ágar* (HIA, *Difco Laboratorises Ltda.*). Antes do ensaio, as células foram cultivadas por 24h em Infusão Cérebro Coração (BHI, *Difco Laboratories Ltda.*).

Quadro 1 - Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> SA 358	Ferida Cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA 03	Secreção nasal	Cf, Cfp, Cfd, Caz, Lv, Im Mero, Pip
<i>Escherichia coli</i> EC 06	Urina	Cf, Ca, Clx, Amp, Nor, Lm, Cip, Lv, Of, Ampisul

Amp: Ampicilina; *Ampisul*: Ampicilina-sulbactam; *Ami*: Amicacina; *Amox*: Amoxilina; *Ca*: Cefadroxil; *Cfc*: Cefaclor; *Cf*: Cefalotina; *Clx*: Cefalexina; *Caz*: Ceftazidima; *Cfp*: Cefepimo; *Cfd*: Ceftaridima; *Cip*: Ciprofloxacina; *Im*: Imipenem; *Can*: Canamicina; *Lm*: Lomefloxacina; *Lv*: Levofloxacina; *Tob*: Tobramicina; *Of*: Ofloxacina; *Oxa*: Oxacilina; *Gen*: Gentamicina; *Mero*: Meropenem; *Nor*: Normofloxacina; *Neo*: Neomicina; *Para*: Paramomicina; *Pip*: Piperacilina; *But*: Butirosina; *Sis*: Sisomicina; *Net*: Netilmicina.

5.8 PREPARO DA SOLUÇÃO INICIAL E DAS SOLUÇÕES DE TESTES

No preparo da solução inicial, o extrato foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo observadas as seguintes proporções: 10 mg de extrato solubilizados em 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), para obter uma concentração inicial de 10 mg/ml. Em seguida, esta solução foi diluída em água destilada atingindo concentração de extrato de 1.024 µg/ml (pH 6,76; 2.138 mOsm/kg H₂O) e reduzindo

a concentração de DMSO abaixo de 10%, durante o teste microdiluição, obtendo-se as concentrações de extrato variando de 512 a 8 µg/ml (COUTINHO et al., 2008a).

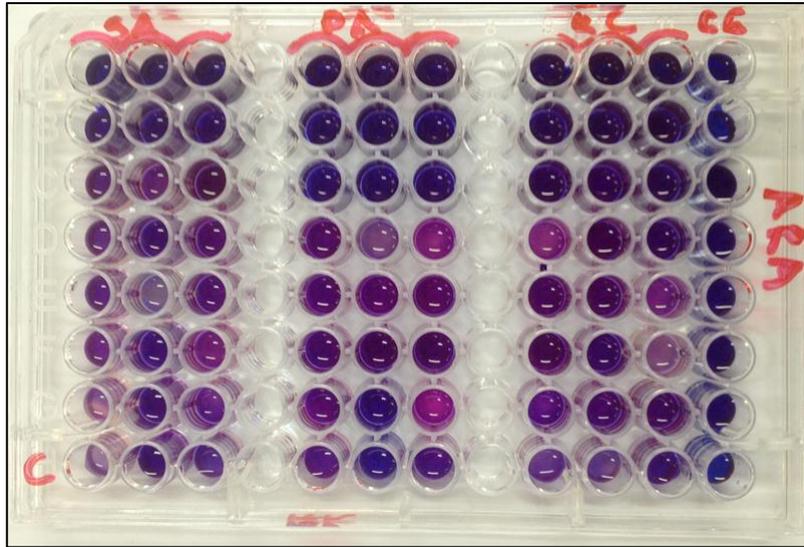
Em um ensaio piloto utilizando apenas concentrações de DMSO a 5% foi realizado por Aquino et al. (2016), mas nenhuma atividade antibacteriana ou moduladora foi verificada, indicando não apresentar toxicidade.

5.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E MODULAÇÃO DOS AMINOGLICOSÍDEOS

De acordo com a CLSI (2012) as concentrações inibitórias mínimas (CIM) do extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona coriacea* Mart. (EHAC), foram determinados pelo ensaio de microdiluição usando suspensões 10^5 UFC/ml de cepas padrões, e o EHAC na concentração inicial de 1.024 µg/ml.

Para avaliação da atividade moduladora dos antibióticos aminoglicosídeos (gentamicina e ampicacina) as soluções foram preparadas com a adição de água destilada estéril de forma a obter uma concentração correspondendo a 1.024 µg/ml. Um volume de 100 µl de cada solução dos antibióticos foi diluído seriadamente nos poços contendo o meio de cultura *Brain Heart Infusion Broth* – BHI a 10% (pH 6,85; 404 mOsm/kg H₂O) e a suspensão com o inóculo da cepa multirresistente, com o EHAC na concentração subinibitória (CIM/8) (COUTINHO et al., 2008b). As concentrações finais dos antibióticos no meio de cultura foram de 512 a 0,5 µg/ml. Controles negativos com o meio de cultura, controles positivos (meio + inóculo) e controles de inibição utilizando solução em concentração de 512 a 0,5 µg/ml foram incluídos nos ensaios. As placas foram incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C e a atividade foram evidenciadas pelo uso de resazurina sódica.

Figura 6 - Placa de microdiluição indicando a CIM após introdução de resazurina



Fonte: Autor.

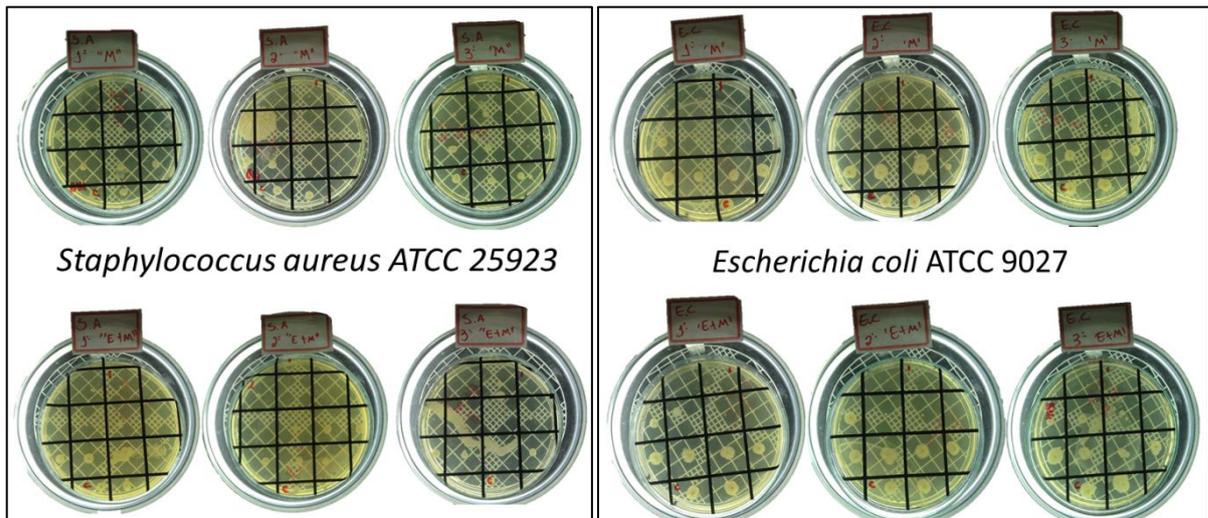
5.10 TESTE DE ATIVIDADE CITOPROTETORA FRENTE AO CLORETO DE MERCÚRIO

Para a avaliação do efeito protetor do EHAC ao cloreto de mercúrio (HgCl_2), foi realizada uma modulação utilizando concentrações subinibitórias do EHAC, suspensões de 10^5 UFC/ml de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 9027 em meio BHI e uma de concentração do Cloreto de Mercúrio (271,52 g/mol) variando de 10 mM a 0,0048 mM.

As placas de microdiluição foram incubadas por 24 h a 37 °C. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, utilizando placas de Petri com BHI-agar para transferência das soluções incubadas por 24 h a 37 °C em placas de microdiluição. O EHAC foi avaliado em relação ao experimento controle com apenas o mercúrio. As placas de Petri foram incubadas numa estufa a

aproximadamente 37 °C e a leitura realizada após 24-72 h da incubação (LIMA et al., 2014).

Figura 7 - Visualização do crescimento em placas de Petri após 72 h das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 9027



Fonte: Autor.

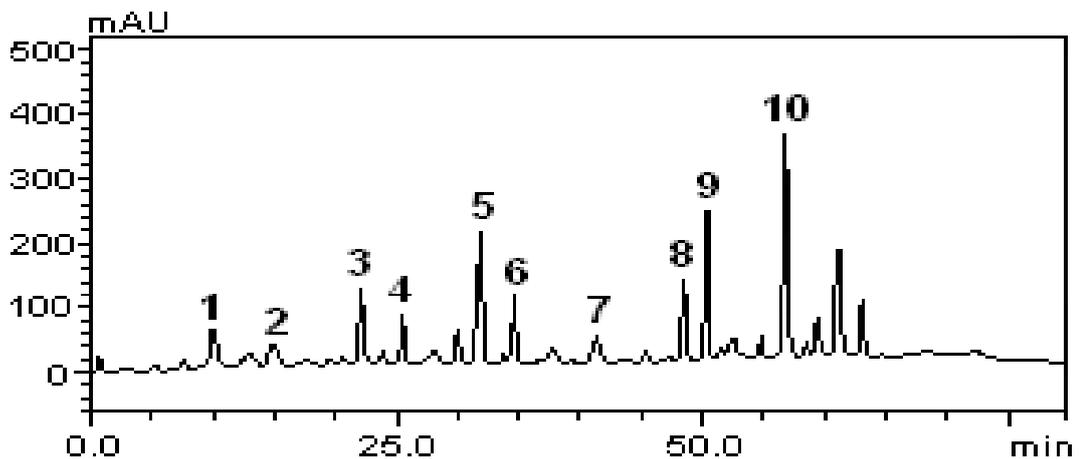
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os gráficos 2, 3 e 4 foram produzidos pelo software *Graphd Pad Prism 5*. A análise estatística foi feita empregando a *two-way ANOVA* seguida do teste de Bonferroni, com significância estatística quando $p < 0,05$ (MATIAS et al., 2013).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise em cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE o extrato hidroalcoólico de *Annona coriacea* Mart. (ARATICUM) revelou a presença do ácido gálico (tR = 9,97 min.; pico 1), catequina (tR = 15,03 min.; pico 2), o ácido clorogênico (tR = 21,54 min.; pico 3), ácido cafeico (tR = 24,98 min.; pico 4), ácido cumarínico (tR = 31,49 min.; pico 5), epicatequina (tR = 34,67 min.; pico 6), a rutina (tR = 42,15 min.; pico 7), quercitrina (tR = 49,16 min.; pico 8), a quercetina (tR = 50,02 min.; pico 9), luteolina (tR = 56,73 min.;. pico 10) e, após tR 60 min., revela a presença de dois picos com elevada significância que não foram confirmados na comparação do seu tempo de retenção com os padrões de referência (Gráfico 1 e Tab. 1).

Gráfico 1 - Perfil em cromatografia líquida de alto desempenho do extrato hidroalcoólico de araticum (*Annona coriacea* Mart.)



Pico 1: ácido gálico; Pico 2: catequina; Pico 3: ácido clorogênico; Pico 4: ácido cafeico; Pico 5: ácido cumarínico; Pico 6: epicatequina; Pico 7: rutina; Pico 8: quercitrina; Pico 9: quercetina; e Pico 10: luteolina.

O gênero *Annona* se destaca pelas diferentes classes de metabólitos secundários encontradas em espécies representativas do gênero, onde se destacam

os alcaloides aporfínicos, flavonoides glicosilados ou não e acetogeninas de anonáceas (ARAYA, 2004). Em relação aos flavonoides no gênero *Annona* foram identificados flavonas (luteonina) e flavonóis (canferol, quercetina, ramnetina, rutina e isoramnetina) descritos para as espécies *A. crassiflora*, *A. tomentosa*, *A. monticola*, *A. warmingiana*, *A. coriacea* (RINALDI, 2007). Desta forma foi encontrado na identificação química do extrato hidroalcoólico da *Annona coriacea* Mart. (Tab. 1) os seguintes constituintes químicos:

Tabela 1 - Constituintes químicos do extrato hidroalcoólico do araticum (*Annona coriacea* Mart.)

Compostos	<i>Annona coriacea</i> Mart.		LOD	LOQ
	mg/g	%	µg/ml	µg/ml
Ácido gálico	2,97 ± 0,02	0,29	0,009	0,030
Catequina	2,64 ± 0,01	0,26	0,014	0,047
Ácido clorogênico	5,85 ± 0,01	0,58	0,021	0,070
Ácido cafeico	3,09 ± 0,03	0,30	0,025	0,083
Ácido cumarínico	10,72 ± 0,02	1,07	0,017	0,056
Epicatequina	5,81 ± 0,02	0,58	0,008	0,028
Rutina	2,59 ± 0,01	0,25	0,029	0,096
Quercitrina	6,11 ± 0,03	0,61	0,007	0,024
Quercetina	11,93 ± 0,01	1,19	0,011	0,037
Luteolina	18,47 ± 0,03	1,84	0,031	0,102

Média ± desvio padrão (DP) de três determinações.

Médias seguidas por letras diferem pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

Santos e Salatino (2000) isolaram e identificaram um total de 76 flavonas e flavonóis, a partir das folhas de espécies de Annonaceae, sendo a maior parte de glicosídeos, todos os fenóis encontrados foram glicosídeos de flavonas (apigenina, hispidulina e luteolina) ou flavonóis (canferol, ramnocitrina, 6-hidroxiramnocitrina, quercetina, isoramnetina e ramnetina), com predominância deste último, sobressaindo-se a quercetina.

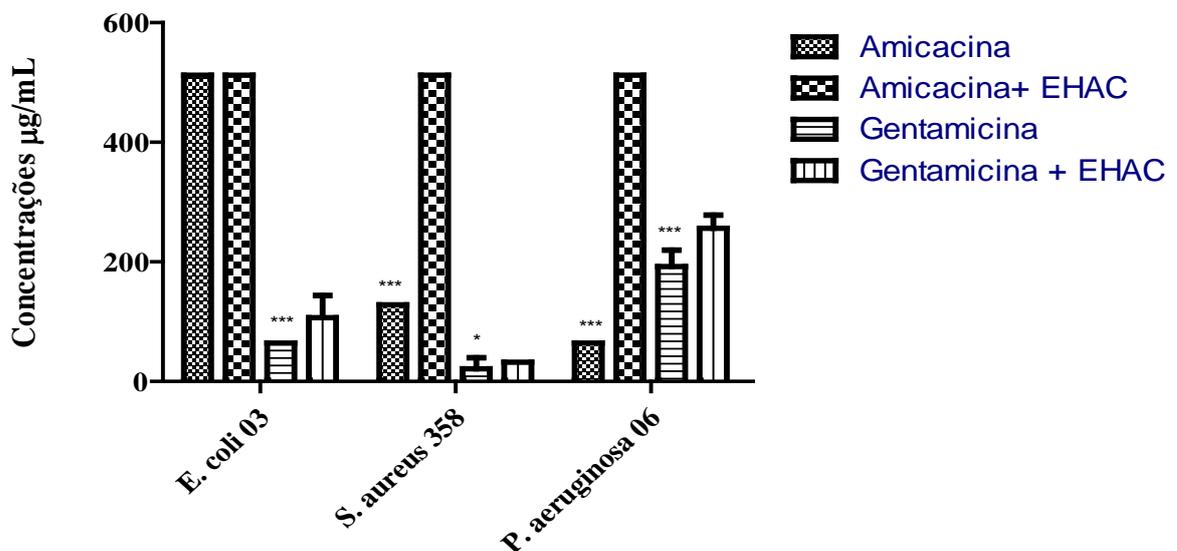
Estudos preliminares têm demonstrado que vários flavonoides possuem relevantes ações biológicas que previnem acidentes vasculares, sendo utilizados pela indústria farmacêutica na preparação de agentes vasodilatadores como a diosmina e a rutina. Outros flavonoides como a quercetina e luteolina são

abundantes na natureza e produzem significativa resposta anti-inflamatória, antinoceptiva (CALIXTO et al., 2000), além de atividade antimicrobiana (SARTORI et al., 2003; SCHELEMPER et al., 1998).

O composto luteolina em estudos realizados apresentou atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* multirresistente MRSA (XU; LEE, 2001) e ação inibitória no crescimento e na enzima arilamine N-acetiltransferase de cepas de *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera gástrica (CHUNG et al., 2001). Este composto apresenta forte efeito antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* e periodontopatia por *Porphyromonas gingivalis* (YAMAMOTTO; OGAWA, 2002).

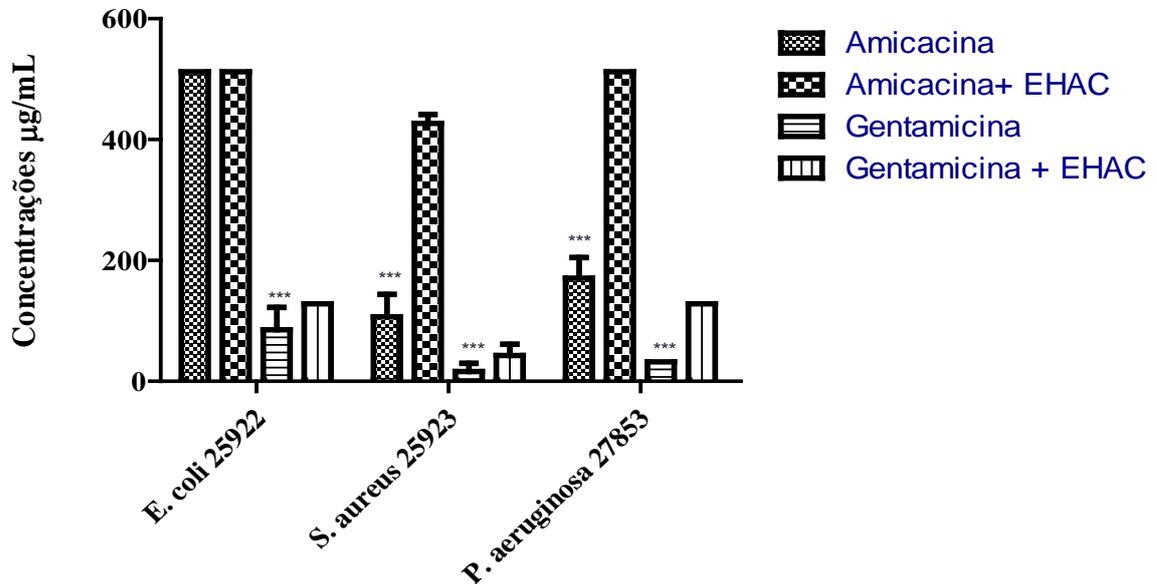
Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana para a determinação da CIM do EHAC para todas as espécies multirresistentes e padrões foram $\geq 512 \mu\text{g/ml}$. Os gráficos a seguir mostram as concentrações utilizadas nos testes para avaliação da atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos utilizando amicacina e gentamicina combinado com o EHAC, determinado após o teste de determinação da CIM por microdiluição frente às linhagens multirresistentes e padrões de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Gráfico 2 e 3).

Gráfico 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos aminoglicosídeos na presença e na ausência do extrato de *Annona coriacea* Mart. em uma concentração CIM/8, frente a cepas multirresistente de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*



* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$; EHAC: extrato hidroalcoólico de *Annona coriacea* Mart.

Gráfico 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos aminoglicosídeos na presença e na ausência do extrato de *Annona coriacea* Mart. em uma concentração CIM/8, frente a cepas padrões de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

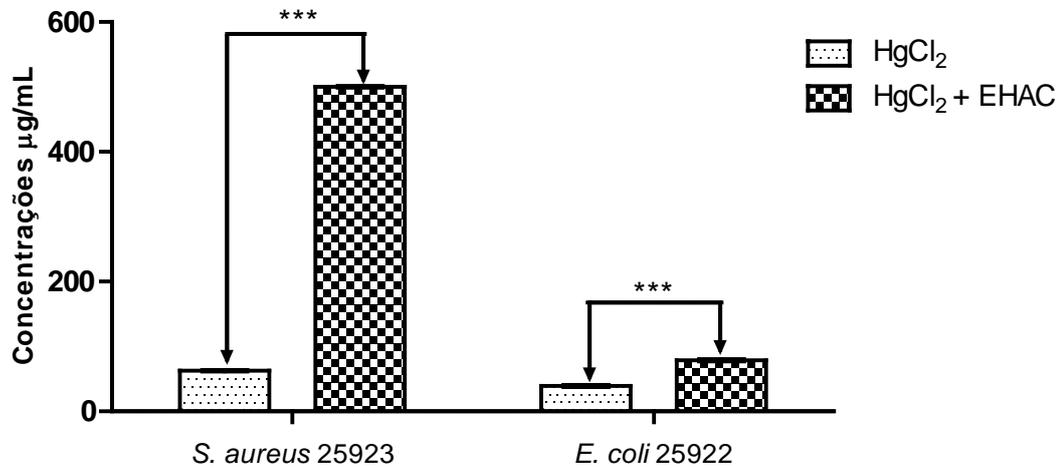


*** $p < 0,0001$; EHAC: extrato hidroalcoólico de *Annona coriacea* Mart.

Os flavonoides possuem atividade antimicrobiana *in vitro* contra diversas bactérias. Esta atividade é devida a sua habilidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular, ou ainda o caráter lipofílico dos flavonoides ser responsável pela ruptura da membrana celular dos microrganismos (COWAN, 1999; TSUCHIYA et al., 1996). Entretanto, no resultado obtido da atividade moduladora do EHAC sobre as cepas multirresistente e padrões não apresentou atividade antimicrobiana apenas antagonismo, por ter essa característica foi realizado então o teste de atividade citoprotetora frente ao cloreto de mercúrio. Pois os compostos flavonoides podem atuar como quelantes de metais e também com atividades antioxidantes reagindo com radicais livres (HARBONE; WILLIAMS, 2000).

De acordo com os resultados obtidos (Gráfico 4) o EHAC apresenta atividade citoprotetora frente ao cloreto de mercúrio (HgCl_2) nas cepas *Staphylococcus aureus* ($p < 0,0001$) e *Escherichia coli* ($p < 0,05$). Os dados obtidos indicam o produto como uma fonte promissora no combate a metais pesados, apresentando-se como protetora de seres procariontes.

Gráfico 4 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) do cloreto de mercúrio na presença e na ausência do extrato de *Annona coriacea* Mart. em uma concentração CIM/8, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*



*** $p < 0,0001$; EHAC: extrato hidroalcoólico de *Annona coriacea* Mart.; HgCl₂: Cloreto de mercúrio;

O mercúrio tem grande efeito citotóxico sobre vários tipos de células, principalmente aquelas do sistema imune, sendo capaz de induzir uma imunossupressão em muitas espécies de animais (TCHOUNWOU; PATLOLLA; CENTENO, 2003).

Em casos de intoxicações com mercúrio o tratamento consiste na remoção da fonte de exposição e utilização de agentes quelantes, tais como dimercaprol, ácido etilenodiaminotetra acético, D-penicilamina, ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico e 2,3-dimercapto-1-propanosulfonato de sódio (RISHER; AMLER, 2005). No entanto, existem relatos de alguns desses agentes podem promover redistribuição do metal no organismo aumentando a sua concentração no sistema nervoso (EMANUELLI et al., 1996). O tratamento com quelantes pode eliminar minerais essenciais e provocar outros efeitos adversos (RISHER; AMLER, 2005). Considerando que muitos dos efeitos tóxicos induzidos pelo mercúrio estão relacionados a danos oxidativos e complexação com moléculas endógenas, têm sido sugerido que antioxidantes poderiam auxiliar no tratamento de intoxicações com mercúrio (PATRICK, 2002).

A presença dos flavonoides pode justificar o possível efeito citoprotetor observado nos testes, já que na análise em cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE) demonstrou a presença de luteolina (1,84%) e quercetina (1,19%) em elevadas concentrações ($p < 0,05$).

A propriedade citoprotetora frente ao cloreto de mercúrio é direcionada sobre a quelação que poderá manter o metal em solução, tornando-o indisponível pela precipitação ou transporte do complexo formado (STEVENSON, 1994).

As combinações extremamente rápidas de metais com radicais OH e O₂ pela reação de *Fenton* ou *Haber-Weiss*, estimula a presença de radicais hidroxil (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PIETTA, 2000). De acordo com Halliwell e Gutteridge (1986) o hidroxil pode inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) e pontes dissulfeto (-SS), também pode iniciar a lipoperoxidação provocando a desrupção da matriz celular.

A quercetina pode inibir o processo de formação de radicais livres pela interação com íons superóxidos, na formação de radicais hidroxil por quelar íons de metais e inibindo a peroxidação lipídica por reagir com radicais peroxi de lipídeos, protegendo a célula contra a ação citotóxica dos metais (AFANASEV et al., 1989; KAHRAMAN et al., 2003).

7 CONCLUSÃO

No extrato hidroalcoólico da *Annona coriacea* Mart. (EHAC) foi detectada a presença de classes de metabólitos secundários por análise em cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE correspondentes a compostos fenólicos e flavonoides.

Foi possível quantificar os compostos fenólicos e flavonoides do EHAC, tendo respectivamente na sua composição elevadas concentrações de luteolina, quercetina e ácido cumarínico.

O EHAC não apresenta efeito de CIM sobre as cepas bacterianas testadas com perfil multirresistente e padrão, e também não apresenta eficácia modulatória demonstrando antagonismo frente às cepas bacterianas avaliadas em função de aminoglicosídeos.

O EHAC apresenta citoproteção contra o cloreto de mercúrio (HgCl_2) com possível propriedade quelante em modelo in vitro testado com cepas bacteriana com perfil padrão de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

REFERÊNCIAS

AFANASEV, I. B.; DOROZHKO, A. I.; BRODSKII, V.; KOSTYUK, A. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacology**, v. 38, p. 1763-1769, 1989.

AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. A plasmid-encoded class1integron carrying sat, a putative phosphoserine phosphatase gene and aadA2 from enterotoxigenic *Escherichia coli* O159 isolated in Japan. **FEMS Microbiology Letters**, v. 235, p. 243–248, 2004.

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, p. 131-140, 2016.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 3ª. ed. Viçosa: UFV, 2004.

ARAYA, H. Studies on annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* L. seeds. **Bulletin of National Institute for Agro-Environmental Sciences**, v. 23, p. 77-149, 2004.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do mercúrio**. São Carlos/SP: Editora Ri Ma, p. 272, 2002.

AZUCENA, E.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. **Drug Resistance Updates**, v. 4, p. 106-17, 2001.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBACK, D.; WAOMAR, M.. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chemistry Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-75, 2008.

BALTHAZAR, M. B.; SANTOS, B. M. O. A desinfecção de nebulizadores em uma unidade básica de saúde de Ribeirão Preto. **Revista da Escola de Enfermagem. USP**, v. 31, n. 1, p. 23-35, 1997.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-41, 2005.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 260-5, 2008.

BARBALHO, S. M. et al. *Annona* sp: plants with multiple applications as alternative medicine-a review. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, p. 277-86, 2012.

BARBOSA, F. F. et al. Influência da temperatura e do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1221-5, 2006.

BARREIRA, S.; SCOLFORO, J. R. S.; BOTELHO, S. A.; MELLO, J. M. Estudo da estrutura da regeneração natural e da vegetação adulta de um cerrado sensu stricto para fins de manejo florestal. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 61, p. 64-78, 2002.

BARREIRO, E. J.; SILVA, B. V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-88, 2009.

BROOKS, G. F.; CAROL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 24ª ed., Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **In Journal Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-53, 2004.

CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401-18, 2000.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Infecções causadas por *Escherichia coli*. In: Coura, J.R. (Ed). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. p.1357-66, 2005.

CARDOSO, P. C. S.et al. Efeitos Biológicos do Mercúrio e seus Derivados em Seres Humanos - uma revisão bibliográfica. **Revista Paraense de Medicina**, v. 15, n. 4, p. 51-8, 2001.

CASTILHO, A. R.; MURATA, R. M.; PARDI, V. Produtos Naturais em Odontologia. **Revista Saúde-UnG**, v. 1, n. 1, p. 11-9, 2007.

CHOU, C. H.; REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. Allelopathy: A physiological process with ecological implications. **Dordrecht: Springer**, p. 637, 2006.

CHUNG, J. G.et al. Inhibitory actions of luteolin on the growth and arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer patients. **Toxicology In Vitro**, v. 15, n. 3, p. 191-8, 2001.

CLARKSON, T. W. The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 34, n. 4, p. 369-403, 1997.

CLARKSON, T. W.; VYAS, J. B.; BALLATORI, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 50, p. 757-64, 2007.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests - M02-A11**. 11. ed. Wayne: CLSI, Wayne: USA 2012.

COGO, A. J. D.et al. Using oxidative stress enzymes as biomarkers in environmental impacts. **Natureza Online**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

COLLIN, H. A. Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regulators**, v. 34, p. 119-34, 2001.

COURA, J. R. **Síntese das Doenças Infecciosas e Parasitárias.** , Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, v. 2, 2008.

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. 328-30, 2008a.

COUTINHO, H. D. M. et al. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-5, 2008b.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** 18.ed. New York: Columbia University Press. p. 1262, 1981.

DAFERERA, D. J.; ZIOGASB, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* sub sp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003.

DEURENBERGER, R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 222-35, 2007.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 2^a Ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., p.507, 2002.

DIAS, M.; MONTEIRO, M. S. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia: clínica, investigação e inovação.** p. 12, 2010.

EISENSTEIN, B. I.; ZALEZNIK, D. F. *Enterobacteriaceae*. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (eds). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and

practice of infectious diseases. 5th (ed). v. 2. **Philadelphia: Churchill Livingstone.** 2000.

EMANUELLI, T. et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinatase desidratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol Toxicol.**, v. 79, p. 136-43, 1996.

ERNST, E.; WEIHMAYR, T.; **British Medical Journal**, v. 321, p. 707, 2000.

ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de limnologia.** 2. ed., Rio de Janeiro: Interciência, p. 602, 1998.

FEHLBERG, I.; OLIVEIRA, R. A.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Atividade antibacteriana de flavonoides e triterpenos de *Myrcia guianensis*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., **Anais...** Fortaleza-CE, 2009.

FELLENBERG, G. **Introdução aos Problemas da Poluição Ambiental**, São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária Ltda., 1980.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, p. 761-70, 1999.

FOURMY, D.; RECHT, M. I.; BLANCHARD, S. C.; PUGLISI, J. D. Structure of the A-site of *E. coli* 16 S rRNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, ed. 22, v. 274, n. 5291, p. 1367-71, 1996.

GELATTI, L. C; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; AZEVEDO P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 6-501, 2009.

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana Brasil, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, p. 501-14, 1986.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARBONE, J. B. **Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis**. 2nd ed., London: Chapman and Hall, p. 55-136, 1984.

HO, K. Y. et al. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 187-91, 2001.

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 140-50, 2006.

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletins**, v. 68, n. 1, p. 167-82, 2003.

JORDÃO, C. P.; SILVA, A. C.; PEREIRA, J. L.; BRUNE, W. **Quim. Nova**, v. 22, p. 47, 1999.

KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; SERTESER, M.; KOKEN, T. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of Nephrology**, v. 16, p. 219-24, 2003.

KAMDEM, J. P. et al. *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices. **Industrial Crops and Products is an International Journal**, v. 50, p. 625-32, 2013.

KONEMAN, W. E. et al. Bacilos Gram-Negativos não-fermentadores. In: KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, p. 263-329, 2001.

KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 3249-56, 2000.

LEMOS, R. M. A. et al. Macrófitas aquáticas e sedimentos como indicadores de Hg a jusante do garimpo do Tartarugalzinho, AP, Brasil. [CDROM]. In: SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS BRASILEIROS, 4., Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 02 a 07 de abril; 1998.

LENZI, H. L., VANNIER-SANTOS, M. A. **Interface parasito-hospedeiro: coabitologia - uma visão diferente do fenômeno parasitismo**. In: COURA, J. R. (2005). *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 19-44, 2005.

LEVISON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 663, 2010.

LIMA, M. D. **Perfil cromatográfico dos extratos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência**. 2007. Maceió, 101p. Dissertação - (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Maceió, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 62-3, 2002.

LUNA, J. S. **Estudo de Plantas Bioativas**. 2006. Recife, 254p. Tese - (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-38, 2002.

MATIAS, E. F. F. et al. **Biological activities and chemical characterization of *Cordiaverbenacea* DC. as tool to validate the ethnobiological usage.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi Publishing Corporation, 2013.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1003-12, 1999.

MURRAY, T. et al. Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, n. 2, p. 71-96, 2008.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** Tradução Carlos Pelleschi Taborda et al., 6ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

NASCIMENTO, E. S.; CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**, Centro de Recursos Ambientais, Bahia, v. 1, p. 176, 2001.

PATRICK, L. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. **Alternative Medicine Review**, v. 7, p. 456-71, 2002.

PAULA, M. T. **Estudo das alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela exposição ao Hg (II) sobre o sistema antioxidante e vias de sinalização celular em *Drosophila melanogaster*.** 2012. Santa Maria, 94p. Dissertação –

(Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Santa Maria, 2012.

PIETTA, P. G. J. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-42, 2000.

PROCOP, G. W.; COCKERILL II, F. **Enterites causadas por *Escherichia coli* e espécies de *Shigella* e *Salmonella***. In: WILSON, W. R. et al. (Eds). Doenças infecciosas. Diagnóstico e tratamento. Porto Alegre: Artmed, p. 563-80, 2004.

REIS, C. N. ***Annona muricata*: análise química e biológica dos frutos de gravioleira**. 2011. Rio de Janeiro, 150p. Dissertação - (Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Rio de Janeiro, 2011.

RINALDI, M. V. N. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.** 2007. São Paulo, 125p. Dissertação - (Mestrado). Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2007.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-49, 1988.

RISHER, J. F., AMLER, S. N. Mercury exposure: evaluation and intervention. The inappropriate use of chelating agents in the diagnosis and treatment of putative mercury poisoning. **Neurotoxicology**, v. 26, p. 691-9, 2005.

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-8, 2011.

SANT'ANA, A. et al. Qualidade microbiológica de águas minerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 190-4, 2003.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-73, 2000.

SARTORI, M. R. K. et al. Antifungal Activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (ASTERACEAE), **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 567-9, 2003.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia - Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 664p., 2002.

SCHLEMPER, S. R. M.; CORDEIRO, F.; BLOCK, L. C.; CECHINEL FILHO, V. Atividade antibacteriana de frações semipurificadas e compostos puros de *Wedelia paludosa* (Compositae). **Alcance** (Itajaí), v. 5, n. 2, p. 14-8, 1998.

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

SOUSA, E. O. et al. Chemical composition and resistance modifying effect of *Lantana camara* lin. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, p. 79-82, 2010.

SOUSA, O. V. **Atividades farmacológicas de produtos obtidos de *Duguetia lanceolata* e *Annona coriacea* - Annonaceae**". 2003. Rio de Janeiro, 143p. Tese - (Doutorado em Biotecnologia Vegetal). Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

SOUZA, R. F. V.; SUUSSUCHI, E. M.; GIOVANI, W. F. Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. **Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry**, v. 33, n. 7, p. 1125-44, 2003. DOI:10.1081/SIM-120023482

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2ª ed., Nova Odessa: Plantarum, p. 640, 2008.

STEVENSON, F.J. **Humus Chemistry: genesis, composition, reactions**. 2nd. ed., New York: John Wiley, p. 496, 1994.

TCHOUNWOU, P. B.; PATLOLLA, A. K.; CENTENO, J. A. Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure-a critical review. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 6, p. 575-88, 2003.

TODAR, K. **Bacterial resistance to antibiotics**. *Todar's text book of bacteriology*. 2011 [4 screens]. Available from: <http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 8ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2008.

TSUCHIYA, H. et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 27-34, 1996.

VALDIR, F. V. J.; ANGELO, C. P.; MARIA, A. M. M. **Plantas medicinais: cura segura?** Universidade Federal do Rio de Janeiro, CT, Bloco A, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro – RJ, p. 970-21945, 2005.

VERONESI, R.; FOCACICCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2009.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 181-7, 2002.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775-81, 2000.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma Guerra Perdida?** In: *Uso Racional de Medicamentos: Temas Seleccionados*. Organização Mundial de Saúde, Organização Pan-Americana de Saúde, Ministério da Saúde Brasil, Brasília, v. 1, n. 4, 2004. Disponível em: www.anvisa.gov.br/servicosaude/rede_rm/2007/2.../opas_1_uso_indiscriminado.pdf. Acesso em: 17 Jul. 2016.

XU, H. X.; LEE, S. F. Activity of Plant Flavonoids Against Antibiotic – Resistant Bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 39-43, 2001.

YAMAMOTO, H.; OGAWA, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 921-4, 2002.

ZEMBOWER, T. R. et al. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 10, p. 95-105, 1998.

ANEXOS

ANEXO A - COMPROVANTE SUBMISSÃO ARTIGO 1.

23/04/16

Gmail - [pr]:Acknowledgment of Online Submission



Henrique Douglas Coutinho <hdmcoutinho@gmail.com>

[pr]:Acknowledgment of Online Submission

Pharmacognosy Research <journals@phcog.net>

22 de abril de 2016 11:22

Responder a: journals@phcog.net

Para: hdmcoutinho@gmail.com

If you cannot see this page properly, please [click here](#).

Dear Prof. Coutinho,

NOTE: This e-mail is sent to you as one of the contributing authors. *If you are not corresponding author, you do not have to do anything. Please co-ordinate with the author designated by your group as the corresponding author* for this manuscript

A manuscript has been submitted to our journal Pharmacognosy Research by Henrique Coutinho titled 'CHEMICAL CHARACTERIZATION AND CYTOPROTECTIVE EFFECT OF THE HYDROETHANOL EXTRACT FROM *Annona coriacea* Mart. (ARATICUM)'. A copy of the acknowledgment mail is attached here with for your reference.

Thanking you
Editorial Team
Pharmacognosy Research

Dear Prof. Coutinho,

Pharmacognosy Research has received your manuscript entitled "CHEMICAL CHARACTERIZATION AND CYTOPROTECTIVE EFFECT OF THE HYDROETHANOL EXTRACT FROM *Annona coriacea* Mart. (ARATICUM)" for consideration for publication. The reference number for this manuscript is "pr_46_16". Kindly quote this in correspondence related to this manuscript.

Meanwhile, you can fill authorship form via this link
<https://docs.google.com/forms/d/1aTwhHMPfaDHKhKaa-Eb9pmDQot0FHLeOTN5CdEjnE6Q/viewform>

The manuscript is being reviewed for possible publication with the understanding that it is being submitted to one journal at a time and have not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere either as a whole or in part. Online submission of this article implies that the corresponding author has the written consent from all the contributors to act as corresponding author.

You are requested to send the signed copyright/contributor form within two weeks. The form can be uploaded as an scanned image from your area. The decision about the manuscript will be conveyed only on receipt of the form. High resolution images are required at the time of acceptance, you should be notified separately for the same, if images uploaded by you are not of printable quality.

The Editors will review the submitted manuscript initially. If found suitable, it will follow a double-blinded peer review. We aim to finish this review process within a short time frame, at the end of which a decision on the suitability or otherwise of the manuscript will be conveyed to you via this system. During this process you are free to check the progress of the manuscript through various phases from our online manuscript processing site <http://www.journalonweb.com/pr>.

The journal allows free access (Open Access) to its contents and permits authors to self-archive final accepted version of the articles on any OAI-compliant institutional / subject-based repository.

Due to high publishing cost and other financial constraints in the year 2015, Articles clearing in peer review process or upon acceptance, Authors are required to pay Article Processing Charges to Either Publisher or

23/04/16

Gmail - [pr]: Acknowledgment of Online Submission

Phcog.Net, INDA

Download Factsheet : http://www.phcog.net/files/factsheet_PR.pdf

For more details visit <http://journalonweb.com/pr> >> Policies

We thank you for submitting your valuable work to the Pharmacognosy Research.

Yours sincerely,
Editor, Phcog Res
Pharmacognosy Research

[Texto das mensagens anteriores oculto]

ANEXO B - ARTIGO SUBMETIDO.

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND CYTOPROTECTIVE EFFECT OF THE HYDROETHANOL EXTRACT FROM *Annona coriacea* Mart. (ARATICUM)

ABSTRACT

Introduction: *Annona coriacea* Mart. popularly known as araticum is a widely distributed tree in the cerrado. Its value is attributed principally to the consumption of its fruit which possesses a large nutritive potential and are appreciated for its pulp commonly consumed *in natura* or in the form of sweets, jams, juices, liqueurs and pies, in addition to its pharmacological properties associated with different parts of the plant. The objectives was identify the chemical profile and evaluate the antimicrobial and cytoprotective activity of the hydroalcoholic extract (HEAC) of *Annona coriacea* Mart. leaves against the toxicity of mercury chloride. **Materials and Methods:** The characterization of components was carried out using HPLC. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by microdilution method in broth with strains of *Staphylococcus aureus* (Rosenbach), *Escherichia coli* (T. Escherich) and *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter). For evaluation of the modulatory activity of aminoglycoside antibiotics (gentamicin and amikacin), the antibiotics were serially diluted in wells containing the Brain Heart Infusion Broth (BHI) culture medium – BHI at 10% and the multiresistant inoculum suspension, with the HEAC at sub-inhibitory concentrations (MIC/8). The cytoprotective activity against mercury chloride (HgCl_2) was verified with microdilution plates that were incubated for 24 h at 37°C. The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined as the smallest concentration capable of inhibiting the growth of microorganisms, utilizing Petri dishes with Brain Heart Infusion Agar – BHI for the transfer of incubates solutions in microdilution plates. **Results and discussion:** The HPLC analysis revealed the presence of flavonoids like Luteolin (1.84%) and Quercetin (1.19%) in elevated concentrations ($p < 0.05$). The HEAC presented a MIC $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ and significant antagonistic action in aminoglycosides modulation $p < 0.0001$, it also showed cytoprotective activity to *Staphylococcus aureus* (significance $p < 0.0001$)

and *Escherichia coli* (significance $p < 0.05$) bacteria against the mercury chloride heavy metal with significance, this action being attributed to the chelating properties of the flavonoids found in the chemical identification. **Conclusions:** The results acquired in this study show that the *Annona coriacea* Mart. hydroalcoholic extract presents cytoprotective activity over the tested strains *in vitro*, and can also present antagonistic effect when associated with aminoglycosides, reinforcing the necessity of taking caution when combining natural and pharmaceutical products.

Key words: *Annona coriacea* Mart., mercury chloride, flavonoids, antimicrobial, aminoglycosides.

INTRODUCTION

Research for the production of new pharmaceuticals from natural products involve diverse fields of knowledge and various methods of analysis, from the collection and identification of materials, to biological triage and pharmacological tests, determination of the active principle and mechanism of action by which the pharmacological effect is exerted.^[3]

Annonaceae is a large family of plants in the Cerrado region of Brazil, containing approximately 27 genera and 290 species, and including a great variety of exotic fruits.^[11] *Annona coriacea* Mart. popularly known as araticum is a widely distributed tree in the cerrado. Its value is attributed principally to the consumption of its fruit which possesses a large nutritive potential and are appreciated for its pulp commonly consumed *in natura* or in the form of sweets, jams, juices, liqueurs and pies, in addition to its pharmacological properties associated with different parts of the plant.^[4]

The necessity of research with natural products motivates the substitution of synthetic chemical substances for natural materials of low cost and of easy access, once the benefits of the research can contribute to the conservation of natural vegetation and sustainability of semi-natural production systems.^[6]

The anthropic aggression to the environment has been considered in many forms, with the improper use of mercury normally being shown as one of the more representative examples of what man can do to natural cycles, due to population growth and intensification of human activities involving these elements, the

concentration of heavy metals has principally increased in bodies of water, where these levels threaten biotic aquatic and terrestrial organisms, for example, man himself.^[5] Mercury is present in the environment in the chemically oxidized form or as metallic mercury, in its elementary state it emerges from volcanoes of the Earth's crust degradation, however the artificial forms are more diversified than those considered natural.^[2]

Metals act as selective agents of resistant bacteria to antibiotics, in contrast to antibiotics, metals suffer a greater difficulty in being naturally degraded, however, microorganisms have developed diverse resistance mechanisms in response to toxic metals, bacterial resistance to toxic metals such as mercury is one of the most studied resistance mechanisms. In Gram-negative bacteria, especially those belonging to the *Escherichia coli* species, the presence of genetic resistance determinants to mercury have been described, which makes a promising alternative to bioremediation processes.^[30]

Various genera from the Enterobacteriaceae family, including the *Escherichia coli* (T. Escherich) and *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) species, non-fermenting Gram-negative bacilli have been considered problematic due to the increase in resistance rates to antimicrobials.^[21,26] The genus *Staphylococcus aureus* (Rosenbach) is also greatly associated with human infections and are classified as coagulase-positive strains.

This study had as its objective to identify the chemical profile and evaluate the antimicrobial and cytoprotective activity of the hydroalcoholic extract from *Annona coriacea* Mart. (Araticum) leaves against mercury chloride.

MATERIALS AND METHODS

Plant material *Annona coriacea* Mart.

The botanical material was collected in the Cariri in Crato, CE, Brazil. After collected a voucher specimen was compared with voucher Herbarium Caririense Dárdano de Andrade-Lima, Regional University of Cariri-URCA and identified as belonging to *Annona coriacea* Mart. species.

Concentration of the hydroethanol extract

For preparation of the hydroethanol extract were collected and perforated sheets into pieces of about 1 cm², which were immersed in equal parts of distilled water and ethanol for 72 hours at room temperature. After this period, it was filtered and concentrated on rotaevaporator (Q-344B- Quimis model, Brazil), to evaporate the ethanol. Dehydration was performed in Bath Mary (model Q214M2- Quimis, Brazil), then the material was placed in freezer for freezing and freeze-dried in (Líotop equipment, Model L101). The extract was packed in amber glass and stored at -20⁰C temperature. The yield of the extract was 3.53%.

Bacterial material

Three microbial standard lineages from the “*American Type Culture Collection*” were used: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853; *Escherichia coli* ATCC 9027. To evaluate the modulatory activity of the natural products the following multiresistant bacterial isolates were used: *Staphylococcus aureus* SA 358; *Pseudomonas aeruginosa* PA 03; *Escherichia coli* EC 06 [Table 1]. The strains were maintained using Heart Infusion Agar (HIA, Difco Laboratorises Ltda.). Before the tests, the cells were cultivated for 24h in Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories Ltda.).

Quantification of compounds by means of HPLC-DAD

High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD) was carried out with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions utilizing a C18 column (4.6mm x 150 mm) loaded with 5 um diameter particles; the mobile phase was water containing 2% formic acid (A) and acetonitrile (B), and the composition gradient was the following: 17% of B until 10 min and altered to obtain 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% and 10% of B at 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 min, respectively, following the method described by Kamdem et al. (2013) with slight modifications. The Araticum (*Annona coriacea* Mart.) hydroalcoholic extract was analyzed to a concentration of 15 mg/mL. The presence of antioxidant compounds was investigated, that is, gallic acid, chlorogenic acid,

caffeic acid, coumaric acid, catechin, epicatechin, quercetin, quercitrin, rutin and luteolin. The identification of these compounds was made by comparison of their retention times and UV absorbance spectrum with commercial standards.

The rate of flux was of 0.6 mL/min, injection volume of 50 μ L and wavelength were 271 nm for gallic acid, 276 nm for coumaric acid, 280 nm for catechin and epicatechin, 327 nm for caffeic and chlorogenic acid, and 365 nm for quercetin, quercitrin, rutin and luteolin. The samples and mobile phases were filtered through the 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and, it was then degassed by ultrasonic bath before use. The standard reference stock solutions were prepared in the mobile phase of the HPLC in a range of concentrations of 0.025 – 0.300 mg/ml for catechin, epicatechin, quercetin, quercitrin, rutin and luteolin; and 0.030 – 0.350 mg/ml for caffeic, coumaric, chlorogenic and gallic acid. The chromatography peaks were confirmed by comparison of the retention time with standard references and by DAD spectrum (200 to 500 nm). Calibration curve for catechin: $Y = 12509x + 1,263.8$ ($r = 0.9995$); epicatechin: $Y = 11958x + 1,309.1$ ($r = 0.9997$); gallic acid: $Y = 11875x + 1,253.4$ ($r = 0.9999$); caffeic acid: $Y = 13165x + 1,185.3$ ($r = 0.9996$); chlorogenic acid: $Y = 12603x + 1,274.9$ ($r = 0.9998$); rutin: $Y = 12657x + 1,378.9$ ($r = 0.9999$); quercetin: $Y = 13591x + 1,183.7$ ($r = 0.9995$); quercitrin: $Y = 11783x + 1,263.8$ ($r = 0.9999$); coumaric acid: $Y = 12574x + 1,261.8$ ($r = 0.9993$) and luteolin $Y = 13509x + 1,267.5$ ($r = 0.9997$). All the chromatography operations were carried out in room temperature and in triplicates. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope from three independent analysis curves.^[16] The LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S , respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

Preparation of the original solution and test solutions

In preparing the initial solution, the extract was solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO), BEING as observed following proportions: 10 mg of extract solubilized in 1 ml of dimethylsulfoxide (DMSO), para obtain an initial concentration of 10 mg/ml. Then, this solution was diluted in distilled water reaching extract concentration of 1024 μ g/mL (pH 6.76; 2,138 mOsm/kg H₂O) and reducing DMSO concentration paragraph 10% and From this, effected If serial dilutions 1:1 During the microdilution

test, yielding to extract concentrations ranging 512-8µg/mL DMSO and paragraph 5% concentration.

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and modulation of aminoglycosides

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the *Annona coriacea* Mart. hydroalcoholic extract (HEAC) and fractions, were determined by microdilution tests using suspensions of 10^5 CFU/mL of standard strains, and the HEAC in the initial concentration of 1.024 µg/mL.^[7,8] For evaluation of aminoglycoside antibiotic modulatory activity (gentamicin and amikacin) the solutions were prepared with the addition of sterile distilled water to obtain a concentration corresponding to 1.024 µg/mL. A volume of 100 µL of each antibiotic solution were serially diluted in wells containing Brain Heart Infusion Broth culture medium – BHI at 10% (pH 6,85; 404 mOsm/kg H₂O) and the multiresistant inoculum suspension, with the HEAC at sub-inhibitory concentration (MIC/8).^[9] The culture medium final concentration of antibiotics were of 512 to 0.5 µg/mL. The plates were incubated for 24 h at 35 ± 2 °C and the activity was evidenced by the use of Resazurin sodium.

Cytoprotective activity against mercury chloride test

For evaluation of the protective effect of HEAC and fractions to mercury chloride (HgCl₂), a modulation using sub-inhibitory concentrations of the products were carried out, 10^5 CFU/mL suspensions of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 9027 in Brain Heart Infusion Broth medium – BHI and one concentration of mercury chloride (271.52 g/mol) varying from 10 mM to 0.0048 mM. The microdilution plates were incubated for 24 h at 37 °C. The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined using the lowest concentration capable of inhibiting the growth of microorganisms, using Petri dishes with Brain Heart Infusion Agar – BHI for transferring solutions incubated for 24 h at 37 °C in microdilution wells. The natural product was evaluated in relation to the control experiment with only mercury. The petri dishes were incubated in an incubator at approximately 37 °C and the reading was taken after 24 hours of incubation.^[18]

Statistical analysis

The graphs were produced by the GraphPadPrism 5 software. Statistical analysis was done using a Two-way ANOVA followed by the Bonferroni test.^[19]

RESULTS AND DISCUSSION

The *Annona coriacea* Mart. (Araticum) hydroalcoholic extract in the HPLC analysis revealed the presence of gallic acid (tR = 9.97 min; peak 1), catechin (tR = 15.03 min; peak 2), chlorogenic acid (tR = 21.54 min; peak 3), caffeic acid (tR = 24.98 min; peak 4), coumaric acid (tR = 31.49min; peak 5), epicatechin (tR = 34.67 min; peak 6), rutin (tR = 42.15 min; peak 7), quercitrin (tR = 49.16 min; peak 8), quercetin (tR = 50.02 min; peak 9) and luteolin (tR = 56.73 min; peak 10) [Figure 1 and Table 2].

Was reports in the phytochemical identification of the genus Annonaceae the predominance of the alporphine and oxoalporphine alkaloids, besides these, constituents such as polyphenols, essential oils, terpenes and aromatic substances are also found in the family's representatives.^[17]

The alporphine alkaloids possess great representation in the isoquinolines groups, and were only found in plants of the Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae (Ranales order), Papaveraceae (Rhoedales order) and Rhamnaceae (Rhamnales order)^[12] families. The presence of the alporphine alkaloids in the Annonaceae family is constant in species of the genus *Annona* with reports of the isolation and identification in leaves.^[10] In this way, the following compounds were found in the chemical identification of the *Annona coriacea* Mart. hydroalcoholic extract [Table 2]:

Natural products of vegetable and animal origin can alter the effect of antibiotics, be it increasing or decreasing the antibiotic activity, and can be denominated modulators of antibiotic activity.^[8,24]

Alkaloids between the already isolated alkaloids of the *Annona* genus, anonaine and estefarina presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, glaziovine presented activity over *Escherichia coli*. Anolobina, nornantenina and lanuginosina are also found and presented antimicrobial activity over the *Salmonella typhimurium* bacteria.^[23]

The presented results for the MIC of the HEAC for all the standard and multiresistant species were $\geq 512 \mu\text{g/mL}$. The graphs below show the evaluation of the modulatory activity of bacterial resistance to aminoglycosides utilizing amikacin and gentamicin combined with the HEAC, determined after the MIC test by microdilution against the multiresistant and standard lineages of *Escherichia coli* [Graph 1], *Staphylococcus aureus* [Graph 2] and *Pseudomonas aeruginosa* [Graph 3].

According to the results obtained on the cytoprotective activity [Graph 4], the HEAC presents significant cytoprotection $p < 0.0001$ and $p < 0.05$ in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains against mercury chloride (HgCl_2). The data obtained indicates the product as a promising source in the combat to heavy metals, presenting itself as protectors of prokaryotic beings.

Mercury has a large cytotoxic effect over various types of cells, principally those of the immune system, being capable of inducing immunosuppression in many animal species.^[29] In contrast to antibiotics, metals have a great difficulty in suffering natural degradation, thus increasing the importance of their role as bactericidal agents especially in bacteria that are resistant to antibiotics.

Flavonoid compounds can act with an antioxidant activity, reacting with free radicals and also as metal chelators.^[14] The most abundant flavonoid classes in the *Annona* genus are the flavonols and its glycosylated derivatives, being present both the glycosylated O-glycosides and C-glycosides, within these it is possible to identify the presence of O-glycosides of quercetin, isorhamnetin, kaempferol and luteolin in leaves of various *Annona* genera.^[25]

The presence of these may justify the possible cytoprotective effect observed in the tests, since the high performance liquid chromatography (HPLC) analysis demonstrated the presence of flavonoids like Luteolin (1.84%) and Quercetin (1.19%) in elevated concentrations ($P < 0.05$).

The antioxidant action of the flavonoids is mainly through the presence of the large number of hydroxyls in the B ring.^[27] The cytoprotective property against mercury chloride is directed by the chelation which can maintain the metal in solution, making it unavailable through precipitation or the complex formed.^[28]

The extremely rapid combinations of metals with free radicals OH and O_2 through the Fenton or Haber-Weiss reaction, stimulate the presence of hydroxyl radicals.^[20,22] The hydroxyl group can inactivate various proteins by oxidizing their

sulfhydryl (-SH) groups and disulfide bridges (-SS), they can also initiate lipoperoxidation provoking the disruption of the cellular matrix.^[13]

Quercetin can inhibit the process of free radical formation through interaction with superoxide ions, the formation of hydroxyl radicals through chelating metal ions and inhibiting lipid peroxidation by reacting with peroxy radicals of lipids, protecting the cell against the cytotoxic action of metals.^[1,15]

CONCLUSIONS

The results obtained in this study show that the *Annona coriacea* Mart. hydroalcoholic extract can be used as a source of natural products derived from this plant, once cytoprotective activity over tested strains is presented *in vitro*, and can also present an antagonistic effect when associated with aminoglycosides, reinforcing the necessity of caution when combining natural products and pharmaceuticals.

REFERENCES

1. AFANASEV, I.B.; DOROZHKO, A.I.; BRODSKII, V.; KOSTYUK, A. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacology**, v.38, p.1763-1769, 1989.
2. AZEVEDO, F.A. **Toxicologia do mercúrio**. São Carlos/SP: Editora Ri Ma, p. 272, 2002.
3. BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, n. 5, p. 431-441, 2005.
4. BARBALHO, S.M; GOULART, R.A.; FARINAZZI-MACHADO, M.V.; SOUZA, F.S.S.; BUENO, M.C.S.; GUIQUERER, P.L.; ARAUJO, E.C. GROppo, M.A. *Annona* sp: plants with multiple applications as alternative medicine-a review. **Current Bioactive Compounds**, v.8, p.277–286, 2012.
5. BERTOLAZI, A.A.; CANTON, G.C.; AZEVEDO, I.G.; CRUZ, Z.M.A.; SOARES, J.M.; SANTOS, W.O.; RAMOS, A.C. O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais pesados no solo. **Natureza on line**, v.8, n.1, p.24-31, 2010.
6. CHOU, C.H.; REIGOSA, M.J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. Allelopathy: A physiological process with ecological implications. **Dordrecht: Springer**. p. 637, 2006.
7. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5^a ed. Villanova, PA: **CLSI approved standard**, M7-A5, v. 20, n. 2, 2000.
8. COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S., SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. 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.
9. COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-675, 2008.
10. DEBOURGES, D.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Alkaloids of the Annonaceae. Part 77. Alkaloids of *Duguetiaspixiana*. **Journal of Natural Products**, v.50, n.4, p.664-673, 1987.
11. FORMAGIO, A.S.N.; VIEIRA, M.C.; VOLOBUFF, C.R.F.; SILVA, M.S.; MATOS, A.I.; CARDOSO, C.A.L.; FOGGIO, M.A.; CARVALHO, J.E. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.48 n.4, 2015.

12. GUINAUDEAU, H.; LEBOUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine Alkaloids II. **Journal of Natural Products**, v.42, n.4, p.325-360, 1979.
13. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.246, p.501-14, 1986.
14. HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. v.55, n.6, p.481-504, 2000.
15. KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; SERTESER, M.; KOKEN, T. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of Nephrology**, v.16, p. 219-224, 2003.
16. KAMDEM, J.P.; OLALEKN, E.O.; HASSAN, W.; KADE, J.; YETUNDE, O.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B.T. *Trichiliacatigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rathippocampal slices. **Industrial Crops and Products is an International Journal**. v.50, p.625- 632, 2013.
17. LEBOUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MURKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v.21, n.12, p.2783-2813, 1982.
18. LIMA, C.N.F.; Valero, T.F.; MILK, N.F.; ALENCAR, L.B.B.; MATIAS, E.F.F.; KERNTOF, M.R.; COUTINHO, H.D.M. Protective Action *Duquetia furfuracea* (A. St.- Hil.) Saff . Against Toxicity to mercuric chloride in *Escherichia coli*. **Cuban Journal of Medicinal Plants**, v.19, n.1, p.179-188, 2014.
19. MATIAS, E.F.F.; ALVES, E.F.; SANTOS, B.S.; SOUZA, C.E.S.S.; FERREIRA, J.V.A.; LAVOR, A.K.L.S.; FIGUEREDO, F.G.; LIMA, L.F.; SANTOS, F.A.V.; PEIXOTO, F.S.N.; COLARES, A.V.; BOLIGON, A.A.; SARAIVA, R.A.; ATHYDE, M.L.; ROCHA, J.B.T; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; and COSTA J.G.M. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, ed. Hindawi Publishing Corporation, 2013.
20. MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v.52, n.4, p.673-751, 2000.
21. PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.657–686, 2005.
22. PIETTA, P.G. J. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1035-1042, 2000.
23. RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacology**, v.23, p.127-149, 1988.
24. RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**, v.16, n.11, p.1052-1055, 2009.
25. SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F. Foliar Flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v.55, p.567-573, 2000.
26. SLAMA, T.G. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. **Journal of Critical Care**, v.12 (Suppl. 4), 2008.
27. SOUZA, R.F.V.; SUSSUCHI, E.M.; DE GIOVANI, W.F.; SYNTH. **Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry**. Estados Unidos, v.33, n.7, p.1125-1144, 2003.
28. STEVENSON, F.J. **Humus Chemistry: genesis, composition, reactions**. 2. ed. New York: John Wiley, p.496, 1994.
29. TCHOUNWOU, P.B.; PATLOLLA, A.K.; CENTENO, J.A. Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure-a critical review. **Journal of Toxicologic Pathology**, v.31, n.6, p.575–588, 2003.
30. ZEYULLAH, M.; NABI, G.; MALLA, R., Ali A. Molecular studies of *E. coli* mercuric reductase gene (*merA*) and its impact on human health. **Nepal Medical College Journal**, v.9, n.3, p.182-185, 2007.

Table 1 - And bacterial antibiotic resistance profile

Bacterium	Source	Resistance profile
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9027	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> SA 358	Surgical wound	Oxa, Gen, Tob, Ami, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA 03	Nasal discharge	Cf, Cfp, Cfd, Caz, Lv, Im Mero, Pip
<i>Escherichia coli</i> EC 06	Urine	Cf, Ca, Clx, Amp, Nor, Lm, Cip, Lv, Of, Ampisul

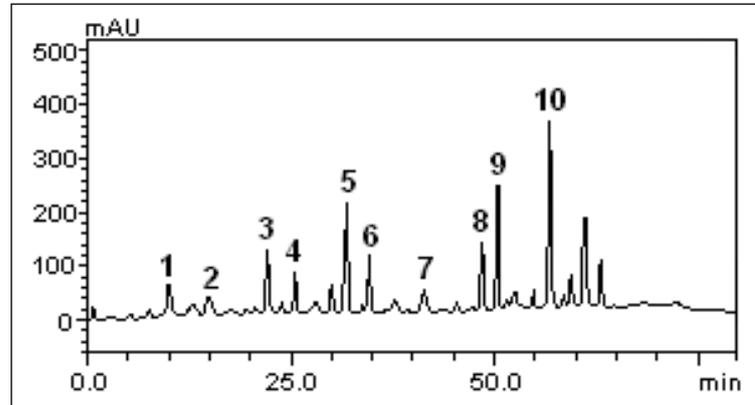
Amp – Ampicilina; Ampisul – Ampicilina-sulbactam; Ami – Amicacina; Amox – Amoxilina; Ca – Cefadroxil; Cfc – Cefaclor; Cf – Cefalotina; Clx – Cefalexina; Caz – Ceftazidima; Cfp – Cefepimo; Cfd – Ceftaridima; Cip – Ciprofloxacin; Im – Imipenem; Can – Canamicina; Lm – Lomefloxacin; Lv – Levofloxacin; Tob – Tobramicina; Of - Ofloxacin; Oxa – Oxacilina; Gen – Gentamicina; Mero – Meropenem; Nor – Normofloxacin; Neo – Neomicina; Para – Paramomicina; Pip – Piperacilina; But – Butirosina; Sis – Sisomicina; Net – Netilmicina.

Table 2 – Components of Araticum (*Annona coriacea* Mart.) hydroethanolic extract

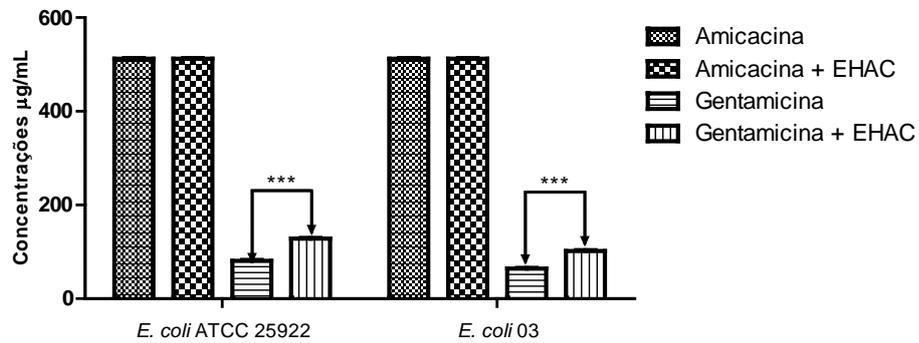
Compounds	<i>Annona coriacea</i> Mart.		LOD	LOQ
	mg/g	%	µg/mL	µg/mL
Gallic acid	2.97 ± 0.02	0.29	0.009	0.030
Catechin	2.64 ± 0.01	0.26	0.014	0.047
Chlorogenic acid	5.85 ± 0.01	0.58	0.021	0.070
Caffeic acid	3.09 ± 0.03	0.30	0.025	0.083
Coumarin acid	10.72 ± 0.02	1.07	0.017	0.056
Epicatechin	5.81 ± 0.02	0.58	0.008	0.028
Rutin	2.59 ± 0.01	0.25	0.029	0.096
Quercitrin	6.11 ± 0.03	0.61	0.007	0.024
Quercetin	11.93 ± 0.01	1.19	0.011	0.037
Luteolin	18.47 ± 0.03	1.84	0.031	0.102

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$

Figure 1 - Representative high performance liquid chromatography profile of Araticum (*Annona coriacea* Mart.) hydroethanolic extract. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), coumarin (peak 5), epicatechin (peak 6), rutin (peak 7), quercitrin (peak 8), quercetin (peak 9), and luteolin (peak 10)



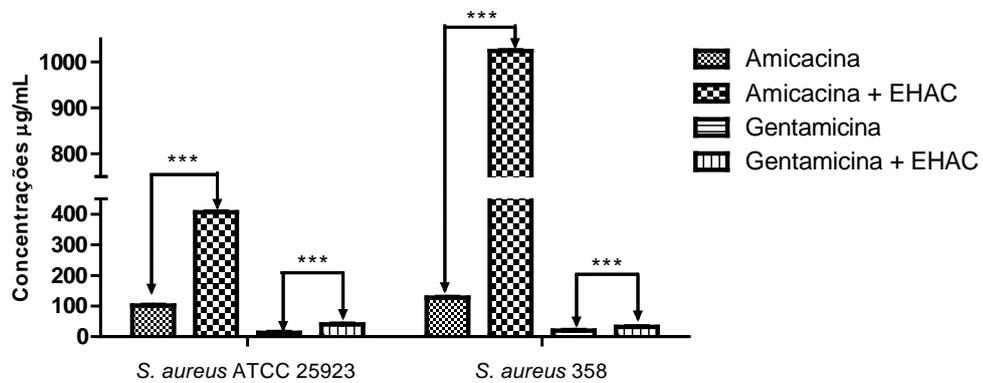
Graph 1 - Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of aminoglycosides in the presence and absence of *Annona coriacea* Mart. extract in a concentration CIM/8, against strains of *Escherichia coli*



EHAC: hydroalcoholic extract of *Annona coriacea* Mart.

*** Statistically significant value of $p < 0.0001$.

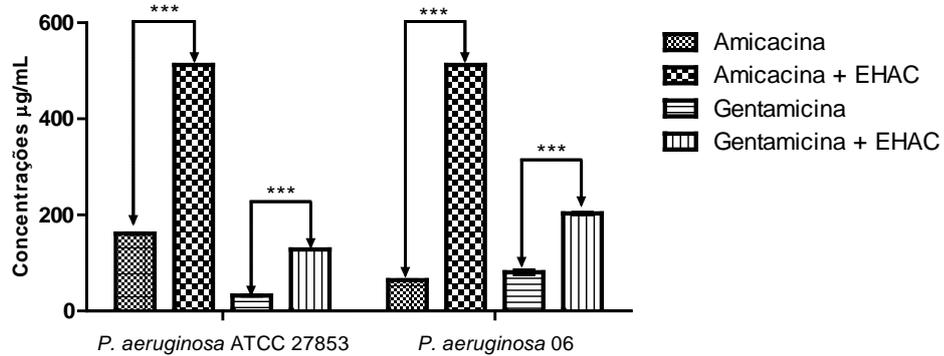
Graph 2 - Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of aminoglycosides in the presence and absence of *Annona coriacea* Mart. extract in a concentration CIM/8, against strains of *Staphylococcus aureus*



EHAC: hydroalcoholic extract of *Annona coriacea* Mart.

*** Statistically significant value of $p < 0.0001$.

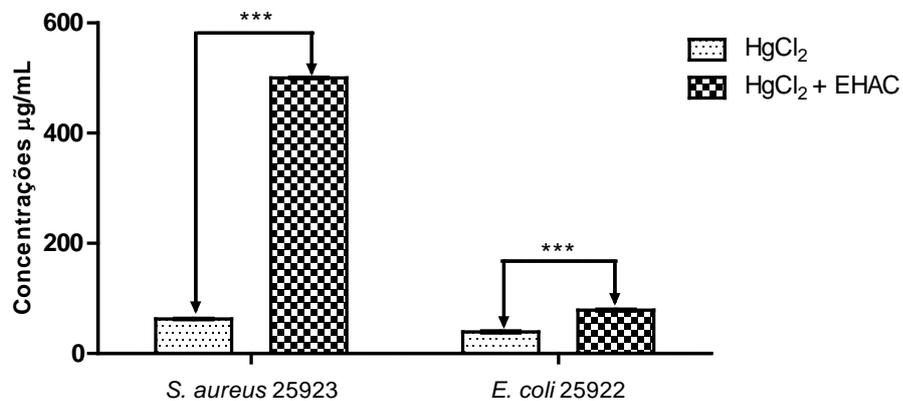
Graph 3 - Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of aminoglycosides in the presence and absence of *Annona coriacea* Mart. extract in a concentration CIM/8, against strains of *Pseudomonas aeruginosa*



EHAC: hydroalcoholic extract of *Annona coriacea* Mart.

*** Statistically significant value of $p < 0.0001$.

Graph 4 - Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of mercuric chloride in the presence and absence of *Annona coriacea* Mart. extract in a concentration MIC/8, against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*



EHAC: hydroalcoholic extract of *Annona coriacea* Mart.

HgCl₂: Mercuric chloride

*** Statistically significant value of $p < 0.0001$.