



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thiago José de Souza Barboza

**Avaliação do potencial leishmanicida e antibacteriano de *Annona mucosa*  
(Jacq.) - Annonaceae cultivada *in vitro* e *in vivo***

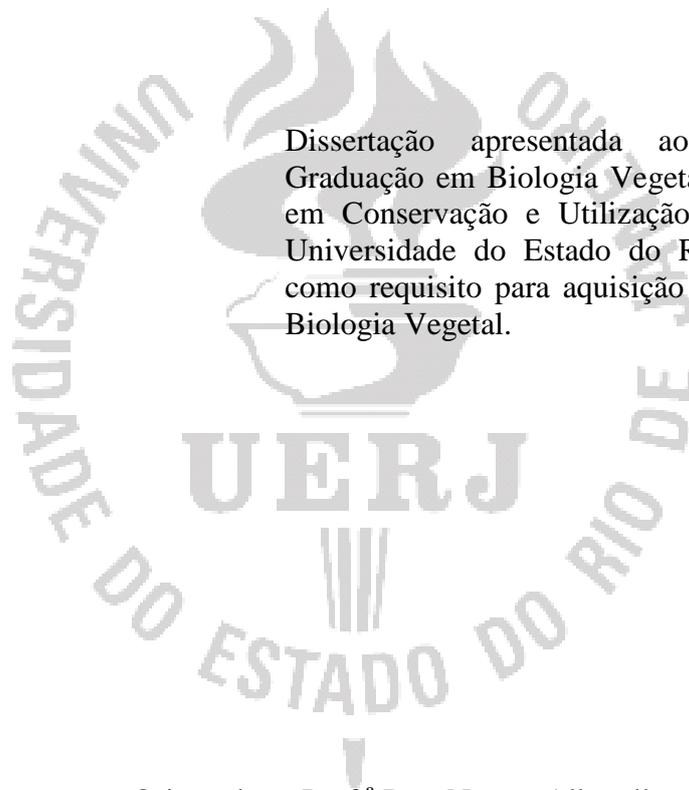
Rio de Janeiro

2013

Thiago José de Souza Barboza

**Avaliação do potencial leishmanicida e antibacteriano de *Annona mucosa* (Jacq.) -  
*Annonaceae* cultivada *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, área de concentração em Conservação e Utilização da Biodiversidade, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), como requisito para aquisição do título de Mestre em Biologia Vegetal.



Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Norma Albarello

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Rio de Janeiro  
2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

B238 Barboza, Thiago José de Souza.  
Avaliação do potencial leishmanicida e antibacteriano de *Annona mucosa* (Jacq.): Annonaceae cultivada *in vitro* e *in vivo* / Thiago José de Souza Barboza. – 2013.  
74f.:il.

Orientadora: Norma Albarello.  
Coorientadora: Silvia Amaral Gonçalves da Silva.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.  
Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais - Brasil - Teses. 2. Biotecnologia vegetal - Brasil - Teses. 3. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura - Teses. 4. Saúde Pública - Brasil - Teses. I. Albarello, Norma. II. Silva, Silvia Amaral Gonçalves da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 633.88(81)

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

---

Assinatura

---

Data

Thiago José de Souza Barboza

**Avaliação do potencial leishmanicida e antibacteriano de *Annona mucosa* (Jacq.) –  
Annonaceae, cultivada *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, área de concentração em Conservação e Utilização da Biodiversidade, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), como requisito para aquisição do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2013.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Norma Albarello (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Simões-Gurgel  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela de C. Freitas  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos  
Fundação Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Rio de Janeiro  
2013

## **DEDICATÓRIA**

À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UERJ por possibilitar a realização deste trabalho.

Às Professoras Norma Albarello, Silvia Amaral e Ana Claudia P. Rosa pela oportunidade, orientação e apoio a este trabalho.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ, pelo companheirismo e auxílio na realização do estudo.

À equipe do Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária (FCM/UERJ) pelo agradável convívio e colaboração.

À equipe do Laboratório 1 da Disciplina de Microbiologia (DMIP – FCM/UERJ) pelo suporte e auxílio à metodologia em estudo.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa de mestrado durante o período de trabalho.

À minha esposa Andréa F. Ferreira, não só pelo auxílio aos experimentos antimicrobianos, mas também pelo apoio de sempre.

Aos meus pais, por me apoiarem em minhas escolhas.

The lips of the righteous teach many; But  
fools die for want of wisdom.  
*Bob Marley*

## RESUMO

BARBOZA, Thiago José de Souza. *Avaliação do potencial leishmanicida e antibacteriano de Annona mucosa (Jacq.): Annonaceae cultivada in vitro e in vivo*. 2013. 74f.: il. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes Instituto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2013.

A biodiversidade brasileira abrange plantas de importância medicinal que podem ser utilizadas na formulação de novos fármacos. Contudo, tem sido reduzida em velocidade alarmante, em função de diferentes ações antrópicas. A cultura de tecidos vegetais propicia a conservação e uso do germoplasma permitindo a obtenção de substâncias de importância medicinal. As leishmanioses são consideradas um problema de saúde pública mundial sendo a espécie *Leishmania braziliensis* de maior importância epidemiológica no Brasil. Recentemente tem-se registrado aumento da resistência à linha de tratamento usual. Do mesmo modo, o uso indiscriminado de antibióticos levou ao aumento de bactérias multirresistentes, que representam sério risco de infecção. A espécie *Annona mucosa* (Jacq.) possui substâncias, como acetogeninas e alcaloides, que apresentam atividades antiparasitária e antimicrobiana. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial leishmanicida e antibacteriano de extratos de *A. mucosa* de material produzido *in vitro* e *in vivo*. Foi proposto um protocolo de germinação *in vitro*, ainda não reportada para a espécie, com vistas à obtenção de plântulas axênicas. Em meio WPM foram cultivados explantes hipocotiledonares e foliares em meio MS, suplementados com PIC e diferentes concentrações de KIN, BAP ou TDZ. Os calos obtidos foram cultivados em meio líquido de mesma composição para a produção de suspensões celulares. Os materiais foram submetidos à extração metanólica e posterior fracionamento em hexano e diclorometano. Para a avaliação da atividade dos extratos sobre *L. braziliensis* foi usado o modelo *in vitro*, com a forma promastigota, e *in vivo* na forma amastigota, a partir do tratamento de macrófagos peritoneais de camundongos infectados com o parasito. Ambas as formas foram tratadas com os extratos por 96 e 48h, respectivamente. A atividade antimicrobiana foi avaliada por macrodiluição do extrato em Mueller-Hinton, sendo avaliado o crescimento das cepas após 16h de incubação a 48°C. A germinação *in vitro* da espécie foi alcançada em substrato vermiculita estéril umedecido com solução de sais do meio MS, com taxa média de 85%. A maior produção de calos friáveis foi obtida em meios contendo KIN, com potencial uso para cultivo em suspensões celulares. Os extratos do material *in situ* e *in vitro* apresentaram atividade leishmanicida, apesar da toxicidade para macrófagos. Culturas de células em suspensão apresentaram potencial leishmanicida *in vitro* e redução da infecção em macrófagos. Os extratos do material avaliado apresentaram atividade antimicrobiana seletiva, com inibição do crescimento de *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus thuringiensis* em diferentes concentrações avaliadas. Os métodos biotecnológicos empregados permitiram a obtenção de materiais com propriedades medicinais para as atividades leishmanicida e antibacteriana, assim como o material *in vivo*, constituindo este estudo o primeiro relato para as atividades propostas em *A. mucosa*.

Palavras-chave: *Annona mucosa*. Leishmaniose. Antimicrobiano. Planta medicinal. Cultura de tecidos vegetais. Metabolismo secundário.

## ABSTRACT

BARBOZA, Thiago José de Souza. *Evaluation of antileishmanial and antibacterial potential of Annona mucosa (Jacq.): Annonaceae cultivated in vitro and in vivo*. 2013. 74f.:il. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes Instituto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2013.

The Brazilian flora encompasses medicinal importance species that can be used to develop new drugs. However, plants have been reduced in alarming rate, due to various human activities. Plant tissue culture promotes the conservation and use of species allowing for the production of bioactive substances for medicinal products. Leishmaniasis is considered a worldwide health problem, where *Leishmania braziliensis* is the most epidemiological importance specie in Brazil. Recently it has been registered increased resistance to treatment line. Similarly, the widespread use of antibiotics has led to an increase in multidrug-resistant bacteria, which represent a serious risk of infection. *Annona mucosa* have substances, such as acetogenins and alkaloids that exhibit antiparasitic and antimicrobial activities. In view of the problem, the aim of this work was to evaluate the leishmanicidal and antibacterial potential of extracts of *A. mucosa* obtained *in vitro* and *in vivo*. We proposed a protocol of *in vitro* germination, not yet reported for the species, aiming to achieve axenic seedlings. Hypocotyls explants was cultivated in WPM and leaf explants on MS medium supplemented with PIC and different concentrations of KIN, BAP or TDZ. The formed callus was cultured in liquid medium of the same composition for the production of cell suspensions. The materials were subjected to methanolic extraction and subsequent fractionation in hexane and dichloromethane. The activity of extracts on *L. braziliensis* was evaluated *in vitro* in the form promastigote and *in vivo* in amastigote form, in infected mice macrophages. Both, were treated with the extract *per* 96h and 48h, respectively. The evaluation of antimicrobial activity was performed by macrodilution assay in Mueller-Hinton, analyzing the growth of the strains after 16h of incubation at 48°C. The *in vitro* germination of *A. mucosa* was achieved in sterile vermiculite as substrate and has a 85% germination rate. The higher callus formation and friability was obtained in media containing KIN, that may be cultured in suspension. The extracts of the material *in situ* and *in vitro* showed leishmanicidal activity, despite the toxicity in macrophages. Cell suspension cultures showed antileishmanial potential *in vitro* and reduction of infection in macrophages. The evaluated extracts showed selective antimicrobial activity, with growth inhibition of *Streptococcus pyogenes* and *Bacillus thuringiensis* in different tested concentrations. It was concluded that the biotechnological techniques allowed to use plant materials regarding pharmacological properties for antileishmanial and antibacterial activities.

Keywords: *Annona mucosa*. Leishmaniasis. Antibacterial. Medicinal plant. Plant tissue culture. Secondary metabolism.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Morfotipos de <i>Leishmania</i> .....	20
Figura 2 -	Taxonomia de <i>Leishmania</i> .....	21
Figura 3 -	Aspectos morfológicos de <i>Annona mucosa</i> .....	26
Figura 4 -	Material botânico e substratos para a germinação <i>in vitro</i> de <i>A. mucosa</i> ....	31
Figura 5-	Cepas utilizadas no ensaio de avaliação do potencial antimicrobiano de extratos de <i>A. mucosa</i> obtida <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em crescimento em meio Mueller-Hinton Agar após 18h a 37°C.....	41
Figura 6 -	Germinação <i>in vitro</i> de <i>A. mucosa</i> a partir de sementes oriundas do Pará, em substrato vermiculita.....	43
Figura 7 -	Germinação <i>in vitro</i> de <i>A. mucosa</i> em substrato vermiculita após 4 semanas da germinação apresentando calejamento do hipocótilo e folhas ainda não expandidas.....	44
Figura 8 -	Calos de origem hipocotiledonar de plântulas de <i>A. mucosa</i> cultivadas <i>in vivo</i> , após 90 dias de cultivo em meio MS suplementado com 2µM de PIC.....	45
Figura 9 -	Calos de origem foliar de plântulas de <i>A. mucosa</i> cultivadas <i>in vivo</i> , após 120 dias de cultivo em meio MS suplementado com 10µM de PIC.....	46
Figura 10 -	Calos de origem hipocotiledonar cultivados em meio WPM suplementado com Picloram (2µM) e cincetina (0,02µM), após 12 meses de cultivo e subcultivos mensais.....	46
Figura 11 -	Cultura de células em suspensão de calos de origem hipocotiledonar de plântulas de <i>A. mucosa</i> obtida por germinação <i>in vivo</i> .....	47
Figura 12 -	Crescimento de culturas de células em suspensão provenientes de calos hipocotiledonares de <i>A. mucosa</i> evidenciando a biomassa em peso fresco (esquerda) e seco (direita).....	48
Figura 13 -	Efeito de extratos de <i>A. mucosa</i> na concentração de 500µg.mL <sup>-1</sup> em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> após de 96h de cultivo a 28°C.....	51
Figura 14 -	Curva de crescimento de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> em diferentes concentrações de extratos CCS após 48h de cultivo.....	51
Figura 15 -	Atividade citotóxica de extratos de <i>A. mucosa</i> (500µg.mL <sup>-1</sup> ) em macrófagos murinos após 48h de cultivo.....	52
Figura 16 -	Efeito de extratos de <i>A. mucosa</i> na concentração de 500µg.mL <sup>-1</sup> em amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i> cultivada por 48h a 37°C e 5% de CO <sub>2</sub> .....	54

Figura 17 - Infecção de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> em macrófagos peritoneais.....	54
Figura 18 - Efeito de extratos de <i>A. mucosa</i> na atividade antibacteriana.....	56

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Tratamentos para calogênese a partir de explantes de plântulas de <i>A. mucosa</i> obtida por germinação sob condições <i>in vivo</i> .....	33
Quadro 2 -	Materiais usados no preparo de extratos e frações de <i>A. mucosa</i> cultivada <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	36
Quadro 3 -	Cepas utilizadas em experimentação do potencial antimicrobiano de <i>A. mucosa</i> .....	39
Tabela 1 -	Resposta calogênica produzida em explantes de <i>A. mucosa</i> obtida por germinação <i>in vivo</i> .....	45
Tabela 2 -	Rendimento da produção de extratos de <i>A. mucosa in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	49
Tabela 3 -	Efeito de extratos de <i>A. mucosa</i> na concentração de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre o crescimento <i>in vitro</i> de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> .....	50
Tabela 4 -	Efeito de extratos de <i>A. mucosa</i> na concentração de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ na infecção de macrófagos por <i>L. braziliensis</i> .....	53
Tabela 5 -	Crescimento bacteriano na presença de extratos de <i>A. mucosa</i> obtida <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> na concentração de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	57

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1 CONSERVAÇÃO E USO DA BIODIVERSIDADE VEGETAL.....	13
1.1 Importância medicinal das plantas.....	14
1.1.1 <u>Substâncias bioativas vegetais e formulação de fármacos</u> .....	16
1.1.2 <u>Biotecnologia vegetal aplicada às plantas medicinais</u> .....	17
1.2 Leishmanioses.....	19
1.3 Bacterioses.....	23
1.4 <i>Annona mucosa</i> (Jacq.).....	24
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Gerais.....	28
2.2 Específicos.....	28
3 METODOLOGIA.....	29
3.1 Material botânico.....	29
3.2 Germinação.....	29
3.2.1 <u>Sob condições <i>in vivo</i></u> .....	29
3.2.2 <u>Sob condições <i>in vitro</i></u> .....	30
3.3 Cultura de calos.....	32
3.4 Cultura de células em suspensão (CCS).....	33
3.5 Produção de extratos.....	34
3.6 Avaliação do potencial medicinal.....	35
3.7 Avaliação da atividade leishmanicida.....	36
3.7.1 <u>Obtenção de <i>Leishmania braziliensis</i> (Thor)</u> .....	36
3.7.2 <u>Ensaio <i>in vitro</i> com promastigota</u> .....	37
3.7.3 <u>Ensaio <i>in vitro</i> com amastigota</u> .....	37
3.8 Avaliação do potencial antimicrobiano.....	38

3.8.1	<u>Isolamento de cepas</u> .....	39
3.8.2	<u>Ensaio em macrodiluição</u> .....	40
4	<b>RESULTADOS</b> .....	42
4.1	<b>Germinação de <i>Annona mucosa</i></b> .....	42
4.2	<b>Calogênese</b> .....	44
4.3	<b>Cultura de células em suspensão</b> .....	47
4.4	<b>Produção de extratos</b> .....	48
4.5	<b>Avaliação do potencial leishmanicida em <i>L. braziliensis</i></b> .....	49
4.5.1	<u>Avaliação em formas promastigotas</u> .....	49
4.5.2	<u>Avaliação em amastigotas intracelulares</u> .....	52
4.6	<b>Avaliação do potencial antimicrobiano</b> .....	55
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	58
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66

## INTRODUÇÃO

### 1 CONSERVAÇÃO E USO DA BIODIVERSIDADE VEGETAL

O conjunto de genótipos de determinada espécie constitui seu germoplasma, um reservatório de genes com potencial uso para a obtenção de produtos essenciais à humanidade, como aqueles de importância no setor de alimentos e de medicamentos (Santos, 2001). Isto é de especial importância quando pensamos na diversidade de plantas que temos em nosso país. No entanto, a biodiversidade vegetal vem sendo reduzida em velocidade alarmante, devido principalmente a fatores como o crescimento desorganizado e a exploração sem controle dos ecossistemas e seus recursos naturais, cabendo a órgãos competentes, principalmente ao Ministério Público, a defesa e adoção de medidas para a conservação do meio ambiente (Honorato *et al.*, 2010).

A biodiversidade vegetal brasileira apresenta uma grande variedade de plantas de importância medicinal em todas as regiões do país. Na região da Caatinga, no nordeste brasileiro, foram reportadas 398 espécies vegetais utilizadas por indígenas e comunidades rurais com propósitos medicinais, sendo 15,3% destas, endêmicas do bioma (Albuquerque *et al.*, 2007). Em apenas três cidades do estado de São Paulo foram inventariados 290 fitofármacos para 628 aplicações medicinais provenientes de 114 espécies vegetais da Mata Atlântica local (Stasi *et al.*, 2002). No Cerrado, as plantas medicinais apresentam um grande potencial anti-infeccioso e constituem um importante componente social e cultural, visto que, algumas vezes, são a única alternativa viável para o tratamento de problemas de saúde pelas populações locais (Toledo *et al.*, 2011). A região amazônica brasileira detém 60% do total da floresta no continente Sul Americano, abrigando a maior biodiversidade vegetal do mundo. Além de sua grande extensão territorial, apresenta uma vasta faixa litorânea rica e diversa. Apenas na faixa costeira da Amazônia no estado do Pará, 229 espécies medicinais foram identificadas, sendo 49% destas nativas (Coelho-Ferreira, 2009).

A conservação do germoplasma vegetal pode se dar de diversas formas. A conservação *in situ* ocorre no *habitat* natural das espécies, a partir da criação de áreas denominadas Unidades de Conservação, que passam a exercer um papel fundamental no processo de proteção ambiental (Hassler, 2005). A maior dificuldade para a implementação deste tipo de estratégia de conservação é a falta de estruturas políticas e institucionais que

garantam o uso adequado e manejo dos territórios, de modo que possam ser atingidas metas a curto ou longo prazo (Heywood & Dulloo, 2005).

Como alternativa, a conservação *ex situ* propõe a manutenção do germoplasma fora do local de origem da espécie, em bancos de germoplasma, que se caracterizam por coleções de campo, bancos de sementes e sistemas de conservação *in vitro* (Souza *et al.*, 2009). Estratégias biotecnológicas, como a cultura de tecidos vegetais, a tecnologia de sementes sintéticas e a criopreservação são as principais ferramentas da conservação *in vitro*, que propicia a manutenção do germoplasma viável a curto, médio e longo prazo, possibilitando seu acesso e exploração para uso com fins em manejo ou melhoramento vegetal (Pence *et al.*, 2002).

### **1.1 Importância medicinal das plantas**

O uso de plantas medicinais para promoção da saúde antecede o registro histórico da origem das civilizações humanas. Informações etnobotânicas do uso de plantas medicinais têm contribuído para a formação de farmacopeias e desenvolvimento de novos fármacos. Estudos de diversos pesquisadores contribuem para a compreensão e divulgação do uso medicinal de plantas, como o clássico trabalho de Hartwell em 1967 que publicou uma série de trabalhos com plantas medicinais, notadamente de espécies com atividade contra o câncer, sendo reportadas mais de 3000 espécies com esta propriedade (Graham *et al.* 2000).

As plantas podem ser utilizadas de diferentes formas, tais como extratos ou mesmo *in natura*, em diversos tipos de tratamento. O uso de gases provenientes da combustão de plantas (“fumaça medicinal”) por comunidades tradicionais dos cinco continentes, por exemplo, sempre foi apreciado para a obtenção de cura e manutenção da saúde. As substâncias ativas presentes na fumaça inalada ou tragada são rapidamente absorvidas e transportadas ao cérebro, sendo utilizadas para tratamento de disfunções pulmonares, neurológicas, dermatológicas e genito-urinárias. A principal vantagem do uso de plantas por estas comunidades é o baixo custo associado à sua utilização, embora na maioria dos casos, não haja comprovação científica da eficiência do tratamento (Mohagheghzadeh *et al.* 2006).

A medicina tradicional utilizando plantas e ingredientes ativos provenientes de suas partes ainda é muito apreciada como primeira opção de tratamento. Em alguns países da Ásia e África, como Índia, China, Quênia e Etiópia, em torno de 80% da população é dependente

deste tipo de prática. Em países desenvolvidos, 70% a 80% da população utilizam-se de alguma forma de medicina alternativa ou complementar. O uso de ervas para tratamento, além de muito popular, é altamente lucrativo, tendo movimentado cerca de cinco bilhões de dólares anuais no oeste europeu entre 2003 e 2004. Na China, a venda de produtos derivados de plantas para fins medicinais em 2005 rendeu 14 bilhões de dólares, enquanto que no Brasil o rendimento para comercialização de plantas medicinais foi de 160 milhões de dólares em 2007 (WHO, 2008).

Efeitos colaterais provocados pela utilização de plantas podem ter passado despercebidos ao longo dos séculos. Deste modo, para sua utilização com fins terapêuticos, as plantas devem atender a critérios de eficácia, segurança e qualidade quanto aos seus subprodutos, apresentarem reprodutibilidade em suas propriedades terapêuticas e constância em sua composição química (Argenta *et al.*, 2011).

No Brasil, a fiscalização e registro de drogas vegetais cabe à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que institui a notificação também de plantas medicinais e suas partes, que são utilizadas de acordo com o conhecimento popular para tratamento de doenças. Deste modo, partes secas de folhas, cascas, raízes e flores de plantas usadas para aliviar a febre, o mal-estar e outros sintomas de doenças de baixa gravidade têm sua produção, distribuição e uso regulados pela agência (Brasil, 2011).

O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2007) visa atingir o objetivo da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que objetiva “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (Brasil, 2006a). Dentre outros objetivos, o Programa insere as plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia ao Sistema Único de Saúde (SUS), em conformidade com as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS (Brasil, 2006b), garantindo o uso racional e seguro das plantas medicinais, valorizando o conhecimento de comunidades tradicionais e indígenas e a biodiversidade brasileira.

Deste modo, a pesquisa sobre plantas medicinais em busca de novas substâncias bioativas faz-se necessária para a elucidação e formulação de novos fármacos acessíveis e eficazes.

### 1.1.1 Substâncias bioativas vegetais e formulação de fármacos

O uso popular de plantas para tratamento de enfermidades, bem como a resistência e diminuição da eficácia de fármacos sintéticos leva à busca e isolamento de substâncias de interesse medicinal. No Brasil, apenas 20% da população consomem 63% dos medicamentos alopáticos disponíveis. A maioria utiliza-se de fontes alternativas de medicação, o que desperta o interesse na pesquisa e projetos financiados por órgãos públicos e privados (Foglio *et al.*, 2006).

Diversas substâncias isoladas de plantas marcaram a história da formulação e comercialização de fármacos pelas indústrias, como, por exemplo, a morfina, extraída de *Papaver somniferum* (Frick *et al.*, 2005), a cafeína, obtida de *Coffea arabica* (Maria & Moreira, 2007) e salicilatos, como o ácido acetilsalicílico (Aspirina<sup>®</sup>, Bayer), extraídos de *Salix alba* (Viegas Jr. *et al.*, 2006). Alcaloides tropânicos com atividades anticolinérgica e espasmolítica como a atropina e a hioscina estão presentes em *Atropa belladonna* (Ashtiania & Sefidkonb, 2011). O enantiômero da hioscina, a escopolamina, que também pode ser obtida de *Duboisia* sp., é largamente comercializada em formulações populares, como o Buscopan<sup>®</sup> (Boehringer Ingelheim).

Os fármacos Vimblastina<sup>®</sup> e Vincristina<sup>®</sup> (Pharmacia Ind. Com. Ltda.) são derivados de alcalóides obtidos de *Catharanthus roseus*, sendo comercializados para tratamento de diversas neoplasias, como leucemia aguda e linfomas malignos. Estas substâncias podem ser diretamente isoladas da espécie, bem como moléculas precursoras, que podem ser utilizadas na síntese de fármacos semissintéticos de ação similar (Choi *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2007). Outro antineoplásico, o paclitaxel extraído de espécies de *Taxus* sp., notadamente em cascas do tronco de *Taxus brevifolia*, é comercializado sob a fórmula de Taxol<sup>®</sup> (Bristol) sendo utilizado para o tratamento de carcinomas metastáticos como de ovário e mama, após a quimioterapia (Sadeghi-Aliabadi *et al.*, 2009).

Substâncias antiprotozoárias como a quinina também são obtidas para formulação de fármacos. Com ação antimalárica, a quinina extraída de *Cinchona* sp. é ainda amplamente utilizada para tratamento de infecções causadas por *Plasmodium falciparum* resistentes a formulações atualmente utilizadas como a cloroquina. Outras substâncias, como as acetogeninas, isoladas de espécies de Annonaceae, apresentam atividades antimalárica, bactericida e leishmanicida em experimentação *in vitro*, e embora ainda não comercializadas, são promissoras no tratamento e formulação de novos fármacos (Misra *et al.*, 2008).

### 1.1.2 Biotecnologia vegetal aplicada às plantas medicinais

Com a utilização de técnicas da Biotecnologia Vegetal, a exploração do potencial medicinal de plantas é viabilizada, com a produção de substâncias em larga escala de forma contínua e sustentável, sem o risco de depleção populacional, garantindo a manutenção das populações e biodiversidade naturais (Lourenço, 2003).

A produção de maneira estável e rentável de metabólitos vegetais de interesse medicinal pode ser conseguida utilizando-se diferentes técnicas biotecnológicas, como a Cultura de Tecidos Vegetais (Almeida, 2007). Dentre tais, a calogênese é um processo que engloba o uso de determinados fitorreguladores, ou seja, hormônios vegetais sintéticos, visando à indução da desdiferenciação, proliferação celular e formação de massas celulares a partir de um órgão ou tecido cultivado *in vitro* em meio nutritivo específico. Os segmentos vegetais, denominados explantes, usados nas respostas *in vitro*, podem ser obtidos de qualquer parte do vegetal (Torres *et al.*, 2000).

As massas celulares denominadas calos, proliferam desordenadamente e podem ser utilizadas para diversos fins. Quando compactos, com alta coesão celular, os calos são utilizados para produção direta de metabólitos. Quando friáveis, com baixa coesão celular, podem ser utilizados também como fonte de inóculo para suspensões celulares em meio de cultura líquido (Andrade, 2002).

A cultura de calos pode ser uma técnica viável para a produção de substâncias com propriedades leishmanicidas, como a acetogenina esquamocina. A partir da combinação de fitorreguladores do grupo das auxinas e citocininas foi possível maximizar a produção de esquamocina em calos da espécie *Annona squamosa*, alcançando concentrações até sete vezes maiores que a concentração natural encontrada em frutos da espécie (Wang *et al.*, 2002).

As suspensões celulares ou culturas de células em suspensão têm sido amplamente utilizadas para a produção de metabólitos *in vitro*, especialmente aqueles de interesse medicinal. Estas culturas podem fornecer quantidades significativas de substâncias bioativas em poucas semanas, o que reflete em produção rápida e econômica (Amaral & Silva, 2003). Metabólitos produzidos por células cultivadas sob agitação podem ser liberados para o meio em cultivo, viabilizando a extração da substância de interesse diretamente do filtrado. Deste modo, as células filtradas podem ser reinoculadas em novo meio de cultivo e estimuladas à nova síntese de compostos, mantendo um processo de produção renovável (Matsumoto, 2006).

Os meios nutritivos utilizados em cultura de tecidos vegetais são formulações que fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controle do desenvolvimento vegetal *in vitro*. Sua constituição básica de água é acompanhada por sacarose como fonte doadora de carboidrato, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e fitorreguladores (Souza & Junghans, 2006). Os macronutrientes englobam os elementos minerais exigidos em maiores quantidades pelos organismos vegetais como, por exemplo, nitrogênio, fósforo e potássio, enquanto os micronutrientes compreendem elementos minerais exigidos em menor quantidade, que normalmente agem como co-fatores em reações enzimáticas como, por exemplo, molibdênio, boro e iodo (Taiz & Zeiger, 2009).

A formulação mais amplamente utilizada para o cultivo vegetal *in vitro*, foi proposta pelos pesquisadores Toshio Murashige e Folke Skoog (1962), passando a ser conhecido como meio MS. Este meio apresenta uma constituição balanceada de nutrientes e vitaminas, sendo considerado um meio padrão para diversas finalidades (Shirin *et al.*, 2007). Contudo, tem sido verificado que as espécies arbóreas necessitam de condições especiais para o cultivo. Deste modo, Lloyd & McCown (1980) desenvolveram uma formulação propícia para o estabelecimento de espécies lenhosas, sendo denominado “Wood Plant Medium” (WPM), que possui alta concentração de nitrogênio, potássio, cálcio e enxofre, suprimindo a demanda exigida por explantes destas espécies.

Os fitorreguladores mais utilizados em cultura de tecidos vegetais são aqueles que possuem ação similar a dos fitormônios naturais do grupo das auxinas e citocininas. Das auxinas mais amplamente utilizadas, destacam-se, o ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolilbutírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram - PIC) e o fitormônio natural ácido 3-indolilacético (AIA). Entre as citocininas mais usadas a 6-furfurilamino-purina (cinetina - KIN), a 6-benzilaminopurina (BAP) e a feniluréia 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia (tidiazuron – TDZ) que possui ação citocinínica. Para tratamentos de germinação de sementes, é utilizado principalmente o fitormônio natural ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) para quebra da dormência e ativação da atividade enzimática seminal (Caldas *et al.*, 1998).

A cultura de tecidos vegetais é uma alternativa ao uso predatório de espécies para análise de seu potencial medicinal ou para extração com fins comerciais. Tendo em vista que muitas vezes a produção de metabólitos secundários vegetais com potencial aplicação medicinal pode ser baixa, o cultivo *in vitro* possibilita otimizar esta produção, fornecendo culturas altamente produtoras e geneticamente estáveis, o que viabiliza o estudo e a comercialização em grande escala.

Quando espécies de interesse medicinal são arbóreas, seu uso para fins medicinais torna-se limitado devido ao longo ciclo de vida e tempo para produção de determinado metabólito, além de dificuldades inerentes ao cultivo e manipulação. Quando cultivadas *in vitro*, são mais exigentes quanto à concentração dos nutrientes utilizados no meio de cultura, principalmente nitrogênio, sendo também necessária a implementação de protocolos eficazes de desinfestação e redução da oxidação característica de seus explantes, que ocasionam grande perda de material e dificultam o seu estabelecimento *in vitro* (Assis & Teixeira, 1998).

Deste modo, o desenvolvimento de protocolos eficientes para produção de material *in vitro* a partir de espécies arbóreas é de extremo valor para diminuir o tempo de obtenção e otimizar a produção de metabólitos com vistas à avaliação de atividades biológicas e formulação de novos fármacos.

## 1.2 Leishmanioses

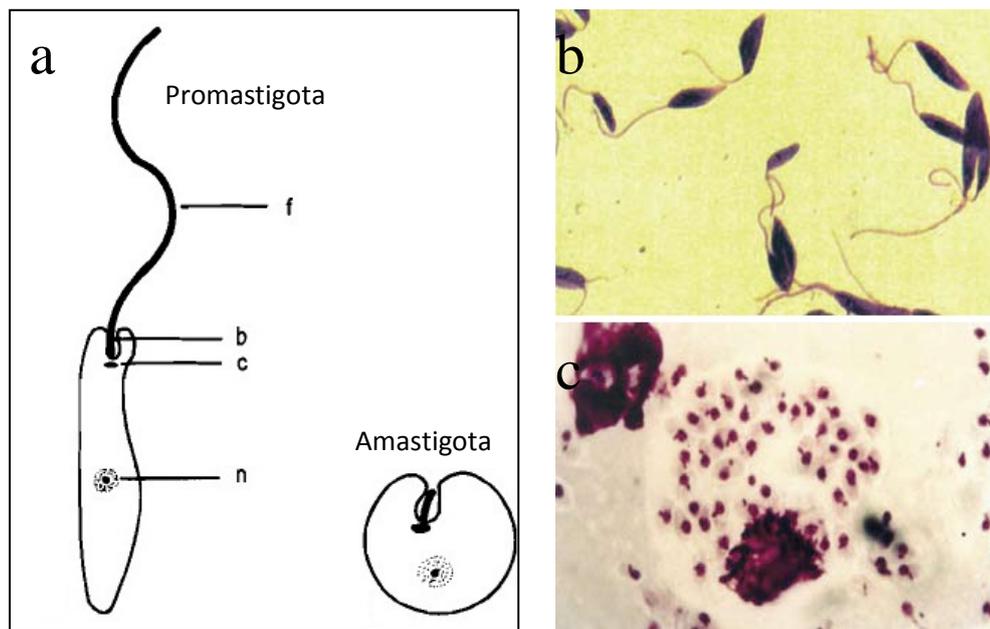
As leishmanioses são doenças crônicas que se manifestam de forma tegumentar ou visceral, sendo um problema de saúde pública mundial e considerada uma doença negligenciada com poucas opções de tratamento (WHO, 2011), acometendo cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países (Murray *et al.*, 2005). A leishmaniose é endêmica em alguns países tropicais e subtropicais como Índia, Bangladesh, Sudão e também o Brasil, países que juntos correspondem a 90% dos casos da doença em todo o mundo (Basano & Camargo, 2004). No Brasil, é uma das mais importantes endemias, sendo registrada uma média anual de mais de 25 mil casos (Ministério da Saúde, 2007).

O agente etiológico das leishmanioses é o protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, um parasita obrigatório intracelular que infecta principalmente macrófagos. A transmissão do parasito ocorre pela picada de insetos infectados da subfamília Phlebotominae (flebotomídeos), conhecidos popularmente como mosquitos-palha. As leishmanias fazem parte da família Trypanosomatidae, que compreende também o gênero de importância clínica *Trypanosoma*. Ambos os gêneros possuem mais de um hospedeiro, adotando assim diferentes formas celulares ao longo de seu ciclo de vida. (Rey, 2009).

Os morfotipos celulares adotados em diferentes estágios variam quanto à sua forma, posição do flagelo (organela de movimentação) e posição do cinetoplasto, região de DNA mitocondrial condensado. As leishmanias apresentam dois morfotipos (**figura 1a**): a forma

promastigotas (**figura 1b**), de morfologia alongada, com cinetoplasto e flagelo alongado em posição anterior ao núcleo, é a forma presente no tubo digestório dos insetos vetores; a forma amastigota (**figura 1c**), apresentando-se como uma célula arredondada ou oval com flagelo curto que não se exterioriza, é a forma intracelular presente em vertebrados, instalando-se principalmente no interior de macrófagos (Neves, 2004).

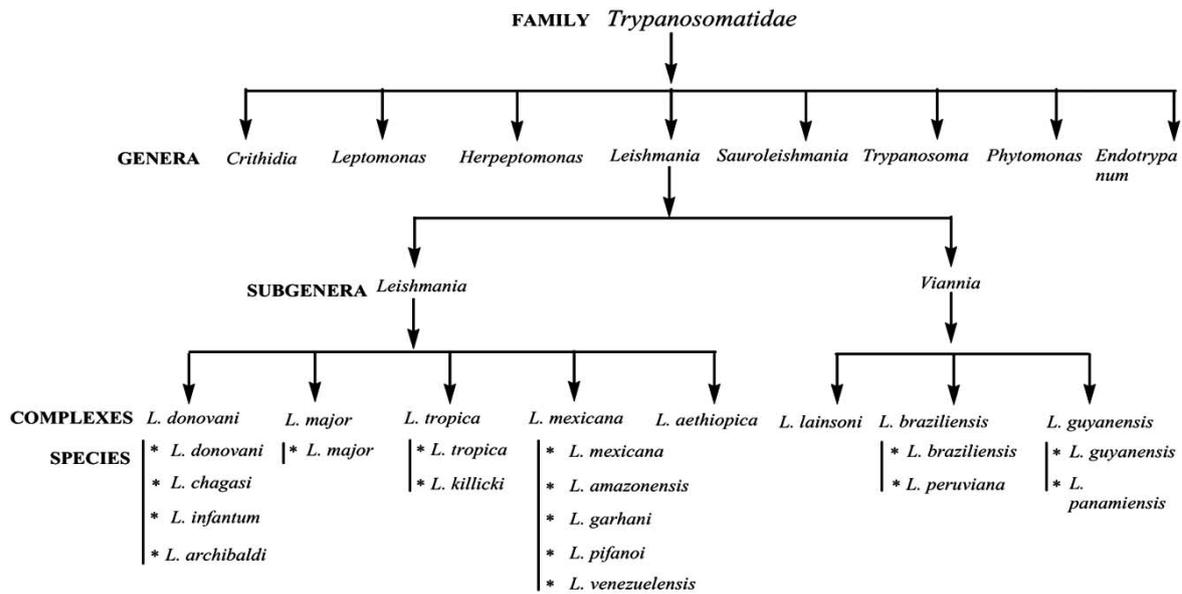
Figura 1- Morfotipos de *Leishmania*



Legenda: (a) Esquema das formas promastigota e amastigota. Forma promastigota à esquerda e suas partes (n-núcleo; c-cinetoplasto; b-bolsa flagelar; f-flagelo); (b) Forma promastigotas livre; (c) Forma amastigota intracelular.

Fonte: NEVES, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

O gênero *Leishmania* compreende os subgêneros *Leishmania* (*L.*) e *Viannia* (*V.*) (**figura 2**). O primeiro engloba, entre outros, os complexos de *L. donovani*, que compreende as espécies *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* e o complexo *L. mexicana*, que compreende *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*. No subgênero *Viannia* está inserido o complexo de *L. braziliensis*, que representa entre outras, a espécie *L. (V.) braziliensis*, também causadora da leishmaniose tegumentar americana (Bañuls *et al.*, 2007).

Figura 2 - Taxonomia de *Leishmania*.

Fonte: MISHRA *et al.*, 2009.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), classicamente se manifesta pelas formas cutânea (LC), causada por diferentes espécies dermatrópicas; pela forma difusa, causada principalmente pela *L. amazonenses* e pela forma mucosa (LM), causada principalmente por *L. braziliensis* (Silveira *et al.*, 2008). As lesões típicas da LC apresentam-se como ulcerações indolores na pele exposta, de formato arredondado ou ovalado, base eritematosa, com bordas bem-delimitadas e granulações grosseiras. De 3 a 5% dos casos de LC evoluem para LM, caracterizando-se por lesões destrutivas nas mucosas das vias aéreas superiores (Ministério da Saúde, 2000).

O ciclo de transmissão da LTA no Brasil envolve reservatórios silvestres, principalmente roedores, vetores do gênero *Lutzomyia* e hospedeiros como o homem e animais domésticos. A espécie *L. braziliensis* é o parasito de maior importância epidemiológica não só no Brasil, mas também em toda a América Latina. São reconhecidos três padrões epidemiológicos para a LTA: o silvestre, ocorrendo a transmissão em área de vegetação primária; o ocupacional, associado a exploração desordenada e derrubada de mata e o padrão rural e periurbano em áreas de colonização, relacionado ao processo migratório, colonização de encostas e aglomerados em centros urbanos, associados a matas secundárias ou residuais (Ministério da Saúde, 2007).

Além dos reservatórios silvestres, animais domésticos podem ser infectados pela picada do flebótomo tornando-se reservatórios e fontes de infecção para vetores, sendo o cão o principal alvo nas estratégias de controle da doença (Gontijo & Melo, 2004). É comum a

ocorrência de leishmaniose tegumentar americana em cães de áreas endêmicas em algumas regiões do Brasil, como o Rio de Janeiro (Madeira *et al.*, 2003) e o Paraná (Pittner *et al.*, 2009), onde os animais apresentam lesões similares às desenvolvidas nos seres humanos. Na Bahia, 95% dos casos de leishmaniose humana são causados por *L. braziliensis*, onde a infecção de crianças até os cinco anos de idade está relacionada à transmissão vetorial domiciliar ou peridomiciliar (Ampuero *et al.*, 2006).

Atualmente, o tratamento das leishmanioses consiste basicamente na administração de antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de *N*-metil-glucamina (Glucantime<sup>®</sup> - Sanofi-Aventis Ltda.) e o estilgluconato sódico (Pentostam<sup>®</sup> - GlaxoSmithKline). São utilizados como primeira escolha, tendo por objetivo obter a cura clínica da doença (Maltezou, 2010).

Como segunda linha de tratamento, são utilizados medicamentos não-antimoniais, como a pantamidina (Pentacarynat<sup>®</sup> – Bayer) e a anfotericina B (Anfoterin B<sup>®</sup> – Cristália). Bem como os antimoniais, estes fármacos apresentam efeitos adversos, como hipotensão, nefrotoxicidade, leucopenia, anorexia e hiperglicemia. Do mesmo modo, também requerem administração parenteral, por injeção ou infusão (Gil *et al.*, 2007). O primeiro fármaco efetivo por administração oral para o tratamento de Leishmaniose cutânea é a Miltefosina (Machado & Penna, 2012). Este fármaco apresenta mais de um sítio molecular de ação, atuando em processos como a imunomodulação da célula hospedeira e a apoptose da leishmania intracelular (Dorlo *et al.*, 2012). A administração oral de miltefosina em camundongos foi efetiva no tratamento de leishmanioses tanto do novo mundo, como *L. amazonensis* (Godinho *et al.*, 2012), quanto do velho mundo, *L. major* (Eissa *et al.*, 2012), sendo eficiente na redução da densidade de parasitos e lesão.

No entanto, recentemente tem-se registrado um aumento da resistência de diversas formas de *Leishmania* a estas linhas de tratamento, incentivando a busca por novos fármacos leishmanicidas eficazes contra a doença (Polonio & Efferth, 2008). Neste sentido, extratos vegetais têm demonstrado atividade contra as diversas espécies do parasito, a partir da ação de substâncias do metabolismo secundário vegetal (Sundar & Chatterjee, 2006).

Extratos de plantas medicinais de uso popular no tratamento das leishmanioses são fontes promissoras de substâncias bioativas para formulação de novos fármacos (Carvalho & Ferreira, 2001). Mais de 230 moléculas com atividade leishmanicida já foram isoladas de espécies de vegetais de diversos grupos taxonômicos. A distribuição ampla destas moléculas compreende classes como alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenos, lactonas entre outros (Rocha *et al.*, 2005).

Diversos grupos de alcaloides isolados de espécies de uso popular, incluindo da família Annonaceae, apresentam atividade leishmanicida sobre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani* em testes *in vitro*, destacando-se os alcaloides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, esteroidais e alcaloides diterpênicos (Mishra *et al.*, 2009). A atividade medicinal de alcaloides estende-se também a outros protozoários, como *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas e *Plasmodium falciparum*, causador da malária, sendo esta classe de substâncias, de amplo espectro antiparasitário (Osorio *et al.*, 2006).

### 1.3 Bacterioses

As bactérias encontram-se amplamente distribuídas no mundo, em uma variedade de locais, estando intrinsecamente ligadas à vida dos organismos. A maioria delas é inofensiva ao homem, sendo encontradas revestindo a pele, mucosa e trato intestinal, integrando a microbiota normal. Assim, podem ser benéficas ao seu hospedeiro a partir da proteção contra patógenos e doenças, limitando a colonização de bactérias nocivas (Santos, 2004).

São seres procariontes com curto tempo de geração, de poucos minutos ou horas, o que propicia a formação de colônias bacterianas. A maioria das bactérias pode ser dividida em dois grupos de acordo com a classificação proposta por Hans Christian Gram. As Gram-positivas possuem parede celular única e com espessa camada de peptidoglicanos, sendo corada em púrpura ou azul quando fixadas em cristal violeta. Já as Gram-negativas não são coradas pelo método de Gram, devido à presença de uma parede celular delgada e uma segunda membrana lipídica, que é dissolvida pelo álcool, liberando o corante (Madigan *et al.*, 2010).

Substâncias que possuem a capacidade de inibir o crescimento bacteriano são denominadas agentes antimicrobianos. Podem ser classificados como agentes químicos, como sais e ácidos, ou naturais, como substâncias produzidas por vegetais ou bacteriocinas, que são produzidas por microorganismos para inibição do crescimento de competidores (FIB, 2010).

A resistência aos antimicrobianos é a capacidade intrínseca ou adquirida dos microrganismos de sobreviver na presença de antibióticos. O processo envolve mecanismos de inativação ou modificação da droga, alteração em sítios de ligação, alteração de via

metabólica e redução da estrutura-alvo ou da acumulação da droga no interior da célula bacteriana (Ogbodo *et al.*, 2011).

O amplo uso indiscriminado de antibióticos para tratamento de infecções levou ao aumento de cepas bacterianas resistentes a diferentes drogas (multirresistência), sendo estas indicadas como multirresistentes. Apesar de presentes na microbiota normal humana, bactérias oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes podem representar um sério risco de infecção no ambiente hospitalar, sendo transportadas de paciente a paciente por diversas vias (Bayat *et al.*, 2011). Tratando-se exclusivamente da tuberculose, a doença causada por cepas multirresistentes a drogas já foi registrada em 64 países até o momento, ocorrendo cerca de 440.000 novos casos anualmente, causando ao menos 150.000 mortes (WHO, 2011).

O Brasil apresenta grande número de bactérias resistentes entre a maioria de seus patógenos-chave, em comparação a países da Europa e Estados Unidos. Dentre estes, destacam-se *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* e *S. aureus*, tendo este último taxas de 60% de resistência, relacionada a clones endêmicos no território nacional (Rossi, 2011).

Com a diminuição da eficácia dos antibióticos no controle de infecções bacterianas, indústrias farmacêuticas e organizações de saúde buscam cada vez mais alternativas ao uso de substâncias sintéticas para tratamento. Considerando que as plantas são a maior fonte de substâncias bioquímicas e farmacêuticas do planeta, constituem uma considerável fonte de substâncias antimicrobianas naturais (Abdallah, 2011).

O metabolismo secundário vegetal fornece diversas substâncias antimicrobianas ativas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas. Dentre estas substâncias, destacam-se compostos nitrogenados, como alcalóides, glicosinolatos e glicosídeos cianogênicos, e não nitrogenados, como terpenos, saponinas e flavonoides, avaliados em ensaios *in vitro* e *in vivo*, podendo ser explorados para formulação de novos fármacos (Paiva *et al.*, 2010).

#### **1.4 *Annona mucosa* (Jacq.)**

Com uma distribuição pantropical, a família Annonaceae possui diversas espécies arbóreas conhecidas pelo seu potencial frutífero e também pelas propriedades medicinais,

englobando em torno de 250 espécies (Joly, 1983). Dentre estas se destacam as espécies comerciais *Annona coriacea* (fruta-do-conde), *Annona squamosa* (fruta-pinha) e *Annona muricata* (graviola).

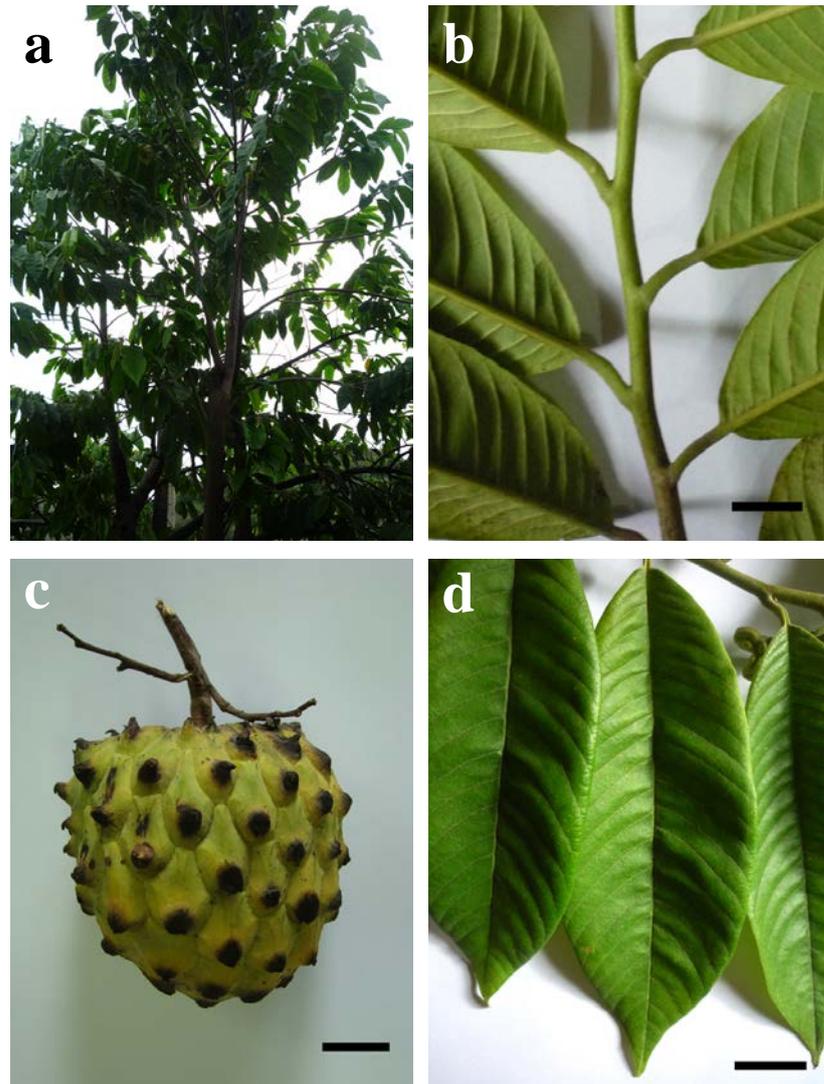
*Annona mucosa* (Jacq.), anteriormente chamada pela sua sinonímia *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. (Rainer, 2007), conhecida popularmente como biribá (**figura 3**), pertence à família Annonaceae e possui grande valor econômico associado às suas características medicinais e alimentícias (Lorenzi, 2002).

Seus frutos, quando maduros, apresentam-se como um sincarpo bacáceo, de coloração amarelada e polpa adocicada. As sementes apresentam endosperma ruminado e um tampão de constituição lenhosa e formato triangular, encontrado na região micropilar, exercendo proteção ao embrião rudimentar (Albarello *et al.*, 2002).

A germinação é afetada pela dormência decorrente da presença do tegumento rígido, o que reduz drasticamente a ocorrência do processo germinativo de forma rápida e uniforme. No entanto, tratamentos como a escarificação e embebição em água têm sido empregados de forma eficiente na promoção da germinação (Ferreira *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009a).

Em relação ao desenvolvimento pós-seminal, a emissão da radícula ocorre em torno de 20-25 dias, com crescimento concomitante ao hipocótilo (Albarello *et al.*, 2002). As características histológicas das plântulas obtidas *in vivo* mostram-se geneticamente fixadas, independentemente do estágio de desenvolvimento ou tipo de cultivo, possuindo as plantas cultivadas *in vitro*, por micropropagação, caracteres que possibilitam sua sobrevivência após a transferência para condições *ex vitro* (Albarello *et al.*, 2001).

Figura 3- Aspectos morfológicos de *Annona mucosa*.



Legenda: (a)- Exemplar a campo no bairro Tanque, Rio de Janeiro; (b)- detalhe da filotaxia alterna dística; (c)- fruto sincárpico bacáceo ; (d)- padrão de venação broquidódroma das folhas. Nota: Barras = 2 cm.

A família Annonaceae apresenta diversos grupos de metabólitos com atividade medicinal. Dentre tais, destacam-se acetogeninas, lignanas e alcaloides (Figueiredo *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 2002).

Acetogeninas, constituintes derivados do metabolismo de policetídeos, estão presentes caracteristicamente em folhas, casca, caule, flores, raízes, frutos e sementes de espécies da família (Alali *et al.*, 1999). Responsáveis por uma grande gama de atividades biológicas, estas substâncias destacam-se pelo seu potencial antiparasitário, especialmente a atividade leishmanicida contra a forma promastigota de diversas espécies do gênero e atividade tripanocida em formas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* (Waechter *et al.*, 1998).

O efeito citotóxico das acetogeninas deve-se diretamente ao bloqueio da cadeia respiratória pela inativação da enzima NADH-desidrogenase (Esposti *et al.*, 1994), apresentando-se como substâncias promissoras também no tratamento de diversos tipos de cânceres, como adenocarcinomas de colo de útero e próstata e boa resposta citotóxica em linhagens celulares de carcinomas pancreático, de mama, pulmonar e renal (Shi *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997; Kim & Park, 2002).

Alcaloides de Annonaceae têm sido isolados e avaliados quanto ao potencial medicinal, apresentando atividades de modulação antibacteriana (Rinaldi, 2007), antiplasmodial em *Plasmodium falciparum* (Osorio *et al.*, 2006), leishmanicida em *Leishmania chagasi* (Vila Nova, 2008) e citotóxica em linhagem tumoral (Costa *et al.*, 2012).

Diferentes alcaloides já foram isolados de *A. mucosa* (Chen *et al.*, 1996, Santos *et al.*, 2009b) e sintetizados (Nimgirawath, 2006), como, por exemplo, a substância Romucosina I, que pode ser identificada pela técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear a partir de extratos metanólicos de caules da espécie (Kuo *et al.*, 2004).

Na área de Biotecnologia Vegetal, diversos estudos vêm sendo realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Departamento de Biologia Vegetal/UERJ) visando à conservação do germoplasma e produção de metabólitos de interesse medicinal em *A. mucosa*.

A produção de diferentes lignanas de plântulas obtidas por germinação *in vivo* e *in vitro* foi registrada por Figueiredo e colaboradores (1999), sendo a micropropagação da espécie estabelecida (Figueiredo *et al.*, 2001), com avaliação das características anatômicas e histoquímicas (Albarelo *et al.*, 1996; Albarelo *et al.*, 2001), que mostraram caracteres fixados geneticamente, de valor diagnóstico.

Em relação ao cultivo de tecidos não organizados, foram estabelecidas as culturas de calos produtores de lignanas, a partir de plântulas germinadas *in vivo* e de células em suspensão (Figueiredo *et al.*, 2000; 2003). Tais sistemas têm sido amplamente empregados com vistas à produção *in vitro* de metabólitos de interesse.

Estudos visando à otimização da cultura de calos friáveis de *A. mucosa* (Barboza, 2010) foram favoráveis à produção de maior biomassa e friabilidade em relação ao protocolo previamente estabelecido (Figueiredo *et al.*, 2003). Deste modo, faz-se importante a avaliação do potencial medicinal do material obtido nesses sistemas, bem como a elucidação de seu perfil fitoquímico e maximização da produção.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar o potencial leishmanicida e antibacteriano de *Annona mucosa* a partir de extratos de calos e culturas de células em suspensão, comparando com o material cultivado *in vivo*.

### 2.2 Específicos

- ❖ Testar diferentes tratamentos na germinação *in vitro* como fonte de explantes;
- ❖ Avaliar o uso de diferentes citocininas associadas à auxina picloram na produção e friabilidade de calos;
- ❖ Estabelecer culturas de células em suspensão;
- ❖ Avaliar o potencial leishmanicida de extratos vegetais de origem *in vivo* e *in vitro* em formas promastigota e amastigota de *L. braziliensis*;
- ❖ Avaliar o potencial de inibição de extratos vegetais de origem *in vivo* e *in vitro* no crescimento de diferentes cepas bacterianas.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Material botânico

Para os experimentos de germinação *in vivo* e *in vitro* e também para o preparo de extratos foram utilizados exemplares de *Annona mucosa* cultivados nas cidades Ananindeuá/PA e Rio de Janeiro/RJ (**figura 3**), com depósito no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob os números de registro HRJ 11.478 e HRJ 11.747, respectivamente.

Da região norte do país (Pará), foram obtidas sementes para germinação e posterior uso do material obtido nos estudos de cultivo *in vitro*. Da região sudeste, foi coletado material vegetativo de um exemplar arbóreo cultivado a campo, em propriedade particular no bairro Jacarepaguá (RJ) que foi selecionado para representar o material *in vivo*, com vistas à comparação com o material produzido biotecnologicamente. Este material foi usado para produção de extratos, não sendo obtidas sementes para obtenção de plântulas *in vitro*.

Após o estabelecimento de protocolo para o processo germinativo *in vitro*, sementes obtidas das regiões de Magé/RJ (HRJ 11.773) e Macapá/AP (HRJ 11.750) também foram utilizadas para repetição e comprovação do protocolo.

Os experimentos relativos aos estudos de germinação, cultura de tecidos e preparo de extratos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), integrante do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (NBV/IBRAG), sob a supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Norma Albarello.

### 3.2 Germinação

#### 3.2.1 Sob condições *in vivo*

Como fonte doadora de explantes para o cultivo *in vitro* foram utilizadas plântulas com dois meses de idade obtidas por germinação *in vivo*. Para a germinação, foram utilizadas sementes lavadas em água corrente com detergente comercial, posteriormente embebidas em água destilada à temperatura ambiente por 48 horas. A semeadura foi feita em sementeiras de

isopor, com uma semente por quadrado de 3 cm de lado, contendo como substrato terra preta adubada. As sementeiras foram mantidas em telado sob temperatura ambiente ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade natural, com sistema de rega diária, duas vezes ao dia (Figueiredo *et al.*, 1999).

### 3.2.2 Sob condições *in vitro*

No intuito de estabelecer a germinação *in vitro* da espécie, foram empregados diversos tratamentos para desinfestação e inoculação *in vitro*, visando à quebra da dormência e ajuste de fatores abióticos para o estabelecimento das plântulas.

A desinfestação das sementes (**figuras 4a e 4b**) foi feita por lavagem em água corrente e detergente comercial, seguida de imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) de 1 a 4% por 10-40min e três lavagens para remoção do NaOCl. Após a desinfestação, as sementes com ou sem o tegumento foram postas à embebição por 48h em água destilada estéril ou solução de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) à temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  ou  $5^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  para quebra da dormência, característica de diversas espécies da família.

Como fonte de nutrientes foi utilizada a formulação salínica e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescida de  $30\text{g.L}^{-1}$  de sacarose como fonte doadora de carbono, sendo utilizado na forma líquida ou solidificada com  $8\text{g.L}^{-1}$  de ágar (Merck®).

A cultura em meio MS sólido (**figura 4c**) foi mantida em tubos de ensaio contendo 20mL por tubo, vedados com filme plástico, utilizando-se 10 sementes por tratamento. O meio foi preparado com ou sem a adição de fitorreguladores, sendo acrescido de  $10\mu\text{M}$  de solução de polivinilpirrolidona (PVP) para adsorção de exsudados das sementes. Para o meio sólido com fitorreguladores, foi utilizado  $\text{GA}_3$  nas concentrações de 60 e  $120\mu\text{M}$ , associado ou não a  $5\mu\text{M}$  dos fitorreguladores benzilaminopurina (BAP) ou ácido naftalenoacético (ANA).

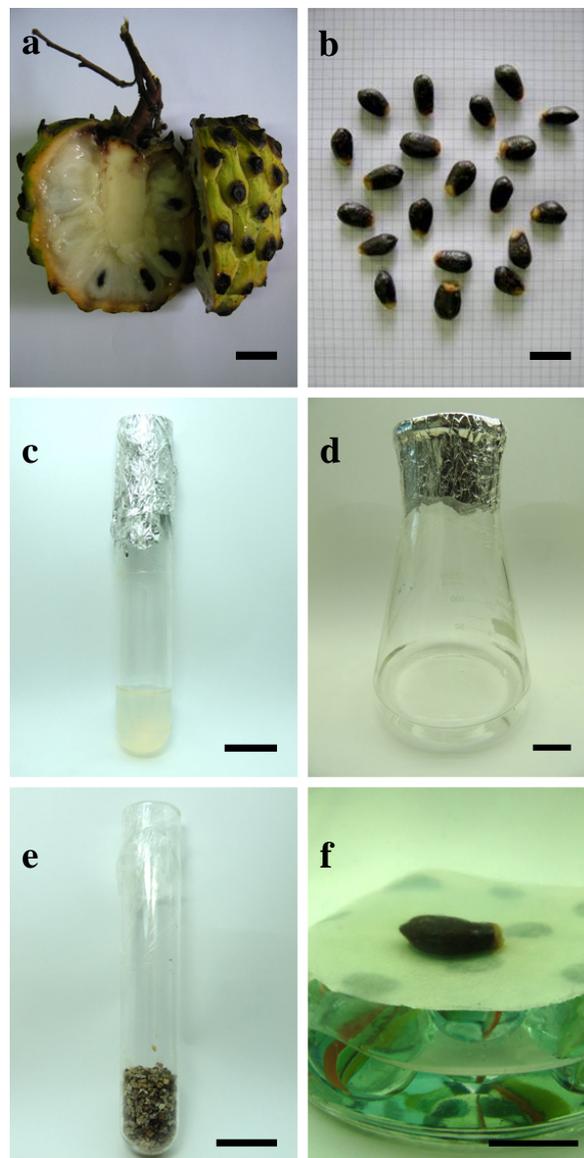
O meio MS líquido foi preparado sem a adição de fitorreguladores, com os frascos mantidos em agitador orbital, papel de filtro ou vermiculita estéril (**figura 4e**), sendo utilizadas 20 sementes por tratamento. Em agitador orbital (114rpm) foram mantidas culturas em frascos do tipo erlenmeyer de 125mL, contendo 30mL de meio e 5 sementes por frasco, vedados com papel filme. Para o cultivo em papel de filtro, foi utilizado 15mL de meio MS líquido em frascos de vidro vedados com tampa de polipropileno. Esferas de vidro de 2cm de diâmetro foram adicionadas ao fundo de modo a formar um suporte para membrana de papel

filtro Whatman<sup>®</sup>, mantida na horizontal sobre as esferas e com expansões laterais que entram em contato com o meio, permitindo a sua embebição.

Para o cultivo em substrato vermiculita, foram utilizados tubos de ensaio com 1,5g de vermiculita estéril embebida em 5mL de meio MS líquido. Foi adicionada uma semente por tubo, vedado com filme plástico. Para evitar a dessecação do material, foi estabelecida rega a cada 30 dias de cultivo com 5mL de meio MS líquido.

Em todos os tratamentos as culturas sólidas e líquidas foram mantidos sob fotoperíodo de 16h ou no escuro à temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  ou  $30^{\circ}\text{C}$ .

Figura 4- Material botânico e substratos para a germinação *in vitro* de *A. mucosa*.



Legenda: (a)- fruto aberto exibindo a disposição de sementes no endocarpo mucilaginoso; (b)- sementes obtidas de frutos maduros; (c)- meio MS sólido em tubo de ensaio; (d)- meio MS líquido em erlenmeyer; (e)- vermiculita embebida em meio MS líquido, em tubo de ensaio; (f)- ponte de papel em frascos de vidro (semente sobre o papel). Nota: Barras = 2cm.

### 3.3 Cultura de calos

Os explantes para produção *in vitro* de calos foram obtidos a partir de segmentos de lâmina foliar, hipocótilo e raízes, provenientes de plântulas de dois meses de idade germinadas *in vivo*. A desinfestação e condições de cultivo foram adaptados de trabalho realizado previamente com a espécie, estabelecido por Figueiredo e colaboradores (2000). O material foi desinfestado a partir da lavagem em água corrente, com detergente comercial associado a imersão sob agitação em NaOCl acrescido do tensoativo Tween 80<sup>®</sup> (polioxietilenosorbitano monolito) a 0,05% v/v. Para hipocótilos e raízes foi utilizado NaOCl a 4%, por 30 minutos, enquanto que para os segmentos foliares a concentração utilizada foi de 2%, por 15 minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os segmentos foram lavados três vezes em água destilada estéril, excisados e inoculados em diferentes meios de cultivo.

Foram utilizadas duas diferentes formulações salínicas de meios básicos para cultivo vegetal *in vitro* visando à indução de calos friáveis, conforme trabalho previamente realizado (Barboza, 2010): o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) para o cultivo de explantes foliares e o meio WPM (Lloyd & McCown, 1980) para explantes hipocotiledonares. Ambos os meios foram preparados com 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificados ou não com 8g.L<sup>-1</sup> de ágar. Os meios de cultura foram suplementados com as citocininas BAP, KIN e TDZ e uma auxina, PIC, visando à otimização do processo de calogênese. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e a esterilização se deu a 121°C com pressão de 104 KPa em autoclave por 15 minutos.

Para a cultura a partir de hipocótilos, foram excisados explantes de 0,5cm de comprimento, inoculados em posição vertical no meio de cultura. Para estes explantes foi utilizado o meio WPM (**quadro 1**) suplementado com 2μM de ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram - PIC) associado ou não a 0,02μM das citocininas cinetina (KIN), benzilaminopurina (BAP) ou tidiazuron (TDZ).

Para as culturas a partir de folhas foram utilizados explantes retangulares de 0,8x0,5cm obtidos a partir da região da nervura mediana, descartando-se as bordas, sendo inoculados com a face abaxial em contato com a superfície do meio. Estes foram inoculados em meio MS (**quadro 1**) suplementado com picloram na concentração de 10μM associado ou não a 0,1μM de KIN, BAP ou TDZ.

Explantes radiculares de 0,5 cm foram obtidos a partir da raiz principal, sendo descartadas as laterais, e inoculados em posição vertical ou horizontal em meio MS

suplementado com 5, 10 ou 20 $\mu$ M de ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) ou picloram.

Para as diferentes partes das plântulas foram utilizados 20 explantes por tratamento, em meio de cultura líquido ou solidificado com ágar e mantidos no escuro em sala de crescimento a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . As culturas em meio líquido foram realizadas em frascos do tipo Erlenmeyer de 125mL contendo 30mL de meio de cultivo e vedados com tampa de alumínio e papel filme. Para o cultivo em meio solidificado com ágar, foram utilizados frascos de vidro de 55 mm x 50 mm para inoculação. Após o primeiro mês de cultivo, o material foi transferido para meio de mesma composição em frascos de vidro de 65 mm x 85 mm. Em ambos, os frascos foram vedados com tampas de polipropileno.

O material foi subcultivado a cada 30 dias mantendo a condição de cultivo no escuro e a avaliação do crescimento da massa calogênica se deu após 90 dias de cultivo, a partir da aferição dos pesos de massa fresca e seca, obtida a partir da secagem do material em estufa a  $40^\circ\text{C}$  por 24h.

Quadro 1 - Tratamentos para calogênese a partir de explantes de plântulas de *A. mucosa* obtida por germinação sob condições *in vivo*.

Explante	Meio	Reguladores de crescimento ( $\mu\text{M}$ )			
		PIC	KIN	BAP	TDZ
Hipocótilo	W0	0	0	0	0
	W1	2	0,02		
	W2	2		0,02	
	W3	2			0,02
Folha	M0	0	0	0	0
	M1	10	0,1		
	M2	10		0,1	
	M3	10			0,1

Legenda: W = Meio básico WPM (LLOYD ; MCCOWN, 1980), M = Meio básico MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962)

### 3.4 Cultura de células em suspensão (CCS)

A fim de estimular a proliferação de células e possível secreção de substâncias de interesse com potencial leishmanicida e antibacteriano, foram utilizados meios de cultura

líquidos para cultivo dos calos previamente obtidos, seguindo protocolo estabelecido por Figueiredo e colaboradores (2000), com modificações.

Para cada tratamento foram utilizados inóculos de 2g obtidos de calos com 12 semanas de cultivo. Os calos foram manipulados em câmara de fluxo laminar, sendo feito um macerado em placa de Petri, com o auxílio de uma espátula. Em seguida foram colocadas porções das massas formadas em frascos de vidro estéreis (descontados seus pesos) para a pesagem do material em balança de precisão.

Os inóculos foram então adicionados em frascos do tipo Erlenmeyer de 125mL, contendo 25mL de meio de cultura líquido de mesma composição na qual o calo foi obtido, vedados com tampa de alumínio e filme plástico. As culturas foram mantidas no escuro em sala de cultura a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  sob agitação constante em mesa agitadora orbital (*shaker*) a 114rpm por cinco semanas.

Ao final de cinco semanas de cultivo foi avaliada a capacidade de crescimento do inóculo a partir da análise dos pesos fresco e seco, obtidos após secagem em estufa a  $45^{\circ}\text{C}$  por 24h. Em fluxo laminar, as suspensões celulares foram submetidas a um sistema de filtração a vácuo. Em seguida, as células foram adicionadas em frascos estéreis e levadas à balança de precisão para registro do peso fresco, evidenciando a quantidade de matéria acumulada após um mês de cultivo em relação ao peso do inóculo inicial.

Uma curva de crescimento celular foi estabelecida a partir da aferição da biomassa ao longo de um mês de cultivo. A cada dois dias a partir da inoculação, três frascos de cultivo selecionados aleatoriamente foram filtrados tendo aferidas suas massas fresca e seca, após secagem em estufa por 24h a  $45^{\circ}\text{C}$ . A avaliação se estendeu até a sétima semana de cultivo.

### **3.5 Produção de extratos**

Folhas e caules de exemplares cultivados *in vivo* e calos e culturas de células em suspensão obtidos pelo melhor tratamento a partir de explantes de folhas e hipocótilos foram secos em estufa a  $40^{\circ}\text{C}$ , macerados mecanicamente e adicionados em metanol (MeOH) para produção do extrato bruto. A mistura foi mantida no escuro à temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  em agitação constante de 114 rpm em agitador orbital por 14 dias. Após este período o material foi filtrado em filtro de papel Wathman<sup>®</sup> n° 1, o solvente foi removido em rotaevaporador

(Marconi mod. MA-120) e o resíduo de solvente no extrato foi evaporado em câmara de dessecação contendo sílica.

Os extratos metanólicos brutos de caule e folhas da árvore e das culturas de células em suspensão foram submetidos ao processo de fracionamento. Para este processo, 500mg do extrato bruto seco foram ressuspensos em 50mL de MeOH e transferido para funil de decantação. Em seguida, foram adicionados 50mL de hexano ( $C_6H_{14}$ ) sobre a fase metanólica. Após a visível separação das fases a fração hexânica (sobre a metanólica) foi removida e novamente adicionou-se hexano sobre a fração metanólica, sendo este processo realizado por três vezes. À fração residual metanólica foi adicionado 50mL de cloreto de metileno (Diclorometano -  $CH_2Cl_2$ ), sendo o processo realizado em três vezes seguindo o procedimento para o solvente anterior.

Ao final do processo foram obtidas as frações hexânica, em diclorometano e residual metanólica, que tiveram os solventes removidos por procedimento semelhante ao utilizado no preparo dos extratos brutos. A fração residual metanólica não foi considerada no estudo devido ao baixo rendimento, inferior ao necessário para as avaliações.

### 3.6 Avaliação do potencial medicinal

Para avaliação de atividade biológica, os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se um estoque de concentração igual a  $250mg.mL^{-1}$ . Para avaliação do potencial leishmanicida,  $40\mu L$  do estoque foi solubilizado em  $960\mu L$  de meio de cultura DMEM para produção de um estoque intermediário para trabalho na concentração de  $10mg.mL^{-1}$ .

Para os testes *in vitro* e *in vivo* foram utilizados extratos metanólicos e frações hexânica e em diclorometano (**quadro 2**). Foram utilizados extratos metanólicos brutos e frações das folhas (F) e caule (C) de *A. mucosa* cultivada *in vivo* e do material cultivado *in vitro*, foram avaliados extratos brutos metanólicos de calos provenientes de folhas (CF), hipocótilos (CH) e culturas de células em suspensão obtidas a partir de calos hipocotiledonares (CCS). Devido à rapidez de crescimento e rendimento, as CCS foram escolhidas para fracionamento, similar ao realizado para o material cultivado *in vivo* (CCS1 e CCS2).

Quadro 2 - Materiais usados no preparo de extratos e frações de *A. mucosa* cultivada *in vivo* e *in vitro*.

Material vegetal	Solvente	Sigla adotada
Caule	MeOH	C
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	C <sub>1</sub>
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>
Folha	MeOH	F
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	F <sub>1</sub>
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	F <sub>2</sub>
Calos hipocotiledonares	MeOH	CH
Calos foliares	MeOH	CF
Cultura de células em suspensão de calos hipocotiledonares	MeOH	CCS
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CCS <sub>1</sub>
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CCS <sub>2</sub>

### 3.7 Avaliação da atividade leishmanicida

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, sob a supervisão da Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Silvia Amaral.

#### 3.7.1 Obtenção de *Leishmania braziliensis* (Thor)

A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada em ensaios com as formas promastigota e amastigota intracelulares da espécie *Leishmania braziliensis* (*Lb*), cepa de cão, Thor. Os parasitas foram obtidos a partir de lesões das patas ou linfonodos de hamsters e mantidos em cultura em meio Schneider acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB) a 28°C (formas promastigotas). O subcultivo foi realizado a cada 7 dias, sendo utilizados para experimentação parasitos entre a terceira e quinta passagem em fase estacionária de crescimento.

### 3.7.2 Ensaio *in vitro* com promastigota

Os experimentos foram realizados em placa de 96 poços contendo, por poço, 0,1mL de promastigotas de *Lb* na concentração de  $5 \times 10^5 \text{.mL}^{-1}$ , em meio Schneider acrescido de 20% de SFB. Aos poços foram adicionados 0,1mL de solução de extrato, na concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em meio Schneider acrescido de 20% de SFB. Como controles negativos, foram utilizados considerados 0,1mL de *Lb* cultivada em meio de cultura Schneider e meio acrescido de 0,2% de DMSO, que corresponde à concentração final utilizada na solubilização dos extratos testados.

A cultura foi incubada a 28°C por 96h sendo realizada em triplicata. O número de promastigotas foi avaliado por contagem das células em microscópio usando câmara de Neubauer.

O extrato proveniente do material biotecnológico que alcançou maior produção de biomassa (cultura de células em suspensão) foi utilizado para o estabelecimento da curva de crescimento de parasitos, sendo estabelecida da concentração inibitória ao crescimento de 50% da população ( $\text{IC}_{50}$ ). Foi realizada contagem em câmara de Neubauer após 48h de cultivo na presença do extrato nas concentrações de  $31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 3.7.3 Ensaio *in vitro* com amastigota

A atividade dos extratos sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* foi avaliada em monocamadas de macrófagos peritoneais de camundongos (Swiss).

Para obtenção dos macrófagos, 5mL de meio DMEM gelado foram injetados na cavidade peritoneal de camundongos. O exsudado aspirado foi mantido em gelo para manutenção da viabilidade das células. Os macrófagos foram plaqueados na concentração de  $2 \times 10^6 \text{.mL}^{-1}$  em meio DMEM contendo 10% de SFB em placas de 96 poços (ensaio de citotoxicidade) ou de 24 poços com lamínulas redondas no fundo (infecção com *Lb*). As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 1h para aderência.

Para a avaliação da citotoxicidade dos extratos de *A. mucosa*, após a aderência dos macrófagos o sobrenadante foi descartado e os extratos foram adicionados na concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo mantido o cultivo por 48h a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . No período

correspondente a três horas antes do término do cultivo (45h) foi adicionado  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Após este período, a placa foi centrifugada a 3000 RPM por 5 minutos para deposição dos cristais de MTT formados. O sobrenadante foi descartado e os cristais diluídos em DMSO (100%). A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 492nm. Como controles foram utilizados o cultivo em meio DMEN puro ou acrescido de 0,2% de DMSO e os diferentes extratos na ausência de macrófagos (branco).

Na avaliação da interação entre macrófagos e *L. braziliensis*, após a aderência celular à lamínulas em placas de 24 poços, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se  $500\mu\text{L}$  de *Lb* na concentração de  $10^7 \text{ .mL}^{-1}$  (proporção de 5 parasitos por macrófago), incubando-se por 4h a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a infecção, o sobrenadante foi removido e os poços lavados uma vez com PBS para remoção dos parasitos que não internalizaram. Os extratos foram então adicionados na concentração de  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$  e as culturas mantidas por 48h/ $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Como controles foram utilizados o meio DMEM puro e acrescido de DMSO a 0,2%. Após esse período as monocamadas de células foram coradas com corante panótico, e as amastigotas intracelulares foram contadas em microscópio.

A avaliação dos cultivos foi realiza a partir da composição do índice de infecção (IF) como mostrado abaixo.

$$\text{IF} = \frac{\% \text{ de células infectadas} \times \text{número de amastigotas}}{\text{Número total de macrófagos}}$$

Os valores obtidos foram transformados em porcentagem em relação ao controle com meio de cultura DMEN puro, admitindo-se para este um índice de infecção de 100%.

### 3.8 Avaliação do potencial antimicrobiano

O trabalho foi realizado no Laboratório 1 da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, integrante do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, sob a supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Claudia Paula Rosa.

### 3.8.1 Isolamento de cepas

Para avaliação e validação dos ensaios foram utilizadas cepas de referência, obtidas em sua maioria do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA) e demais, da coleção do Departamento de Microbiologia da UERJ. Foram utilizadas 20 cepas bacterianas (**quadro 3**), englobando Gram-positivas e Gram-negativas de interesse clínico em saúde pública.

Para montagem do estoque, as cepas obtidas foram semeadas com o auxílio de alças descartáveis estéreis em placas de petri de 90 mm de diâmetro, contendo 20mL de meio de cultivo sólido Mueller-Hinton agar (MHA, Oxoid Ltda). O material semeado foi mantido em estufa a 37°C por 18h para crescimento. Utilizando alças, as colônias formadas nas culturas foram removidas e adicionadas em meios para armazenagem. As cepas foram estocadas a -70°C em meio Tryptic Soy Broth (TSB, Merck®) e Skim Milk (Sigma-Aldrich®) acrescidos de 20% de glicerol, para impedir a cristalização do material em congelamento.

Quadro 3 - Cepas utilizadas em experimentação do potencial antimicrobiano de *A. mucosa*.

<b>Gram-positivas</b>	
<b>Espécie</b>	<b>Cepa</b>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 33679
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
<i>Serratia marcescens</i>	7145
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305
<i>Staphylococcus simulans</i>	ATCC 27851
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8668
<b>Gram-negativas</b>	
<b>Espécie</b>	<b>Cepa</b>
<i>Aeromonas caviae</i>	ATCC 15468
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966
<i>Aeromonas media</i>	ATCC 33907
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 12241
<i>Escherichia coli</i>	EAEC 17-2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Escherichia coli</i> K-12	C600
<i>Escherichia coli</i> K-12	HB 101
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Salmonella typhimurium</i>	C20
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931

Os meios de estoque foram previamente esterilizados por meio de autoclavação, sendo os meios MHA e TSB autoclavados a 121°C por 20 minutos. Para o meio Skim Milk, a esterilização se deu a 111°C por 10 minutos.

### 3.8.2 Ensaio em macrodiluição

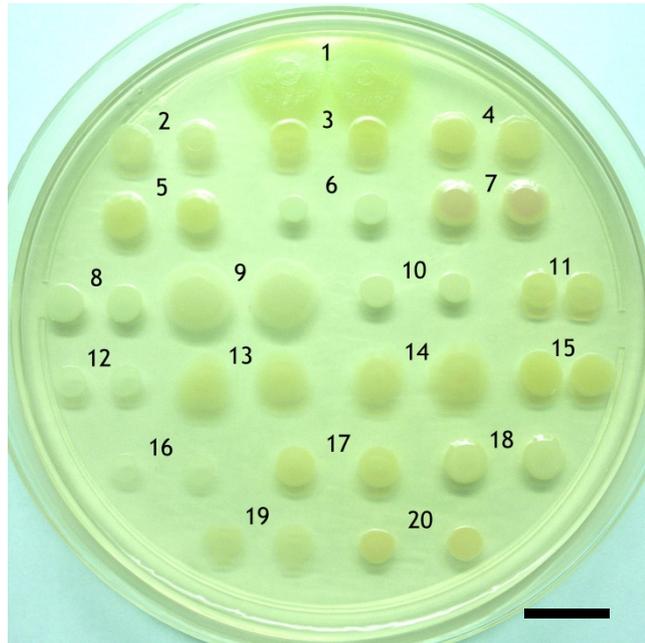
A avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos foi realizada a partir do método do ensaio de diluição em ágar (macrodiluição), utilizado por Soberón e colaboradores (2007) com algumas modificações.

As cepas bacterianas dos estoques foram cultivadas para crescimento em tubos de ensaio de 15x100 mm contendo 3mL de meio Mueller-Hinton Broth (MHB, Oxoid, Ltda.) mantidas em estufa por 18h a 37°C. Após a fase de crescimento, as culturas obtidas foram aliqüotadas em tubos Eppendorf estéreis para manipulação em trabalho.

Os extratos testados foram avaliados na concentração de 500µg.mL<sup>-1</sup>. Os extratos foram preparados conforme metodologia descrita anteriormente (item 3.5), sendo solubilizados em 20mL de MHA morno, ainda não solidificado e o conteúdo final despejado em placas de petri de 90 mm. Como controles negativos do experimento foram utilizados o meio MHA puro e o mesmo meio acrescido de 0,2% de DMSO, concentração final após a solubilização dos extratos.

Para cada placa de tratamento foram semeados 2µL de cada suspensão bacteriana em duplicata (**figura 5**), sendo avaliado o crescimento das colônias após 24h de incubação em estufa a 37°C. Todos os experimentos foram repetidos por duas vezes e os materiais e meios de cultivos previamente esterilizados por autoclavagem a 121°C e pressão de 1 atm por 20 minutos.

Figura 5 - Cepas utilizadas no ensaio de avaliação do potencial antimicrobiano de extratos de *A. mucosa* obtida *in vivo* e *in vitro* em crescimento em meio Mueller-Hinton Agar após 18h a 37°C.



Legenda: (1) - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); (2) - *Citrobacter freundii* (ATCC 12241); (3)- *Aeromonas caviae* (ATCC 15468); (4) - *Escherichia coli* (EAEC 17-2); (5) - *Escherichia coli* (ATCC 25922); (6) - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); (7) - *Serratia macescens* (7145); (8) - *Staphylococcus simulans* (ATCC 27851); (9) - *Bacillus thurigiensis* (ATCC 33679); (10) - *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305); (11) - *Salmonella typhimurium* (C20); (12) - *Enterococcus faecalis* (29212); (13) - *Escherichia coli* K-12 (C600); (14) - *Shigella sonnei* (ATCC 25931); (15) - *Escherichia coli* (ATCC 35218); (16) - *Streptococcus pyogenes* (8668); (17) - *Escherichia coli* K-12 (HB 101); (18) - *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603); (19) - *Aeromonas media* (ATCC 33907); (20)- *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966). Nota: Barra = 1 cm.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Germinação de *Annona mucosa*

O processo de desinfestação de sementes para a obtenção de plântulas axênicas mostrou-se eficiente a partir de 2% de NaOCl por 20 a 40 minutos. No entanto, concentrações acima de 2% ou a exposição ao hipoclorito por períodos maiores que 20 minutos ocasionaram a perda da viabilidade do material. O protocolo para desinfestação com NaOCl 2% por 20 minutos e a embebição em água destilada estéril, mostraram-se eficientes na manutenção do vigor do material e posterior desenvolvimento das plântulas *in vitro*.

A germinação *in vitro* de *A. mucosa*, é descrita pela primeira vez neste trabalho, foi obtida quando utilizou-se vermiculita embebida em solução salínica e vitamínica do meio MS, sem fitorreguladores, contendo 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose. A emergência do gancho apical foi visualizada 20 dias após a inoculação (**figura 6a**), quando foi observada taxa germinativa média de 85%, independentemente da origem dos lotes.

A utilização de meio MS sólido em tubos de ensaio contendo PVP, suplementado com GA<sub>3</sub>, propiciou apenas o início da emissão da radícula. No entanto, não foi observada a continuidade do desenvolvimento pós-seminal, sendo constatada a liberação de exsudados de coloração amarelada no meio de cultivo, provenientes das sementes.

A rega mensal das plântulas obtidas por germinação em vermiculita contendo 5 mL da solução nutritiva do meio MS, manteve o adequado desenvolvimento, evitando a dessecação do material. As plântulas apresentaram após oito semanas de cultivo o hipocótilo pouco alongado, em torno de 5 cm, com partes calejadas na região epidérmica da base do hipocótilo e raiz principal (**figura 6b**).

Na avaliação dos diferentes tratamentos pré-germinativos, a embebição em GA<sub>3</sub> e manutenção em 5±2°C não propiciaram a germinação do material, bem como o trabalho com sementes sem tegumento ou mantidas a 30±2°C. A embebição de sementes com tegumento em água destilada estéril e manutenção da cultura a 26±2°C sob fotoperíodo de 16h mostrou-se satisfatória para o processo germinativo.

Ao final da 8ª semana após a germinação (**figura 6c**) as plântulas apresentavam comprimento médio de epicótilo de 3,25±0,25cm e 5,4±1cm de hipocótilo, que apresentou calos em sua superfície. As plântulas apresentaram número médio de quatro folhas medindo

2,05±0,99cm de limbo (**figura 6c**). A raiz principal, de 5,24±0,05cm, apresentou calos em sua superfície e em torno de 15 raízes secundárias com comprimento de 2,83±0,27cm.

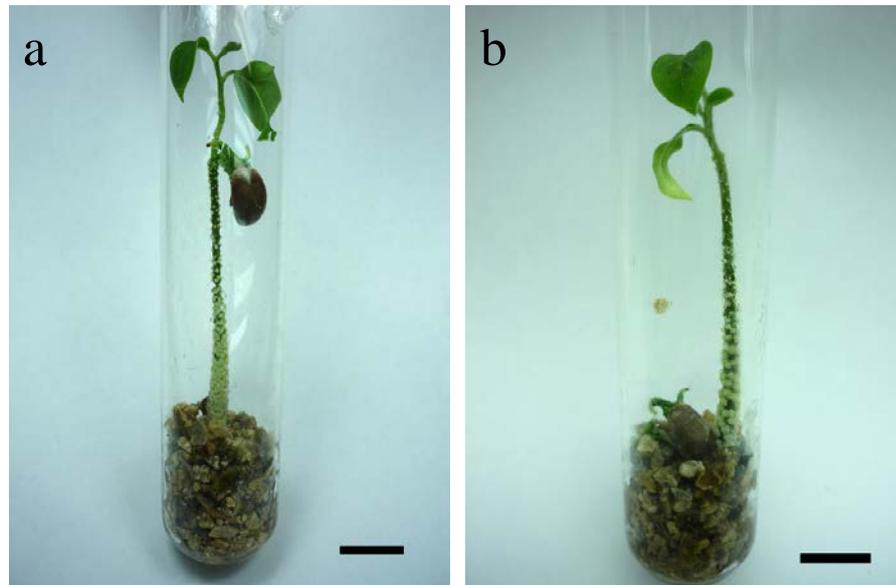
Figura 6 - Germinação *in vitro* de *A. mucosa* a partir de sementes oriundas do Pará, em substrato vermiculita.



Legenda: (a)- emergência do gancho após 20 dias de semeadura; (b)- presença de calejamento ao longo do eixo caulinar; (c)- estoque de plântulas axênicas após 8 semanas da germinação; (d)- plântula *in vitro* com 8 semanas exibindo expansão das folhas.

Após o estabelecimento do protocolo com o material obtido do Pará, sementes obtidas de Magé e do Macapá foram inoculadas nas mesmas condições. O processo germinativo, bem como as características morfológicas observadas nas plântulas obtidas após dois meses de cultivo mostraram-se similares, independentemente da origem das sementes acessadas (**figura 7**). O alongamento e calejamento do hipocótilo ocorre ao longo das quatro primeiras semanas de desenvolvimento, sendo a expansão foliar observada até a oitava semana.

Figura 7 - Germinação *in vitro* de *A. mucosa* em substrato vermiculita após 4 semanas da germinação apresentando calejamento do hipocótilo e folhas ainda não expandidas.



Legenda: (a)- sementes oriundas de Macapá/AP; (b)- sementes oriundas do Magé/RJ. Nota: Barras = 1cm.

#### 4.2 Calogênese

Cada folha utilizada como fonte de explantes originou em torno de cinco segmentos, cujo peso fresco médio dos explantes foliares utilizados foi de  $0,008 \pm 0,001$ g. Dos segmentos hipocotiledonares o peso médio dos explantes utilizados foi de  $0,013 \pm 0,005$ g, com cada hipocótilo gerando 13 explantes e dos radiculares de  $0,015 \pm 0,011$ g, sendo cinco explantes por raiz principal.

Os explantes cultivados nos diferentes tratamentos em meios de cultura líquidos não apresentaram resposta calogênica, mostrando-se totalmente oxidados após 4 semanas de cultivo. Apesar da eficiência do protocolo de desinfestação, os explantes radiculares não apresentaram resposta calogênica nos tratamentos testados, tanto para o cultivo em meio sólido, quanto para os tratamentos com auxinas em meio líquido.

As respostas calogênicas dos explantes foliares e hipocotiledonares do material cultivado em sementeira foram satisfatórias (**tabela 1**), tendo como melhor tratamento para hipocótilo o meio de cultivo WPM suplementado com  $2\mu\text{M}$  de picloram e  $0,02\mu\text{M}$  de TDZ, resultando em peso seco médio de  $0,159 \pm 0,047$ g. No entanto este tratamento não diferiu estatisticamente do tratamento com  $2\mu\text{M}$  de picloram e  $0,02\mu\text{M}$  de KIN, para os valores de peso fresco e seco. Para os explantes foliares, a melhor resposta foi obtida em meio MS

suplementado com  $10\mu\text{M}$  de picloram e  $0,1\mu\text{M}$  de KIN, com peso seco médio de  $0,164\pm 0,065\text{g}$ .

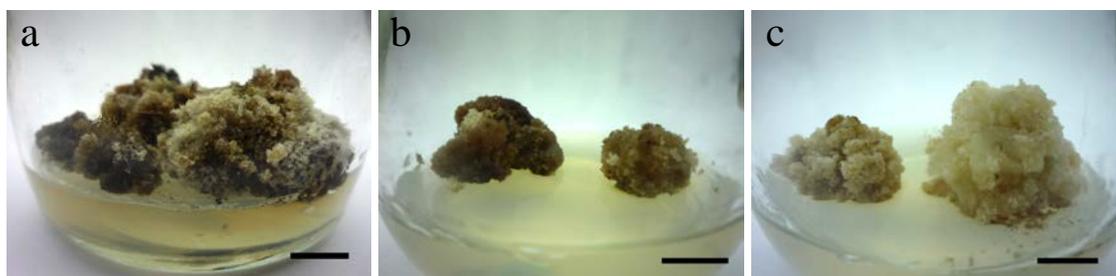
Tabela 1- Resposta calogênica produzida em explantes de *A. mucosa* obtida por germinação *in vivo*.

Explante	Meio	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Hipocótilo	W0	-	-
	W1	$1,993\pm 0,655^*$	$0,155\pm 0,047^*$
	W2	$1,011\pm 0,896$	$0,082\pm 0,058^*$
	W3	$2,631\pm 1,326^*$	$0,159\pm 0,047^*$
Folha	M0	-	-
	M1	$2,066\pm 0,906^*$	$0,164\pm 0,065^*$
	M2	$0,237\pm 0,109$	$0,03\pm 0,012$
	M3	$0,353\pm 0,164$	$0,038\pm 0,011$

Nota: Para cada explante, valores com asterisco (\*) em mesma coluna não diferem significativamente ao teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

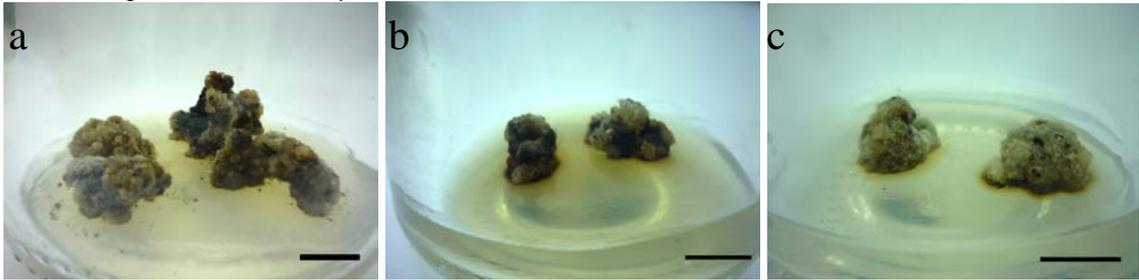
Após 12 semanas de cultivo dos explantes hipocotiledonares (**figura 8**) e 16 semanas para os foliares (**figura 9**), os calos obtidos apresentaram coloração bege escura e aspecto parcialmente friável, com alguns grupamentos celulares compactos em meio à massa calogênica de alguns calos.

Figura 8 - Calos de origem hipocotiledonar de plântulas de *A. mucosa* cultivadas *in vivo*, após 90 dias de cultivo em meio MS suplementado com  $2\mu\text{M}$  de PIC.



Legenda: (a)- adição de  $0,02\mu\text{M}$  de KIN; (b)-  $0,02\mu\text{M}$  de BAP; (c)-  $0,02\mu\text{M}$  de TDZ. Nota: Barras = 1 cm.

Figura 9 - Calos de origem foliar de plântulas de *A. mucosa* cultivadas *in vivo*, após 120 dias de cultivo em meio MS suplementado com 10 $\mu$ M de PIC.



Legenda: (a)- adição de 0,1 $\mu$ M de KIN; (b)- 0,1 $\mu$ M de BAP; (c)- 0,1 $\mu$ M de TDZ. Nota: Barras = 1 cm.

Os calos de origem hipocotiledonar, em sua maioria, apresentaram melhor resposta calogênica em relação aos explantes foliares, sendo subcultivadas frações (cerca de 1g) dos calos hipocotiledonares obtidos após 12 semanas, amplificando-se a cultura (**figura 10**). Estes foram subcultivados a cada 30 dias por 12 meses, mantendo sua taxa proliferativa. Calos obtidos em tratamentos ausentes de citocininas não puderam ser mantidos após 120 dias de cultivo, apresentando oxidação ou perdendo a capacidade proliferativa.

A maior friabilidade, de modo geral, foi obtida em calos cultivados em PIC e KIN tanto para hipocótilos (W1) quanto para folhas (M1). Deste modo, estes calos foram utilizados como fonte de inóculo para culturas de células em suspensão e para extração visando à avaliação do potencial medicinal.

Figura 10 - Calos de origem hipocotiledonar cultivados em meio WPM suplementado com Picloram (2 $\mu$ M) e cinetina (0,02 $\mu$ M), após 12 meses de cultivo e subcultivos mensais.



Nota: Barra = 2cm.

### 4.3 Cultura de células em suspensão

Para cultivo em meio líquido foram utilizados calos de origem hipocotiledonar e foliar obtidos a partir do tratamento que apresentou maior produção de biomassa e friabilidade após 12 (W1) e 16 (M1) semanas de cultivo, respectivamente. Ambos apresentaram boa dispersão em meio de cultivo, formando culturas de coloração variando de bege escuro a marrom após quatro semanas de cultivo (**figura 11**). A coloração escura indica a possível oxidação do material, apesar da manutenção do seu crescimento ao longo dos subcultivos. A cada subcultivo, o peso fresco médio do material filtrado das CCS de calos hipocotiledonares foi de  $6,357 \pm 2,015$ g e de calos foliares, de  $5,494 \pm 1,187$ g, representando um crescimento de 318% e 274%, respectivamente, em relação ao inóculo inicial de 2g.

Ambas as culturas apresentaram pequenos aglomerados celulares de cor branca e pequenos calos de constituição compacta, dispersos em meio às células em suspensão. Quando cultivados em meio de cultura sólido ou líquido de mesma constituição em que foram obtidos, estes grupamentos não apresentaram resposta proliferativa, apresentando-se parcialmente oxidados, após oito semanas de cultivo.

Figura 11- Cultura de células em suspensão de calos de origem hipocotiledonar de plântulas de *A. mucosa* obtida por germinação *in vivo*.

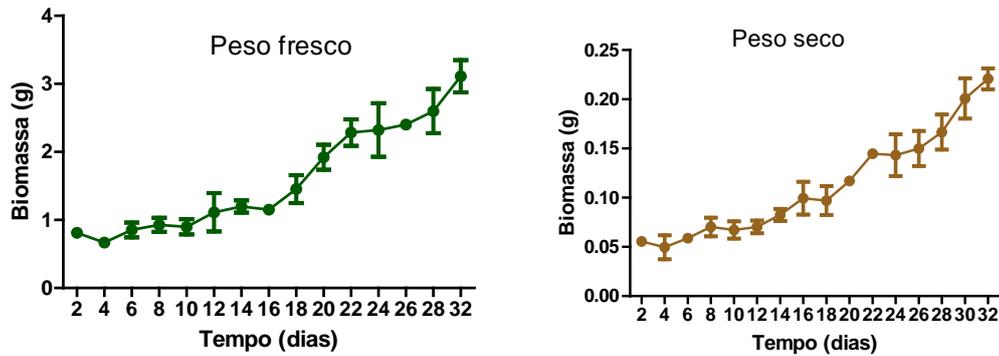


Nota: Barra = 1 cm.

A avaliação do crescimento das culturas provenientes de calos hipocotiledonares demonstrou um período de fase exponencial de crescimento a partir do 16º dia de cultivo (**figura 12**), sendo evidenciado crescimento até o 32º dia de cultivo. Para a produção de extratos, foram avaliadas as CCS provenientes de calos hipocotiledonares (CCS) por serem

estes calos de mais rápida proliferação *in vitro* em meio de cultura sólido (90 dias) em relação às culturas foliares, sendo realizada a secagem e extração após cinco semanas de cultivo.

Figura 12 - Curva de crescimento de culturas de células em suspensão provenientes de calos hipocotiledonares de *A. mucosa* evidenciando a biomassa em peso fresco (esquerda) e seco (direita).



#### 4.4 Produção de extratos

O rendimento na produção de extrato bruto metanólico do material coletado *in vivo* (folha e caule) ficou em torno de 10% em relação ao peso seco do material (**tabela 2**). O fracionamento do extrato metanólico bruto de folhas (F) com hexano (F1) e posteriormente diclorometano (F2) apresentou rendimentos de 20% e 28%, respectivamente, em relação ao peso do extrato seco em armazenamento. Para os extratos de caule (C), suas frações em hexano (C1) e diclorometano (C2) apresentaram rendimento de 56% e 40% respectivamente.

Os extratos metanólicos brutos dos calos apresentaram melhores rendimentos em relação aos extratos metanólicos do material cultivado *in vivo*, com 15,08% para os calos foliares (CF) e 26,88% para os calos hipocotiledonares (CH). Culturas de células em suspensão provenientes de calos hipocotiledonares (CCS) apresentaram o maior rendimento de extrato bruto, com rendimento em extração metanólica de 38%. Sendo o extrato de maior rendimento, suas frações obtidas em hexano (CCS1) e diclorometano (CCS2) apresentaram rendimentos de 3% e 35% respectivamente em relação à quantidade de extrato bruto utilizado para o fracionamento.

Tabela 2-Rendimento da produção de extratos de *A. mucosa in vivo e in vitro*.

Sigla adotada	Material	PF (g)	P S (g)	Solvente	Extrato (g)	Rendimento* (%)
F	Folha	108,57	36,58	MeOH	4,37	11,946
F1	Extrato metanólico de folha		0,5	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0,1	20
F2				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,14	28
C	Caule	59,98	18	MeOH	1,57	8,722
C1			0,9	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0,51	56,667
C2				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,36	40
CF	Calos foliares	34,405	2,924	MeOH	0,441	15,082
CH	Calos hipocotiledonares	15,825	1,488	MeOH	0,4	26,881
CCS	CCS de calos hipocotiledonares	83,7553	4,1877	MeOH	1,59	37,968
CCS1			1,1	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0,04	3,636
CCS2				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,39	35,454

Nota: \* Rendimento calculado em relação ao peso de matéria seca (PS).

#### 4.5 Avaliação do potencial leishmanicida em *L. braziliensis*

##### 4.5.1 Avaliação em formas promastigotas

Todos os extratos avaliados, na concentração de 500µg.mL<sup>-1</sup>, mostraram-se ativos na redução do crescimento de promastigotas de *L. braziliensis* após 96h de exposição em cultivo. O crescimento de promastigotas na presença do extrato bruto metanólico de folhas (F) do material cultivado *in vivo* foi significativamente reduzido (**figura 13**). O percentual médio de inibição do crescimento foi de 99% em relação ao controle (**tabela 3**). A fração em diclorometano (F2) do mesmo extrato mostrou-se igualmente ativa, reduzindo o crescimento em 99% e a fração hexânica (F1) em 54%. Também ativo, o extrato caulinar (C) apresentou 55% de inibição do crescimento de promastigotas e suas frações hexânica (C1) e em diclorometano (C2) reduziram o crescimento em 99% e 98%, respectivamente.

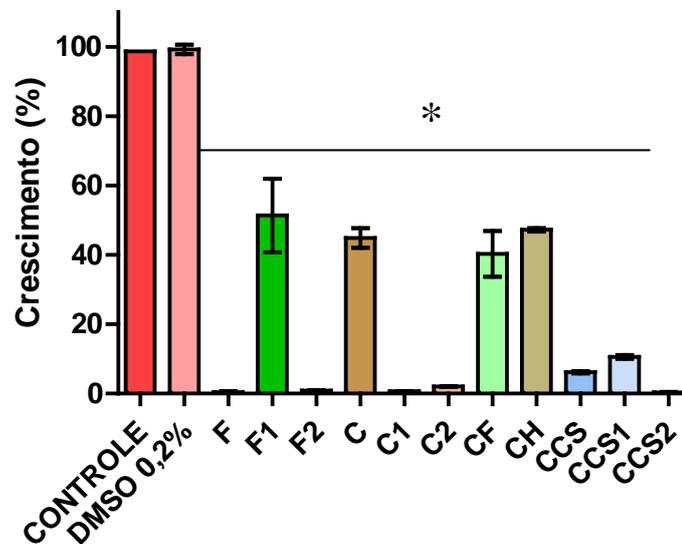
O material biotecnológico avaliado em mesmo tempo de cultivo (**tabela 3 e figura 13**) apresentou eficiência na redução do crescimento dos parasitos. O extrato metanólico da CCS de calos hipocotiledonares (CCS) apresentou melhor resultado, com redução de 94% em relação ao controle. As frações hexânica (CCS1) e em diclorometano (CCS2) mostraram-se igualmente ativas, com reduções de 89% e 99%, respectivamente. Em seguida, o extrato bruto de calos foliares (CF) apresentou redução de 60%, enquanto que o extrato bruto de calos hipocotiledonares (CH) apresentou 53% de redução para o cultivo em 96h.

Tabela 3 - Efeito de extratos de *A. mucosa* na concentração de  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$  sobre o crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. braziliensis*.

<b>Extratos</b>	<b>Redução (%)</b>	<b>Significância (p&lt;0,05)</b>
F	99,578 ± 0,292	*
F1	54,342 ± 5,544	*
F2	99,156 ± 0,146	*
C	55,143 ± 2,843	*
C1	99,334 ± 0,057	*
C2	97,968 ± 0,152	*
CF	59,696 ± 6,583	*
CH	52,782 ± 0,526	*
CCS	93,844 ± 0,292	*
CCS 1	89,41 ± 0,556	*
CCS 2	99,667 ± 0,152	*

Legenda: (F)- foliares; (F1) - fração hexânica; (F2) - fração em diclorometano; (C)- caulinares; (C1)- fração hexânica; (C2)- fração em diclorometano; (CF) - calos foliares; (CH)- calos hipocotiledonares; (CCS)- de calos hipocotiledonares; (CCS1)- fração hexânica; (CCS2)- fração em diclorometano. Nota: \* =  $p<0,001$  ao teste de Dunnet a 5% de significância.

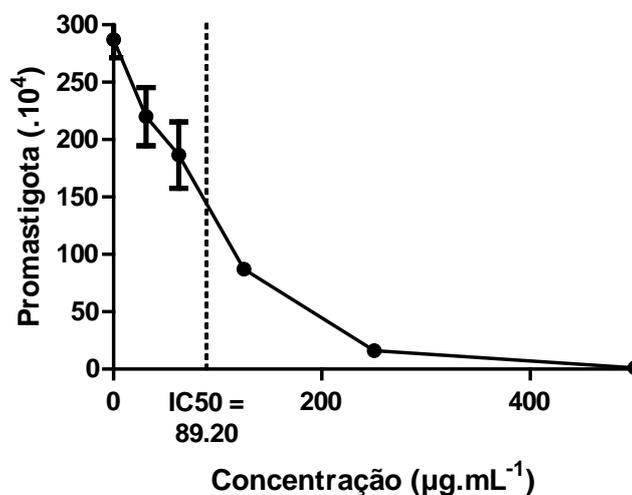
Figura 13 - Efeito de extratos de *A. mucosa* na concentração de  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$  em promastigotas de *L. braziliensis* após de 96h de cultivo a  $28^{\circ}\text{C}$ .



Legenda: (F)- foliares; (F1)- fração hexânica; (F2)- fração em diclorometano; (C)- caulinares; (C1)- fração hexânica; (C2)- fração em diclorometano; (CF)- calos foliares; (CH)- calos hipocotiledonares; (CCS)- CCS de calos hipocotiledonares; (CCS1)- fração hexânica; (CCS2)- fração em diclorometano. Nota: \* = diferem dos controles ao teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

A concentração inibitória a 50% da população de promastigotas ( $\text{IC}_{50}$ ) foi determinada para o extrato do material biotecnológico que apresentou maior redução de promastigotas em cultivo *in vitro*. O extrato metanólico bruto de CCS apresentou significativa redução no crescimento dos parasitos em 48h de cultivo, com  $\text{IC}_{50}$  em  $89,20\ \mu\text{g.mL}^{-1}$  (figura 14).

Figura 14 - Curva de crescimento de promastigotas de *L. braziliensis* em diferentes concentrações de extratos CCS após 48h de cultivo.

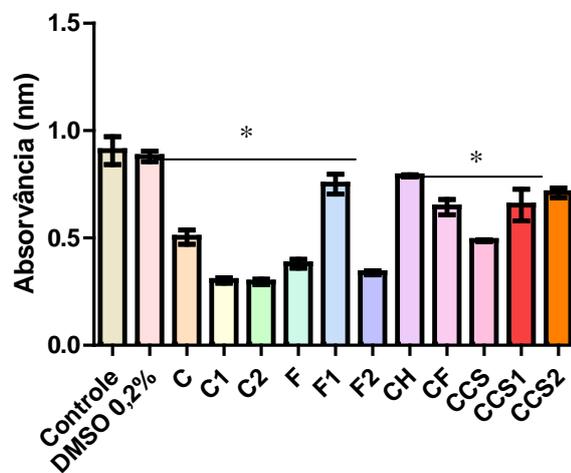


Nota:  $\text{IC}_{50}$  = Concentração inibitória a 50% da população de parasitos.

#### 4.5.2 Avaliação em amastigotas intracelulares.

Os extratos de *A. mucosa* mostraram-se tóxicos aos macrófagos obtidos de camundongos após 48h de cultivo (**figura 15**), com exceção do extrato metanólico de calos obtidos de hipocótilos (CH). A concentração de DMSO utilizada para a solubilização dos extratos (0,2%) não apresentou citotoxicidade quando comparada ao controle ( $p < 0,05$ ).

Figura 15 - Atividade citotóxica de extratos de *A. mucosa* ( $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em macrófagos murinos após 48h de cultivo.



Legenda: (C)- caulinares; (C1)- fração hexânica; (C2)- fração em diclorometano; (F)- foliares; (F1)- fração hexânica; (F2)- fração em diclorometano; (CH)- calos hipocotiledonares; (CF)- calos foliares; (CCS)- CCS de calos hipocotiledonares; (CCS1)- fração hexânica; (CCS2)- fração em diclorometano. Nota: \* = diferem estatisticamente dos controles ao teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

O extrato bruto metanólico de folhas (F) do material coletado *in vivo*, na concentração de  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ , apresentou grande citotoxicidade para os macrófagos infectados (**figura 16**), rompendo os macrófagos. No entanto, sua fração em diclorometano (F2) na mesma concentração reduziu a infecção de amastigotas por macrófago em 97% em relação ao controle (**tabela 4 e figura 16**). Apesar de tóxico aos macrófagos pela análise com MTT (**figura 15**) o tratamento com este extrato possibilitou a redução do número de parasitos intracelulares mantendo os macrófagos íntegros. A fração hexânica do extrato (F1) não alterou o número de amastigotas em relação ao controle.

O extrato bruto metanólico caulinar (C) promoveu a redução da infecção em 76% (**tabela 4**), apresentando macrófagos íntegros após o tempo de tratamento (**figuras 16 e 17**). Igualmente ativas, suas frações em hexano (C1) e diclorometano (C2) propiciaram reduções de 68% e 76%, respectivamente. Os extratos metanólicos dos calos provenientes de folhas

(CF) e hipocótilos (CH) não apresentaram atividade na redução da infecção, não demonstrando diferença significativa em relação ao controle.

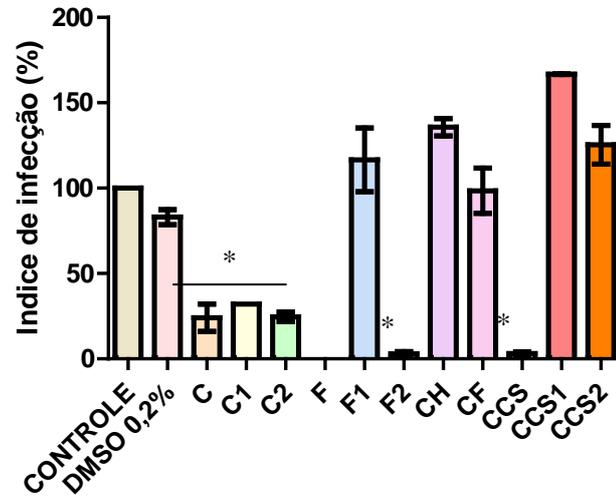
As culturas de células em suspensão provenientes de calos hipocotiledonares (CCS) demonstraram significativa atividade na redução da infecção (**figura 17**), bem como o observado em relação à toxidez em promastigotas. O extrato bruto metanólico promoveu uma redução de 97% da infecção na concentração de  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$  em relação ao controle (**tabela 4**). No entanto, quando fracionado, o extrato destas culturas não mostrou-se igualmente ativo, tendo suas frações hexânica (CCS1) e em diclorometano (CCS2) propiciado um ligeiro aumento da infecção em relação aos controles.

Tabela 4 - Efeito de extratos de *A. mucosa* na concentração de  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$  na infecção de macrófagos por *L. braziliensis*.

Extratos	IF (%)	Significância ( $p < 0,05$ )
C	$24,092 \pm 7,987$	*
C1	$32,092 \pm 1,414$	*
C2	$24,598 \pm 2,748$	*
F	-	-
F1	$116,559 \pm 18,685$	ns
F2	$2,933 \pm 1,245$	*
CH	$135,713 \pm 5,062$	ns
CF	$98,452 \pm 13,279$	ns
CCS	$3,117 \pm 0,889$	*
CCS1	$166,729 \pm 0,19$	ns
CCS2	$125,447 \pm 11,336$	ns

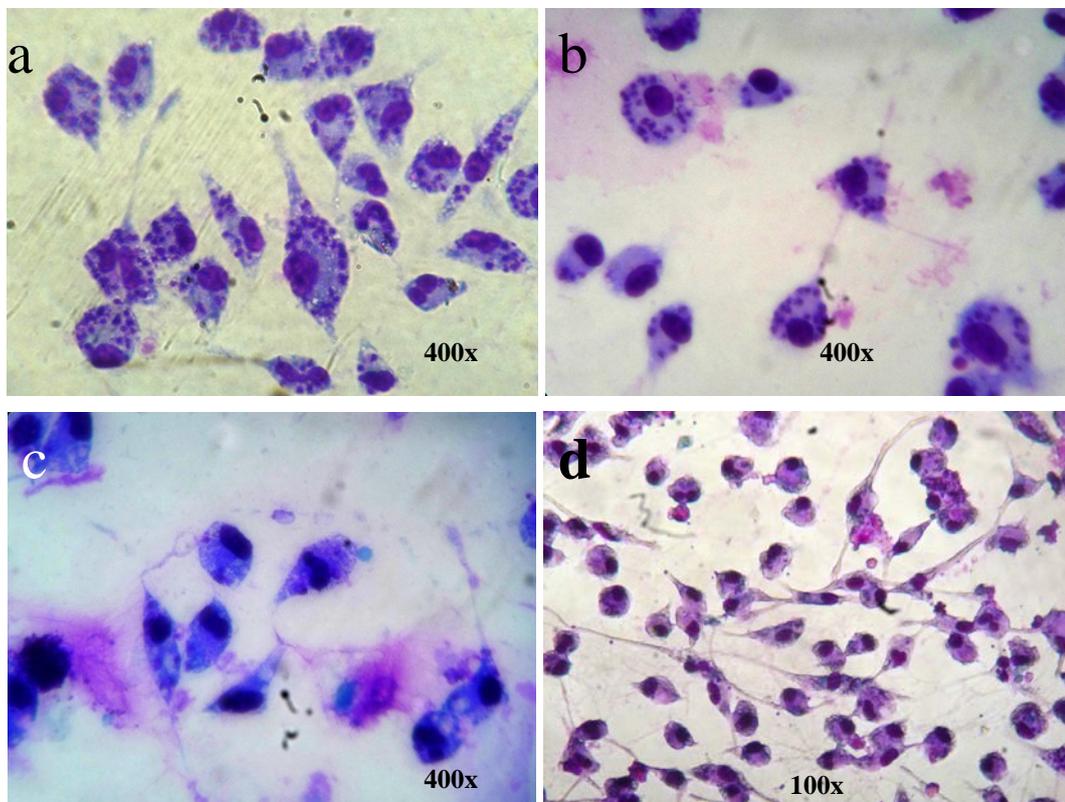
Legenda: (IF) – Índice de infecção; (C)- caulinares; (C1)- fração hexânica; (C2)- fração em diclorometano; (F)- foliares; (F1)- fração hexânica; (F2)- fração em diclorometano; (CH)- calos hipocotiledonares; (CF)- calos foliares; (CCS)- CCS de calos hipocotiledonares; (CCS1)- fração hexânica; (CCS2)- fração em diclorometano.  
Nota: \* =  $p < 0,05$ ; ns = não-significativo na redução em relação ao controle pelo teste de Dunnet a 5% de significância.

Figura 16 - Efeito de extratos de *A. mucosa* na concentração de  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$  em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* cultivada por 48h a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ .



Legenda: (IF) – Índice de infecção; (C)- caulinares; (C1)- fração hexânica; (C2)- fração em diclorometano; (F)- foliares; (F1)- fração hexânica; (F2)- fração em diclorometano; (CH)- calos hipocotiledonares; (CF)- calos foliares; (CCS)- CCS de calos hipocotiledonares; (CCS1)- fração hexânica; (CCS2)- fração em diclorometano.  
Nota: \* =  $p < 0,05$  ao teste de Dunnet.

Figura 17 - Infecção de amastigotas de *L. braziliensis* em macrófagos peritoneais.



Legenda: (a)- cultivo em meio Schneider puro; (b) - acrescido de 0,2% de DMSO; (c) - acrescido de  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$  de extrato caulinar; (d) - acrescido de  $500\mu\text{g.mL}^{-1}$  de extrato de cultura de células CCS.

#### 4.6 Avaliação do potencial antimicrobiano

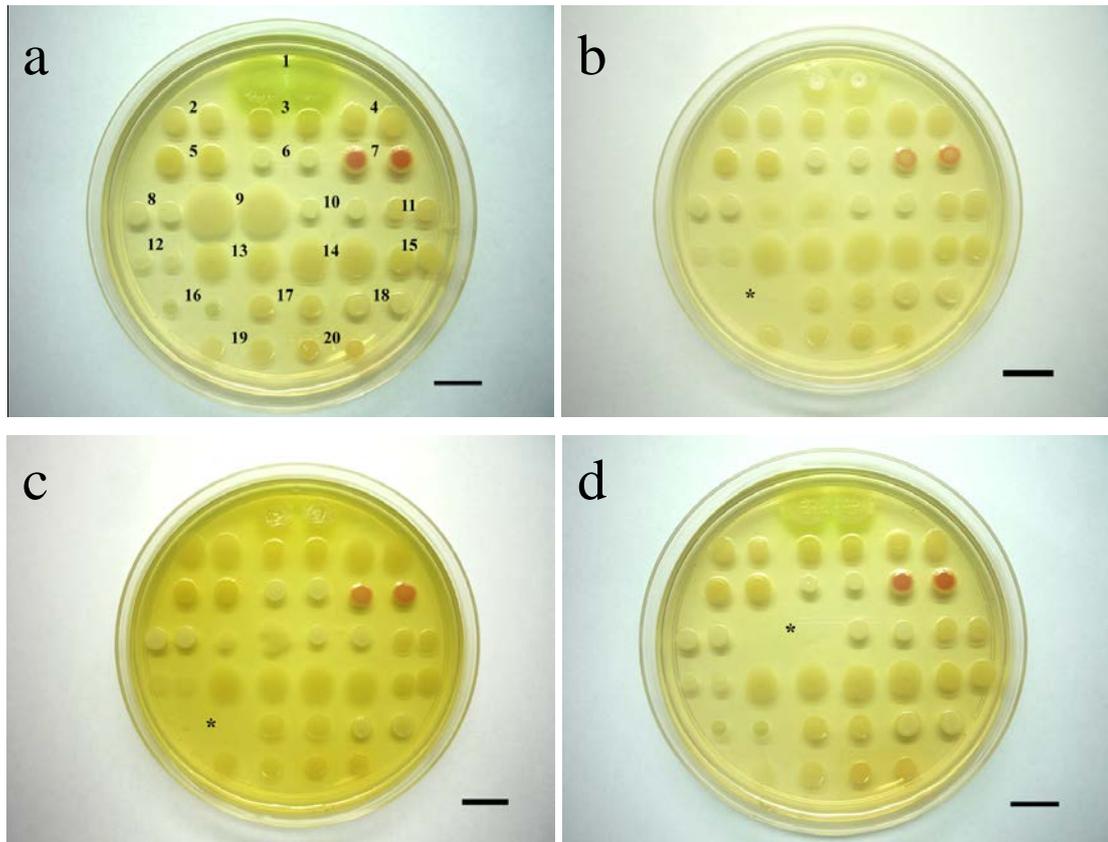
A análise dos extratos obtidos de material cultivado *in vivo* e *in vitro* de *A. mucosa*, na concentração de  $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , apresentou atividade antimicrobiana seletiva, inibindo o crescimento de apenas duas cepas (**figura 18**).

Do material cultivado *in vivo*, extratos metanólicos brutos de caule (C) e folhas (F) e sua fração em diclorometano (F2) apresentaram atividade inibitória no crescimento de *Streptococcus pyogenes* (8660) (**tabela 5**). Para esta cepa, as frações em diclorometano de caule (C2) e hexânica de folhas (C1) foram capazes de reduzir seu crescimento. Apesar da inibição da cepa, a fração em diclorometano do extrato foliar (F2) propiciou o aumento de outras 10 cepas em relação aos controles avaliados.

O material biotecnológico apresentou atividade inibitória ao crescimento de *Bacillus thuringiensis* (ATCC 33679). Esta ação seletiva foi observada nos extratos brutos metanólicos de calos foliares (CF) e culturas de células em suspensão de calos hipocotiledonares (CCS), sendo a fração em diclorometano deste (CCS2) capaz de reduzir o crescimento da cepa.

Quando em contato com os extratos, três cepas apresentaram redução do crescimento em cultivo. Foi observada a redução do crescimento das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (C1, C2, F, CH e CCS2), *Shigella sonnei* (CF) e *Klebsiella pneumoniae* (F) (**tabela 5**).

Figura 18 - Efeito de extratos de *A. mucosa* na atividade antibacteriana.



Legenda: (a)- cepas cultivadas em meio MHA; (b)- meio MHA acrescido de  $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extratos brutos de Caule; (c)- Folha; (d)- e Calos Foliares. (1) - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); (2) - *Citrobacter freundii* (ATCC 12241); (3)- *Aeromonas caviae* (ATCC 15468); (4) - *Escherichia coli* (EAEC 17-2); (5) - *Escherichia coli* (ATCC 25922); (6) - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); (7) - *Serratia marcescens* (7145); (8) - *Staphylococcus simulans* (ATCC 27851); (9) - *Bacillus thuringiensis* (ATCC 33679); (10) - *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305); (11) - *Salmonella typhimurium* (C20); (12) - *Enterococcus faecalis* (29212); (13) - *Escherichia coli* K-12 (C600); (14) - *Shigella sonnei* (ATCC 25931); (15) - *Escherichia coli* (ATCC 35218); (16) - *Streptococcus pyogenes* (8668); (17) - *Escherichia coli* K-12 (HB 101); (18) - *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603); (19) - *Aeromonas media* (ATCC 33907); (20)- *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966). Notas: (\*)- inibição do crescimento. Barras = 1 cm.

Tabela 5 - Crescimento bacteriano na presença de extratos de *A. mucosa* obtida *in vivo* e *in vitro* na concentração de 500µg.mL<sup>-1</sup>.

Cepas	Extratos de <i>A. mucosa</i>										
	C	C1	C 2	F	F1	F2	CH	CF	CCS	CCS1	CCS2
1 - <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	R	R	R	-	-	R	-	-	-	R
2 - <i>C. freundii</i> (ATCC 12241)	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
3 - <i>A. caviae</i> (ATCC 15468)	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
4 - <i>E. coli</i> (17-2)	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
5 - <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
6 - <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
7 - <i>S. marcescens</i> (7145)	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
8 - <i>S. simulans</i> (ATCC 27851)	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
9 - <i>B. thurigiensis</i> (ATCC 33679)	-	-	-	R	-	-	-	I	I	-	R
10 - <i>S. saprophyticus</i> (ATCC 15305)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 - <i>S. typhimurium</i> (C20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 - <i>E. faecalis</i> (29212)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13 - <i>E. coli</i> K-12 (C600)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 - <i>S. sonnei</i> (ATCC 25931)	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-
15 - <i>E. coli</i> (ATCC 35218)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16 - <i>S. pyogenes</i> (8668)	I	-	R	I	R	I	-	-	-	-	-
17 - <i>E. coli</i> K-12 (HB 101)	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
18 - <i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-
19 - <i>A. media</i> (ATCC 33907)	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
20 - <i>A. hydrophila</i> (ATCC 7966)	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-

Legenda: C: caulinares; C1: fração hexânica; C2: fração em diclorometano; F: foliares; F1: fração hexânica; F2: fração em diclorometano; CH: calos hipocotiledonares; CF: calos foliares; CCS: CCS de calos hipocotiledonares; CCS1: fração hexânica; CCS2: fração em diclorometano.

A = aumento; R = redução I = inibição; Traço = crescimento similar ao controle em MHA.

## 5 DISCUSSÃO

A obtenção da germinação *in vitro* de *Annona mucosa*, representa uma importante fonte de explantes estéreis e de alta qualidade.

A germinação em exemplares da família Annonaceae pode ser bloqueada pela dormência imposta pelo tegumento rígido das sementes, promovendo interferência na absorção de água, impedimento mecânico ao desenvolvimento do embrião ou interferindo nas trocas gasosas (Fowler & Bianchetti, 2000). A imersão das sementes de *A. mucosa* em água destilada por 48h mostrou-se como um tratamento eficiente para a alteração da permeabilidade do tegumento e liberação da dormência. Ferreira e colaboradores (2009) obtiveram alta porcentagem de germinação *in vivo* de *A. mucosa* a partir da escarificação do tegumento das sementes com lixa Nº 80, com posterior embebição em água destilada por 24h, indicando que o procedimento mecânico reduz o tempo de imersão necessário à embebição das sementes e liberação da dormência.

Como mencionado por Lorenzi (2002), tratamentos pré-germinativos em sementes de *A. mucosa* podem aumentar sua taxa germinativa em valores superiores a 50%, tornando o processo mais rápido e eficiente. A imersão das sementes em água também pode estar relacionada à lixiviação de eventuais inibidores presentes no tegumento e no endosperma da espécie, bem como na expulsão do tampão micropilar, facilitando a entrada de água e oxigênio e a emissão da radícula (Albarelo *et al.*, 2002).

O uso de PVP no cultivo em meios nutritivos solidificados com ágar teve por objetivo a adsorção de substâncias que poderiam inibir o processo germinativo. Esta substância foi anteriormente utilizada com sucesso no controle da oxidação na propagação *in vitro* da espécie (Figueiredo *et al.*, 1999). No entanto, mesmo o emprego de tratamento pré-germinativo, fitoreguladores e PVP não foi suficiente para estimular o processo germinativo. O exsudado liberado no meio, apesar da presença do PVP, pode ter interferido na continuidade do desenvolvimento pós-seminal, provavelmente devido à presença de substâncias inibidoras da germinação. Nem mesmo a adição de GA3, que é reconhecidamente um indutor do processo germinativo (George, 2008), foi capaz de reverter a provável inibição, embora tenha permitido o início do desenvolvimento radicular.

O êxito na utilização da vermiculita deve-se à baixa compactação deste substrato, que apresenta vantagens em relação ao ágar, principalmente pelo seu baixo custo e otimização de resultados específicos, como a germinação (Grattapaglia & Machado, 1998). Este substrato

proporciona maior aeração contribuindo com a respiração, o que favorece aos processos metabólicos da germinação e mais rápida emissão de raízes. Este fato tem sido verificado em estudos *in vitro* de outras arbóreas, onde o meio de cultura foi substituído por vermiculita, conforme relatado por Hoffmann e colaboradores (2001), no processo de enraizamento *in vitro* de plântulas de macieira.

A associação entre a auxina Picloram e as citocininas, notadamente KIN e TDZ, foi responsável pelo aumento da produção de biomassa calogênica friável em relação ao trabalho previamente realizado com a espécie por Figueiredo e colaboradores (2003) e Barboza (2010). Não apenas a produção de biomassa, mas também a manutenção do potencial proliferativo dos calos após 12 subcultivos mensais foi possível em relação às culturas acrescidas apenas de Picloram.

O processo de divisão celular vegetal envolve a produção de cinases dependentes de ciclina (CDKs) que são produzidas a partir de estímulo por auxinas. Para a ativação destas CDKs, no entanto, é necessária a ação das ciclinas específicas do tipo D<sub>3</sub> (CYC/D<sub>3</sub>) e do tipo B (CYC/B), que por sua vez são moduladas por citocininas. Os complexos CDK/a-CYC/D<sub>3</sub> e CDKa/b-CYC/B são responsáveis pela replicação do DNA (fase G<sub>1</sub> para S) e mitose (fase G<sub>2</sub> para M), respectivamente (Kerbaudy, 2008). Deste modo, auxinas e citocininas exibem efeito regulatório na proliferação celular, sendo também responsáveis pela expressão da totipotencialidade das células vegetais. Em experimentação *in vitro*, a associação destes dois fitorreguladores em concentrações apropriadas promove a formação de calos (Sieberer *et al.*, 2003).

A aplicação de citocininas exógenas às culturas pode aumentar o conteúdo endógeno de diferentes tipos de citocininas, elevando a taxa proliferativa. Os níveis totais de citocininas endógenas após um mês de cultivo podem ser elevados em até seis vezes com a adição de BAP ou KIN ao meio nutritivo. Altas concentrações de KIN exógena em culturas após três meses de cultivo pode aumentar o conteúdo total de citocininas endógenas (Pintos *et al.*, 2002).

A ativação de genes específicos que atuam como reguladores na sinalização de citocininas pode ser induzida a partir da adição de nitrato ou citocininas exógenas. Genes reguladores positivos de citocininas estão envolvidos em mecanismos de produção de brotos, ao passo que genes reguladores negativos inibem esta resposta. Quando associadas, a aplicação de auxina exógena e a ativação de genes reguladores negativos, há a promoção do desenvolvimento de calos, como observado em plantas transgênicas de *Arabidopsis* sp. (Osakabe *et al.*, 2002).

O calo selecionado para a produção de cultura de células em suspensão (CCS) foi aquele cultivado com Picloram e KIN, que apresentou boa dispersão de células e proliferação no meio líquido. O padrão de crescimento desta cultura apresentou-se similar ao obtido em CCS a partir de calos de *A. mucosa* produzidos na presença apenas de Picloram (Figueiredo *et al.*, 2000). Deste modo, os extratos obtidos das culturas após cinco semanas de cultivo mostraram-se como material promissor na obtenção de metabólitos secundários, visto que a maior produção de substâncias de interesse medicinal ocorre normalmente após a fase exponencial de crescimento da cultura (Vanisree *et al.*, 2004).

A família Annonaceae apresenta importante papel no tratamento tradicional de enfermidades como a malária, chagas e leishmaniose. Basicamente, a atividade antiparasitária da família é relacionada à presença de metabólitos encontrados em várias partes das plantas, como alcaloides e acetogeninas (Ocampo & Ocampo, 2006).

Os extratos metanólicos obtidos para *A. mucosa* no presente trabalho mostraram-se ativos na redução da população de promastigotas de *L. braziliensis*. Extratos metanólicos da espécie são ricos em alcaloides, como a Romucosina I, obtida a partir de extratos metanólicos de caule da espécie (Kuo *et al.* 2004). Nestes extratos, também foram isoladas nove diferentes acetogeninas (Gu *et al.*, 1997), por técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), comprovando o potencial dos extratos obtidos de caule e folhas do material cultivado *in situ* na atividade leishmanicida observada.

As acetogeninas de anonáceas têm sido reportadas diversas atividades antiparasitárias. Em ensaios *in vitro*, foram comprovadas as atividades tripanocida e leishmanicida, em *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. donovani* de quatro acetogeninas isoladas de extratos metanólicos de caule de *Rollinia emarginata* (Férvrier *et al.*, 1999). Acetogeninas e alcaloides isoquinolínicos, isolados de extrato metanólico de folhas de *Annona squamosa*, mostraram-se também ativos na redução de *L. chagasi*, apresentando a fração contendo majoritariamente alcaloides, concentração efetiva (EC<sub>50</sub>) de 73,31µg.mL<sup>-1</sup> (Vila Nova, 2008). Frações ricas em alcaloides de extratos de diversos órgãos de 6 espécies de Annonaceae apresentaram atividade contra a forma promastigota de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani*, mostrando que este grupo de metabólitos pode ser um potencial agente anti-leishmania (Mishra *et al.*, 2009).

As frações em diclorometano da maioria dos extratos avaliados de *A. mucosa* mostraram-se ativas na redução do crescimento de *L. braziliensis*. Devido à natureza polar de alcaloides e acetogeninas, há a concentração destas substâncias na fração em diclorometano em relação à fração apolar avaliada, hexânica.

De modo geral, a fração em diclorometano de extratos obtidos a partir de espécies da família Annonaceae é considerada uma fração rica em acetogeninas. Desta fração foram isoladas acetogeninas de *Annona glauca* que apresentam concentração inibitória a 100% da população (IC<sub>100</sub>) de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani* similar à da própria fração em diclorometano quando avaliada (Waechter *et al.*, 1998). Do mesmo modo, esta fração apresenta alcaloides aporfínicos, em *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae), com alta atividade contra *L. major* e *L. donovani*, com IC<sub>100</sub> de 3,12µg,mL<sup>-1</sup> (Waechter *et al.*, 1999).

A atividade de extratos do material obtido pela cultura de tecidos de *A. mucosa*, em especial as culturas de células em suspensão, pode indicar a produção de metabólitos de interesse antiparasitário sob condições *in vitro*. Como observado por Wang e colaboradores (2002), calos produzidos a partir de explantes de sementes e frutos de *Annona squamosa* foram promissores na produção da acetogenina esquamocina, podendo esta substância ser isolada e quantificada do sistema obtido. Do mesmo modo, diversos alcaloides podem ser produzidos por técnicas de cultura de tecidos vegetais, sobretudo, em culturas de células em suspensão, aonde pode ser observado um incremento na produção em relação à produção natural das plantas ou a obtenção de alcaloides não sintetizados normalmente pelas plantas doadoras de explantes para o cultivo *in vitro* (Amaral & Silva, 2003).

Extratos de Annonaceae mostram-se potencialmente citotóxicos *in vitro*, especialmente pela presença de acetogeninas, que por esta característica apresentam-se como promissoras substâncias antitumorais (Alali *et al.*, 1999). Esta citotoxicidade, no entanto, foi observada na interação dos extratos avaliados no presente trabalho com macrófagos intraperitoneais de camundongos. O mecanismo de ação das acetogeninas se dá pelo bloqueio da respiração celular, a partir da inativação da enzima NADH desidrogenase, que representa o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (Esposti *et al.*, 1994).

Apesar da citotoxicidade observada *in vitro* aos macrófagos, extratos como os de caule e o extrato bruto da cultura de células em suspensão mostraram-se relevantes na redução da infecção de macrófagos por amastigotas de *L. braziliensis*. Como observado por Gonzáles-Coloma e colaboradores (2002), acetogeninas podem apresentar atividade seletiva. Quando avaliadas isoladamente, acetogeninas de anonáceas que apresentam-se tóxicas à epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* não mostram-se ativas contra células de mamíferos em cultivo *in vitro*, indicando que a atividade biológica destes compostos é influenciado por fatores estrutura-dependente das membranas ou a inativação biológica destes metabólitos.

De modo geral, os extratos obtidos *in vivo* e *in vitro* de *Annona mucosa* apresentaram atividade seletiva em cepas de bactérias Gram-positivas. Assim como em *A. mucosa*, o extrato

metanólico de *A. muricata* foi ativo na inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* (no presente trabalho, em *Bacillus thuringiensis*) e *Streptococcus pyogenes*, apresentando resultados comparáveis à droga controle utilizada no teste *in vitro*, estreptomicina (Pathak *et al.*, 2010). O extrato aquoso da mesma espécie também apresentou atividade seletiva para Gram-positivas, sendo ativa contra *S. auerus* (Vieira *et al.*, 2010). Do mesmo modo, extratos hexânico e em diclorometano de caule de *Polyalthia cerasoides* (Annonaceae), quando avaliados em 27 cepas foram ativos apenas em bactérias Gram-positivas, possuindo alto potencial inibitório em *B. subtilis* e *S. pyogenes* (Treeratanabipoon *et al.*, 2011).

Extratos em diclorometano das Anonáceas *Guatteria riparia* e *G. schomburgkiana*, bem como de outras 20 espécies de Mata Atlântica e da Floresta Amazônica apresentaram atividade inibitória ao crescimento apenas de bactérias Gram-positivas, não sendo ativas na inibição de Gram-negativas (Suffredini *et al.*, 2006). O potencial seletivo a Gram-positivas também foi avaliado para extratos metanólico e aquoso de raízes de *A. senegalensis*, que apresentaram atividade inibitória ao crescimento de *Staphylococcus aureus*, porém não de *Escherichia coli* (Gram-negativa), sendo pouco ativa também sobre *Pseudomonas aeruginosa* (Lino & Deogracious, 2006).

Alcaloides isoquinolínicos extraídos de Annonaceae também podem ser responsáveis pela inibição de cepas Gram-positivas. Extratos ricos em alcaloides e suas frações, obtidos a partir de extrato bruto de caule de *Annona hypoglauca* foram responsáveis pela inibição do crescimento de *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*. No entanto, a mesma atividade não é observada quando avaliados os extratos brutos do mesmo material, a partir de extração metanólica e em diclorometano (Rinaldi, 2007).

Mesmo não apresentando atividade antimicrobiana sobre algumas cepas, extratos de Annonaceae podem também atuar na modulação da resistência a drogas. Como observado por Costa e colaboradores (2008), o tratamento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à norfloxacino com óleo essencial de *Rollinia leptopetala* reduziu em quatro vezes a concentração inibitória mínima do antibiótico, a partir da inibição da bomba de efluxo responsável pela resistência.

A ausência da atividade inibitória no crescimento de bactérias Gram-negativas, a partir dos extratos obtidos *in vivo* e *in vitro* de *A. mucosa*, pode estar relacionada a características inerentes a este grupo. A limitação do número de antibacterianos efetivos contra bactérias Gram-negativas deve-se em grande parte à barreira de permeabilidade promovida pela membrana externa destes organismos, diminuindo o número de substâncias ativas quando comparado a bactérias Gram-positivas (Savage, 2001). Esta membrana atua como uma

barreira intrínseca para diversos agentes hidrofóbicos e macromoléculas. Os estudos sobre a atividade dos extratos avaliados, no entanto, podem ser ampliados a partir da utilização de substâncias permeabilizantes, como as obtidas de peptídeos ou esteroides modificados, que podem desestabilizar a membrana externa e promover a entrada das substâncias ativas dos extratos (Alakomi, 2007).

A partir dos potenciais medicinais observados para a atividade leishmanicida e antibacteriana seletiva, os extratos obtidos do material biotecnológico de *A. mucosa* deverão ser avaliados quanto à sua caracterização fitoquímica e isolamento de substâncias de interesse antiparasitário, como acetogeninas e alcaloides, bem como avaliações mais detalhadas sobre a atividade antiparasitária e antibacteriana da espécie.

## CONCLUSÕES

- ❖ A embebição de sementes de *A. mucosa* por 48h em água destilada e posterior inoculação em vermiculita embebida com solução nutritiva do meio MS mostrou-se como o protocolo eficiente na germinação *in vitro* e obtenção de plântulas axênicas da espécie, visando seu uso como fonte de explantes para a produção de metabólitos *in vitro*.
- ❖ A suplementação de Picloram e KIN em meio WPM, para o cultivo de explantes hipocotiledonares, mostrou-se ideal para a produção de calos friáveis, que podem ser subcultivados por período indeterminado e constituem material inicial de suspensões celulares.
- ❖ A obtenção de extratos metanólicos brutos do material obtido *in vitro* apresentou maior rendimento pelo processo de extração empregado em relação ao material cultivado *in situ*, com ênfase para as suspensões celulares, o que é extremamente vantajoso para espécies de longo ciclo de vida e recalcitrantes *in vitro*, como as arbóreas.
- ❖ Todos os extratos avaliados de *A. mucosa* mostraram-se eficientes na redução do crescimento de promastigotas de *L. braziliensis* *in vitro*, sendo que para o material cultivado *in vivo*, o extrato metanólico e a fração em diclorometano de folhas mostraram-se mais ativos, enquanto que para o material obtido *in vitro*, o extrato metanólico e a fração em diclorometano de culturas de células em suspensão foram mais ativos.
- ❖ O extrato bruto metanólico de caule e suas frações, a fração em diclorometano de folhas e o extrato metanólico de cultura de células em suspensão foram eficientes na redução da infecção em macrófagos por amastigotas de *L. braziliensis*, apesar da citotoxicidade observada para os macrófagos.
- ❖ De modo geral, os extratos de *A. mucosa* apresentam atividade antibacteriana seletiva, sendo o extrato bruto metanólico de caule, bem como o extrato bruto metanólico e a fração em diclorometano de folhas ativos na inibição do crescimento de *Streptococcus pyogenes*, ao passo que os extratos brutos metanólicos de calos foliares e da cultura de células em suspensão inibiram o crescimento de *Bacillus thuringiensis*.

- ❖ As atividades medicinais propostas para a avaliação do material produzido biotecnologicamente comparado com o material em condições naturais mostraram resultados positivos, constituindo o primeiro relato para *A. mucosa* tanto em relação à atividade leishmanicida quanto para o potencial antibacteriano.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, E.M. Plants: an alternative source for antimicrobials. **J. Appl. Pharmaceut. Sci.** n.6, p.16-20, 2011.
- ALALI, F.Q.; LIU, X.X.; McLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **J. Nat. Prod.** v.62, p.504-540, 1999.
- ALAKOMI, H.L. **Weakening of the Gram-negative bacterial outer membrane: A tool for increasing microbiological safety.** 2007. Tese (Dissertation in Microbiology) - University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2007.
- ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L.; NEVES, L.J. Estudo *in vivo* e *in vitro* de *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. visando a investigação de domácias. **Bradea**, v.6, n.49, p.427-430, 1996.
- ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L.; VIANA, V.R.C.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.4, n.1, p.35-46, 2001.
- ALBARELLO, N.; VIANA, V.R.C.; FIGUEIREDO, S.F.L. Características morfológicas do fruto, da semente e da plântula da espécie medicinal *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. - Annonaceae. **Rev. Bras. Farm.**, v.83, n.4, p.77-81, 2002.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J. Ethnopharmacol.** v.114, p.325-354, 2007.
- ALMEIDA, J.A.S. Da folha à obtenção de embriões somáticos de *Coffea*. **O Agrônômico**, Campinas, v.59, n.1, 2007.
- AMARAL, C.L.F. ; SILVA, A.B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Rev. Biotec. Ciência e Desenv.**, n. 30, p.55-59, 2003.
- AMPUERO, J.; MACÊDO, V.; MARSDEN, P. Características clínicas de leishmaniose tegumentar em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Bras. Med. Trop.**, v.39, n.1, p.22-26, 2006.
- ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais.** Planaltina: Embrapa, 2002.
- ANVISA. **Relatório de Atividades 2010.** Brasília: Anvisa, 2011.
- ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R.; CEZAROTTO, V.S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**, v.7, n.12, p.51-60, 2011.
- ASHTIANIA, F. ; SEFIDKONB, F. Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L. and *Atropa acuminata* Royle ex Miers plants. **J. Med. Plants Res.**, v.5, n.29, p.6515-6522, 2011.

ASSIS, T.F. ; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética em plantas**. Brasília: Embrapa, v.1, p. 331-353, 1998.

BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv. in Paras**, v.64, 2007.

BARBOZA, T.J.S. **Avaliação de diferentes meios de cultura na produção de calos friáveis de *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. – Annonaceae**. 2010. Monografia de Bacharelado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

BASANO, S. A. ; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.7, n.3, 2004.

BAYAT, M.; ZIA, M.; HAGHI, M.; HEMMATYAR, G.; TOGHYANI, M. Antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients in Urmia, Iran. **African J. Microbiol. Res.**, v.5, n.9, p.996-1000, 2011.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Seção1, p.2. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portariafito.pdf>>. Acesso: jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006b.

\_\_\_\_\_. **Manual de controle da Leishmaniose tegumentar americana**. Brasília, DF, Ministério da Saúde, 2000.

\_\_\_\_\_. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2 ed. Brasília, DF, Ministério da Saúde, 2007.

\_\_\_\_\_. **Programa Nacional de plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética em plantas**. Brasília, DF: Embrapa,1998. v.1, p.87-132.

CARVALHO, P.B. ; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v.72, p.599-618, 2001.

CHEN, Y.Y.; CHANG, F.R.; WU, Y.C. Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*. **J. Nat. Prod.**, v.59, n.9, p.904–906, 1996.

CHOI, Y.H.; YOO, K.P.; KIM, J. Supercritical fluid extraction and liquid chromatography-electrospray mass analysis of vinblastine from *Catharanthus roseus*. **Chem. Pharm. Bull.** v.50, n.9, p.1294-1296, 2002.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **J. of Ethnopharm.** v.126, p.159-175, 2009.

COSTA, V.C.O.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; FALCÃO-SILVA, V.S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M.A.R.; MARQUES, M.O.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; SILVA, M.S. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Rev. Bras. Farmacognos.**, v.8, n.2, p.245-248, 2008.

COSTA, V.C.O.; TAVARES, J.F.; QUEIROGA, C.S.; CASTELLO-BRANCO, M.V.S.; DINIZ, M.F.F.D.; LIMA, U.G.B.; SANTOS, B.V.; PITA, J.C.L.R.; SILVA, M.S. Constituintes químicos das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Quim. Nova**, v.35, p.138-142, 2012.

ESPOSTI, M.D.; GHELLI, A.; RATTA, M.; CORTES, D.; ESTORNELL, E. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). **Biochem. J.** v. 301, p. 161-167, 1994.

FERREIRA, M.G.R.; SANTOS, M.R.A.; SILVA, E.O.; GONÇALVES, E.P.; ALVES, E.U.; BRUNO, R.L.A. Superação de dormência em sementes de biribá (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill). **Rev. Bras. de Sem.**, v.31, n.4, p.95-99, 2009.

FÉRVRIER, A.; FERREIRA, M. E.; FOURNET, A.; YALUFF, G.; INCHAUSTI, A.; ARIAS, A. R.; HOCQUEMILLER, R.; WAECHTER, A. I. Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities. **Planta Med.**, v.65, p.47-49, 1999.

FIGUEIREDO, S.F.L.; VIANA, V.R.C.; SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; TRUGO, L.C.; KAPLAN, M.A.C.; KRUL, W.R. Lignans from leaves, seedlings and micropropagated plants of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. - Annonaceae. **Plant Cel. Tiss. Org. Cult.** v.56, p.121-124, 1999.

FIGUEIREDO, S.F.L.; SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; VIANA, V.R.C. *Rollinia mucosa* cell suspension cultures: establishment and growth conditions. **Plant Cel. Tiss. Org. Cult.**, v.63, p.85-92, 2000.

FIGUEIREDO, S.F.L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V.R.C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v.37, p.471-475, 2001.

FIGUEIREDO, S.F.L.; VIANA, V.R.C.; SIMÕES, C.; TRUGO, L.C.; KAPLAN, M.A.C. *Rollinia mucosa* (Jacq.) Bail.: establishment of callus culture and lignan production. **Rev. Cub. de Pl. Med.**, v.8, n.3, 2003.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multicidência**, n.7, 2006.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Agentes antimicrobianos n.15**. São Paulo: Insumos, 2010.

FRICK, S.; KRAMELL, R.; KUTCHAN, T.M. Studying morphine biosynthesis using transgenic opium poppy (*Papaver somniferum* L.). **Trad. Med. & Nutr.**, v.6, p.37-43, 2005.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GIL, E.S.; CUNHA, L.C.; PAULA, J.R.; BEZERRA, J.C. B.; AGUIAR, F.A. Leishmaníase: arsenal terapêutico e alvos moleculares. **Vita et Sanitas**, v.1, n.1, p.90-115, 2007.

GONTIJO, C.M.F. ; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.7, n.3, 2004.

GONZÁLES-COLOMA, A.; GUADAÑO, A.; INÉS, C.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R.; CORTES, D. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. **Z. Naturforsch.**, v.57c, p.1028-1034, 2002.

GU, Z.M.; ZHOU, D.; LEWIS, N.J.; WU, J.; SHI, G. McLAUGHLIN, J.L. Isolation of new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chromatography/Mass spectrum. **Bioorg. & Med. Chem.**, v.5, n.10, p.1911-1916, 1997.

GRAHAN, J.G.; QUINN, M.L.; FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **J. Ethnopharmacol.**, v.73, p.343-377, 2000.

HARTWELL, J.L. Plants used against cancer. **Lloydia**, v.30, 1967.

HASSLER, M.L. The importance of the units of conservation in Brazil. **Soc. & Nat.**, v.17, n.13, p.79-89, 2005.

HEYWOOD, V.H. ; DULLOO, M.E. **In situ conservation of wild plant species: a critical global review of best practices**. Roma: IPGRI, 2005. Technical Bulletin, n.11.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; VIEIRA, S.S.N. Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.36, n.11, p.1371-1379, 2001.

HONORATO, S.C.; LIMA, I.M.S.O.; FARIA, D.M. O ministério público e as Unidades de Conservação. **Nat. & Cons.**, v.8, p.81-83, 2010.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1983.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KIM, J. ; PARK, E.J. Cytotoxic Anticancer Candidates from Natural Resources. **Curr. Med. Chem.**, p.485-537, 2002.

KUO, R.Y.; CHEN, C.Y.; LIN, A.S.; CHANG, F.R.; WU, Y.C. A New Phenanthrene Alkaloid, Romucosine I, from *Rollinia mucosa* Baill. **Z. Naturforsch.**, v.59, p.334 – 336, 2004.

LINO, A. ; DEOGRACIOUS, O. The in-vitro antibacterial activity of *Annona senegalensis*, *Securidacca longipendiculata* and *Steganotaenia araliaceae* - Ugandan medicinal plants. **Afr. Health Sci.**, v.6, p.31-35, 2006.

LLOYD, G & McCOWN, B. Commercially – feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Int. Plant Prop. Soc. Proc.**, v.30, p.421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LOURENÇO, M.V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. **Biólogo**, v.65, n.1/2, p.63-65, 2003.

MADEIRA, M.F.; UCHÔA, M.A.; LEAL, C.A.; SILVA, R.M.M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C.M.; SERRA, C.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Rev. Soc. Bras. Med Trop.**, v.36, n.5, 2003.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK; D.P. **Microbiologia de Brock**. Traduzido de Brock Biology of Microorganisms. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **J. of Biom. and Biot.**, v.1, p.1-8, 2010.

MARIA, C.A.B. ; MOREIRA, R.F.A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Quim. Nova**, v.30, p.99-105, 2007.

MATOS, F.J.A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza, CE: Fortaleza Edições; UFC, 1988. 128p.

MATSUMOTO, K. **Cultura de células em suspensão: focalizando a bananeira**. Brasília,DF: Embrapa, 2006.

MISHRA, B.B.; SINGH, R.K.; SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, V.J.; TIWARI, V.K. Fighting against leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-leishmanial agents. **Mini-rev. in Med. Chem.**, v.9, p.107-123, 2009.

MISRA, H.; MEHTA, B.K.; JAIN, D.C. Optimization of extraction conditions and hptlc-uv method for determination of quinine in different extracts of *Cinchona species* bark. **Rec. Nat. Prod.**, v.2, n.4, p.107-115, 2008.

MOHAGHEGHZADEH, A.; FARIDI, P.; SHAMS-ARDAKANI, M.; GHASEMI, Y. Medicinal smokes. **J. of Ethnopharm.**, v.108, p.161-184, 2006.

MURASHIGE, T ; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, p.473-479, 1962.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v.366, p.1561-77, 2005.

NETO, L.G. ; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NIMGIRAWATH, S. Syntheses of (±)-Romucosine and (±)-Cathafiline. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v.28, n.6, p.1209-1215, 2006.

OCAMPO, D.M ; OCAMPO, R. Bioactividad de la familia Annonaceae. **Rev. Universidad de Caldas**, p.135-155, 2006.

OGBODO, S.O.; OGWUORU, C.D.C.; CHUKWURAH, E.F. Possible alternatives to reduce antibiotic resistance. **Life Sci. and Med. Res.**, v.24, p.1-9, 2011.

OSAKABE, Y.; MIYATA, S.; URAO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Y. Overexpression of *Arabidopsis* response regulators, ARR4/ATRR1/IBC7 and ARR8/ATRR3, alters cytokinin responses differentially in the shoot and in callus formation. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v.293, p.806-815, 2002.

OSORIO, E.J.; MONTOYA, G.L.; ARANGO, G.J. Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. **Vitae**, v.13, p.61-84, 2006.

PAIVA, P.M.G.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Curr. Res., Tech. and Edu. Topics in Appl. Microbiol. and Microbial Biotech.**, v.1, p.396-406, 2010.

PATHAK, P.; SARASWATHY, D.; VORA, A.; SAVAI, J. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of the leaves of *Annona muricata*. **Int. J. Pharma Res. Dev.**, v.2, p.1-6, 2010.

PENCE, V.C.; SANDOVAL, J.A.; VILLALOBOS, M.; ENGELMANN, F. ***In vitro* collecting techniques for germplasm conservation**. Roma: IPGRI, 2002. Technical Bulletin, n.7.

PINTOS, B.; MARTÍN, J.P.; CENTENO, M.L.; VILLALOBOS, N.; GUERRA, H.; MARTÍN, L. Endogenous cytokinin levels in embryogenic and non-embryogenic calli of *Medicago arborea* L. **Plant Science**, v.163, n.1, p.955-960, 2002.

PITTNER, E.; VOLTARELLI, E.; PERLES, T.F.; ARRAES, S.M.A.A.; SILVEIRA, T.G.V.; LONARDONI, M.V.C. Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de área endêmica no Estado do Paraná. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.561-565, 2009.

POLONIO, T. ; EFFERTH, T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (Review). **Int. J. of Mol. Med.**, v.22, p.277-286, 2008.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.Sr.-Hil. **Ann. Naturhist. Mus. Wien**, v.108, p.191-205, 2007.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

REYES, R.E.; ALVAREZ, A.L.; LOPEZ-RUBALCAVA, C.; ROCHA, L.; HEINZE, G.; MORENO, J.; MARTINEZ-VELASQUEZ, M. Lignans from leaves of *Rollinia mucosa*. **Z. Naturforsch.**, v.57, p.29-32, 2002.

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

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACÊDO, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomed.** v.12, p.514-535, 2005.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Antimicrobial Resistance.** v.52, p.1138-1143, 2011.

SADEGHI-ALIABADI, H.; ASGHARI, G.; MOSTAFAVI, S.A.; ESMAEILI, A. Solvent optimization on Taxol extraction from *Taxus baccata* L., using HPLC and LC-MS. **DARU**, v.17, n.3, p.192-198, 2009.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotec. Cien. & Des.**, n.20, p.60-65, 2001.

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm.**, v.13, p.64-70, 2004.

SANTOS, J.G.; ZUCOLOTO, M.; COELHO, R.I.; LOPES, J.C.; ALMEIDA, G.D. Germinação e crescimento de mudas de Biribazeiro {*Rollinia Mucosa* (Jack) Baill} no Brasil. **IDESIA**, Chile, v.27, n.2, p.55-59, 2009a.

SANTOS, A.M.G.; PINHEIRO, M.L.B.; SOUZA, A.D.L.; COSTA, E.V.; CAMPOS, F.R.; BARISON, A.; SOUZA, A.Q.L. Alcalóides das folhas de *Rollinia mucosa* (Annonaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza, CE: SBQ, 2009b.

SAVAGE, P.B. Multidrug-resistant bacteria: overcoming antibiotic permeability barriers of Gram-negative bacteria. **Ann. Med.**, v.33, p.167-171, 2001.

SIEBERER, T.; HAUSER, M.T.; SEIFERT, G.J.; LUSCHING, C. PROPORZ1, a putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. **Curr. Biol.**, v.13, p.837-842, 2003.

SHI, G.; GU, Z.M.; HE, K.; WOOD, K.V.; ZENG, L.; YE, Q. MacDOUGAL, J.M.; McLAUGHLIN, J.L. Applying Mosher's Method to Acetogenins Bearing Vicinal Diols. The Absolute Configurations of Muricatetrocin C and Rollidecins A and B, New Bioactive Acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Bioorg. & Med. Chem.**, v.4, n.8, p.1281-1286, 1996.

SHI, G.; MacDOUGAL, J.M.; McLAUGHLIN, J.L.; Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Phytochem.**, v.45, n.4, p.719-723, 1997.

SHIRIN, F.; HOSSAIN, M.; KABIR, M.F.; ROY, M.; SARKER, S.R. Callus induction in plant regeneration from internodal and leaf explants of four potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. **W. J. of Agr. Sci.**, v.3, n.1, p.1-6, 2007.

SILVEIRA, F.T.; MÜLLER, S.R.; SOUZA, A.A.A.; LAINSON, R.; GOMES, C.M.C.; LAURENT, M.D.; CORBETT, C.E.P. Revisão sobre patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Rev. Paraense de Med.**, v.22, p.9-20, 2008.

SOBERÓN, J.R.; SGARIGLIA, M.A.; SAMPIETRO, D.A.; QUIROGA, E.N.; VATTUONE, M.A. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. **J. of appl. Microbiol.**, v.102, p.1450-1461, 2007.

SOUZA, A.S. ; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das almas: Embrapa, 2006.

SOUZA, A.S.; SOUZA, F.V.D.; SANTOS-SEREJO, J.A.; JUNGHANS, T.G.; PAZ, O.P.; MONTARROYOS, A.M.V.; SANTOS, V.S.; MORAIS, L.S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa, 2009.

STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v.73, p.69-91, 2002.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. Antibacterial of brazilian amazon plant extracts. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.10, n.6, p.400-402, 2006.

SUNDAR, S. & CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis: current therapeutic modalities. **Indian J. of Med. Res.**, v.123, p.345-352, 2006.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TOLEDO, C.E.M.; BRITTA, E.A.; CEOLE, L.F.; SILVA, E.R.; MELLO, J.C.P.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachac, a as extractor liquid. **J. of Ethnopharm.**, v. 133, p.420-425, 2011.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa, 2000.

TREERATANABIPOON, L.; WORACHARTCHEEWAN, A.; SUKSRICHAVALIT, T.; KIATFUENGFOO, R.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive 4-hydroxycinnamide and bioactivities of *Polyalthia cerasoides*. **EXCLI J.**, v.10, p.16-22, 2011.

VANISREE, M.; LEE, C.Y.; LO, S.F.; NALAWADE, S.M.; LIN, C.Y.; TSAY, H.S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v.45, p.1-22, 2004.

VERMA, A.; LAAKSO, I.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; HUHTIKANGAS, A.; RIEKKOLA, M.L. A simplified procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* combined with a semi-synthetic production process for vinblastine. **Molecules**, v.12, p.1307-1315, 2007.

VIEGAS Jr. C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VIEIRA, G.H.F.; MOURÃO, J.A.; ÂNGELO, A.M.; COSTA, R.A.; VIEIRA, R.H.S.F. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.52, n.3, p.129-132, 2010.

VILA NOVA, N.S. **Ação leishmanicida de alcalóides e acetogeninas extraídas de Annonaceae do Estado de Ceará**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

WAECHTER, A.I.; YALUFF, G.; FHAUSTI, A.; de ARIAS, A.R.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; FOURNET, A. Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Acetogenins Isolated from *Annona glauca*. **Phytoter. Res.**, v.12, p.541-544, 1998.

WAECHTER, A. I.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R.; BORIES, C.; MUÑOZ, V.; FOURNET, A. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). **Phytoter. Res.**, v.13, p.175-177, 1999.

WANG, L.D.; QIU, D.Y.; CHEN, J.Y.; HAN, Y.F.; ZHENG, J.H.; GUO, D.A. Callus cultures of *Annona squamosa* for the production of annonaceous acetogenins. **J. of Asian Nat. Prod. Res.**, v.4, n.3, p.171 - 174, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional medicine**, n.134, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Acesso em: jan. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Combat antimicrobial resistance**: world health day, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/world-health-day/2011>>. Acesso em: jan. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Visceral leishmaniasis rapid diagnostic test performance, n.4, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/vl-rdt-evaluation.pdf>>. Acesso em: jan. 2013.