

INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E EFEITO CITOTÓXICO DE EXTRATO AQUOSO DE *ANNONA MURICATA L.****Clara dos Reis Nunes***

Mestranda em Produção Vegetal / UENF / RJ
Laboratório de Tecnologia de Alimentos / UENF / RJ
clara_biol@yahoo.com.br

William Rodrigues Freitas

Mestrando em Biociências e Biotecnologia / UENF / RJ
Laboratório de Biologia do Reconhecer / UENF / RJ
willlfreitas@hotmail.com

Thatiana Lopes Biá Ventura

Mestranda em Biociências e Biotecnologia / UENF / RJ
Laboratório de Biologia do Reconhecer / UENF / RJ
thativentura@yahoo.com.br

Milton Masahiro Kanashiro

Doutor em Biociências e Biotecnologia / UENF / RJ
Laboratório de Biologia do Reconhecer / UENF / RJ
kmilton@uenf.br

Michelle Frazão Muzitano

Doutora em Química de Produtos Naturais / UFRJ / RJ
Faculdade de Farmácia / UFRJ - Macaé
mfmuzitano@yahoo.com.br

Daniela Barros de Oliveira

Doutora em Química de Produtos Naturais / UFRJ / RJ
Laboratório de Tecnologia de Alimentos / UENF / RJ
dbarrosoliveira@uenf.br

RESUMO

Annona muricata L. é conhecida na medicina popular por sua ampla variedade de efeitos medicinais. A toxicidade de plantas da família Annonaceae é ainda pouco estudada, principalmente em relação aos componentes de seus frutos. A maioria dos trabalhos científicos realizados com estas plantas utiliza principalmente as folhas e aborda suas ações citotóxicas em ensaios biológicos *in vitro* enfatizando seus efeitos anti-tumorais. Nesse sentido, se observa uma alta prevalência do uso de *Annona muricata L.* em oncologia como tratamento coadjuvante, o que ressalta a importância de se conhecer os possíveis efeitos tóxicos relacionados ao seu uso. Como as propriedades biológicas de *Annona muricata L.* não são completamente conhecidas, o objetivo deste estudo foi investigar a capacidade inibitória da produção de óxido nítrico em macrófagos e o potencial citotóxico do extrato aquoso oriundo da polpa dos frutos sobre macrófagos murinos RAW 264.7 e células tumorais U937 através do teste de liberação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase e do teste com 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol. Nossos resultados mostram que a capacidade inibitória do extrato aquoso (500 µg/mL) na produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipolissacarídeo (LPS) foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos resultados obtidos em macrófagos controles, embora de forma não expressiva. O extrato aquoso não apresentou citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7 e células leucêmicas U937, não interferindo na viabilidade celular, o que sugere ausência de morte celular por necrose.

Palavras-chave: *Annona muricata L.*, Citotoxicidade; Óxido nítrico.

ABSTRACT

Annona muricata L. is known in folk medicine for its wide variety of medicinal effects. The toxicity of plants in the family Annonaceae is still little studied, especially in relation to the components fruit. Most scientific work on these plants using mainly covers the leaves and their cytotoxic actions in vitro biological assays emphasizing its anti-tumor effects. In this sense, we observe a high prevalence of *Annona muricata* L. oncology as adjuvant treatment, which underscores the importance of knowing the possible toxic effects related to its use. As the biological properties of *Annona muricata* L. are not completely understood, the purpose of this study was to investigate the inhibitory capacity of nitric oxide production in macrophages and cytotoxic potential of the extract aqueous coming from the pulp of the fruit on macrophages murine RAW 264.7 and U937 tumor cells by testing for release of cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase test and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazol. Our results show that the inhibitory capacity the extract aqueous (500 µg/mL) in the production of nitric oxide of the high (NO) in macrophages RAW 264.7 stimulated by lipolissacarídeo (LPS) was statistically significant ($p < 0.05$) when compared to the results obtained in macrophages controls, albeit not significant. The extract aqueous showed no cytotoxicity to macrophages RAW 264.7 and U937 leukemic cells, not affecting cell viability, suggesting the absence of cell death by necrosis.

Keyword: *Annona muricata* L.; Cytotoxicity; Nitric oxide.

1. INTRODUÇÃO

Estudos têm mostrado que o consumo de frutas e vegetais está associado com a redução de risco de muitas doenças relacionadas com elevados níveis de estresse oxidativo, tais como o câncer, aterosclerose e doenças neurovegetativas (BERNARDES et al., 2010; ALI et al., 2009; ARUOMA, 2003). O estresse oxidativo é um estado de vulnerabilidade do sistema de defesa em que há uma produção excessiva das espécies reativas do oxigênio (ERO), a qual supera a capacidade antioxidante de defesa do corpo, aumentando a predisposição para doenças infecciosas e degenerativas (SPADA et al, 2008).

Doenças pulmonares relacionadas a processos inflamatórios, como a tuberculose, podem ser agravados pela formação de radicais livres envolvendo lesões teciduais provocadas pela oxidação (HENRANDEZ-PANDO et al., 2009; SHAMI & MOREIRA, 2004). Compostos antioxidantes podem diminuir o estresse oxidativo, minimizando a incidência dessas doenças. Como a maioria das frutas são fontes de diversas substâncias antioxidantes, tais como vitamina C, β -caroteno e outros polifenóis (SPADA et al, 2008), a procura por novos agentes antioxidantes a partir de fontes vegetais usadas na dieta humana pode levar a descoberta de moléculas naturais com elevado potencial anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* e justificar o uso popular de tais espécies vegetais como anti-inflamatórias (FANG & LIU, 2002). Nesse sentido, se observa uma crescente concentração de esforços na pesquisa de produtos naturais advindos de plantas frutíferas.

Além disso, no âmbito do estudo das plantas medicinais é necessário verificar a existência de características desejáveis das plantas como a eficácia, baixa toxicidade para o ser humano, assim como um padrão de qualidade para que sejam manipuladas de forma segura como agentes terapêuticos (BARBOSA, 2009).

O Brasil tem se sobressaído como um respeitável produtor e consumidor de frutas, e a *Annona muricata* L., graviola, ocupa um lugar de destaque. Integrando a diversidade biológica da região de Campos dos Goytacazes - RJ e com proeminência na economia de frutos tropicais, a graviola possui substâncias fenólicas com ação antioxidante (BASKAR et al., 2007). É empregada, principalmente, na indústria de polpas alimentícias. A literatura etnofarmacológica registra vários usos medicinais baseados no senso comum, o qual lhe atribui várias propriedades, embora a eficácia e a segurança de suas preparações não

tenham sido todas, ainda, comprovadas cientificamente (BARON, 2010; LIMA, 2007; PEREIRA et al., 2004).

Nesse contexto, pouco se conhece sobre as propriedades tóxicas de plantas da família Annonacea, principalmente em relação aos frutos. Os estudos científicos, realizados com as mesmas, abordam seus efeitos citotóxicos *in vitro* dando ênfase aos efeitos anti-tumorais. Considerando a alta prevalência do uso de plantas da família Annonacea em oncologia, é de suma necessidade o conhecimento acerca dos possíveis efeitos tóxicos relacionados ao uso destas plantas (BARBOSA, 2009).

Diante da escassez de estudos sobre os frutos da gravioleira, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a capacidade do extrato aquoso dos frutos de *Annona muricata* L. em inibir a produção de óxido nítrico (como indicativo de atividade anti-inflamatória), bem como avaliar a citotoxicidade deste extrato aquoso através do teste de liberação da enzima citoplasmática Lactato Desidrogenase (LDH). Neste estudo investigamos também a ação do extrato aquoso dos frutos de *Annona muricata* L. sobre células tumorais, através de modelos *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do Material Vegetal

O material vegetal foi coletado no Município de Bom Jesus do Itabapoana – RJ (Latitude = -21° 08' 02". Longitude = 41° 40' 47") nos períodos de frutificação, os quais correspondem aos meses de dezembro a fevereiro. A exsiccata foi depositada sob o código H5488 no Herbário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

2.2 Preparo das Amostras

Para o preparo do extrato aquoso, os frutos de *Annona muricata* L. foram limpos, lavados com água destilada e separadas as suas partes (casca, semente e polpa). A polpa dos frutos foi submetida à extração com água na proporção de 75% (p/v) originando o extrato aquoso da polpa *Annona muricata* expresso (GS). O extrato aquoso, por sua vez, foi submetido à uma precipitação com etanol (1:1) e, em seguida, se obteve um sobrenadante (GSS) e um precipitado (GSP).

2.3 Cultivo celular

Macrófagos murinos peritoneais da linhagem celular RAW 264.7 e células leucêmicas humanas U937 foram obtidos da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), e cultivados a 37°C com 5% de CO₂ em DMEM-F12 suplementado com 10% SBF e gentamicina (50 µg/mL).

2.4 Avaliação da capacidade inibitória na produção de óxido nítrico em RAW 264.7

Células RAW 264.7 (5×10^5 células/mL) foram plaqueadas em placa de 96 poços (Corning Inc., Corning, NY, USA) na presença ou ausência do extrato aquoso (500µg/mL) diluídos em LPS (*Escherichia coli* 055:B5; Sigma, St. Louis, MO, USA). Após 24h de incubação, 50µL do sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação da produção de NO. Como controle negativo foi usado sobrenadante da cultura de macrófagos não tratado e não estimulado com LPS e como controle positivo macrófagos estimulados com LPS (1 µg/ml) e não tratados (ZHAO et al., 2008).

Nitrito, um metabólito estável de NO, foi determinado pelo método de Griess. Inicialmente, as amostras foram incubadas com um volume igual de reagente de Griess e a absorbância mensurada a 540nm. A concentração de nitrito total foi determinada por comparação com curva padrão de NaNO₂ (GRIESS, 1864).

2.5 Avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular em RAW 264.7 e células U937

Células RAW 264.7 (5×10^5 células/mL) foram cultivadas e estimuladas como descrito nos subitens 2.2.2.1 e 2.2.2.1 e incubadas por 24h e as células leucêmicas U937 (1×10^6 células/mL) foram incubadas com

o extrato aquoso nas concentrações finais de 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/ml, 125µg/mL e 62,5µg/mL por 48h (MUZITANO et al., 2006; BERNAS, T & DOBRUCKI, J., 2002)

O teste de citotoxicidade foi efetuado utilizando o ensaio de LDH e o de viabilidade celular através do ensaio de MTT. No ensaio de MTT com RAW 264.7 o percentual de viabilidade obtido foi convertido à percentual de citotoxicidade afim de comparação com o método de LDH. A liberação específica foi calculada de acordo com os controles (macrófagos não-tratados e estimulados como controle negativo e macrófagos tratados com 1% de Triton X-100 como controle positivo) (MUZITANO et al., 2006).

Sendo assim, para o MTT, ao final do período de incubação, 5 µl de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol (MTT, 5mg/ml) foi adicionado em cada poço e 2h depois o sobrenadante da placa foi removido e os cristais formados foram solubilizados por HCl (4mM) adicionado em isopropanol. A absorbância foi obtida a 570nm. (BERNAS, T & DOBRUCKI, J., 2002).

A liberação de LDH (enzima citoplasmática lactato desidrogenase) foi determinada utilizando 50µL do sobrenadante da cultura acrescido de 100µL de solução de alumen férrico e substrato, a 37°C por 3 min. Após, acrescentou-se 100µl da solução de NAD e fenasina metassulfato, mantendo-se a 37°C por 5 min (Kit comercial Labrax). A concentração de LDH, que representa uma indicação indireta de citotoxicidade, foi determinada colorimetricamente a 492nm. A liberação específica foi calculada como porcentagem dos controles (células não-tratadas como controle negativo e células tratadas com 1% de Triton X-100 como controle positivo) (LANTTO et al, 2009).

2.6 Análise Estatística

Os dados foram relatados pela média ± desvio padrão e avaliado por análise de variância One-Way ANOVA seguido por teste de Tukey, sendo considerado significativo $p < 0,05$ através do software GraphPad Prism 5.0. Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade inibitória do extrato aquoso na produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipolissacarídeo (LPS) foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos resultados obtidos em macrófagos controles, porém de forma não expressiva. Na concentração testada (500 µg/mL) o extrato aquoso inibiu $15,21 \pm 2,34$ % da produção de NO induzida por LPS (Figura 1).

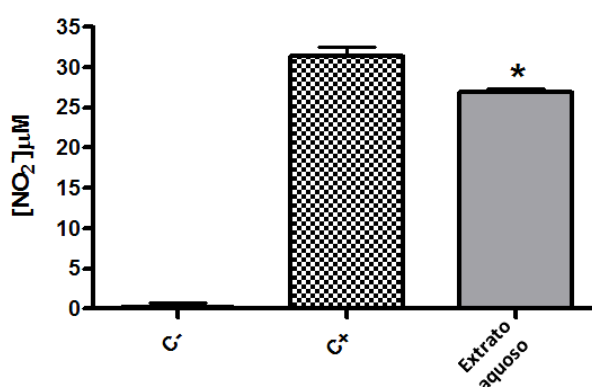


Figura 1: Avaliação da atividade inibitória do extrato aquoso (500 µg/mL) na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Como controle negativo foram usados macrófagos não-tratados e não-estimulados e como controle positivo macrófagos estimulados 1 µg/ml LPS e não-tratados. Média aritmética ± desvio padrão ($n = 3$). $p < 0.05$ (*) em relação ao controle positivo (ANOVA, Teste Tukey)

O extrato aquoso não apresentou citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7 e manteve sua porcentagem de liberação específica de LDH bastante similar ao observado para as células estimuladas por

LPS e não tratadas. Na Figura 2A pode-se observar que, enquanto o extrato aquoso apresentou $6,92 \pm 0,4\%$ de citotoxicidade, os macrófagos tratados com 1% de Triton X-100 apresentaram $100 \pm 4,95\%$.

Quanto às células U937, o extrato aquoso também não apresentou citotoxicidade, um indicativo de ausência de morte celular por necrose. A taxa de liberação de LDH para as culturas tratadas com Triton foi de 100%, as células controle e as tratadas com o extrato aquoso não apresentaram liberação específica de LDH estatisticamente significativa (Fig. 2B).

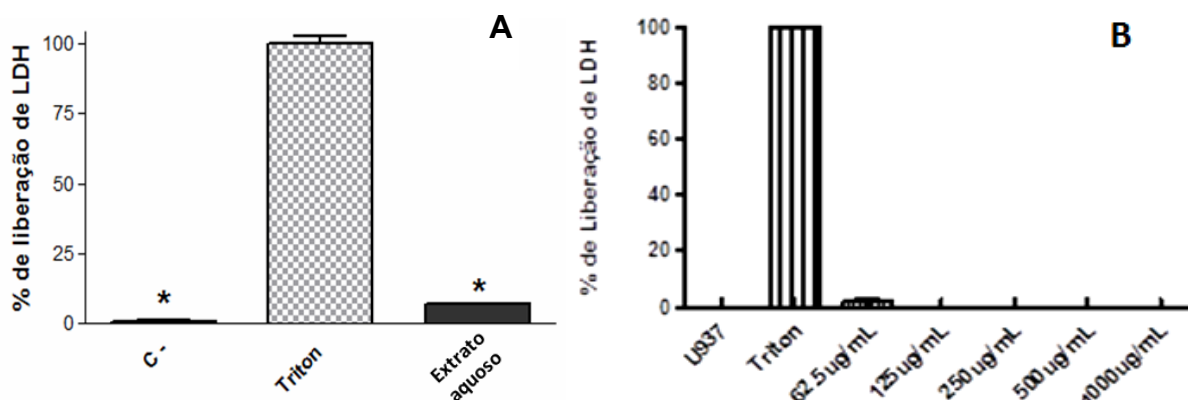


Figura 2: Citotoxicidade mensurada através da porcentagem de liberação específica de lactato desidrogenase. A) Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados e estimulados com 1.0 µg/ml de LPS por 24 h a 37 °C com ou sem o extrato aquoso (500 µg/mL). Média aritmética \pm desvio padrão (n = 3). $p < 0.001$ (*) em relação ao grupo não-tratado, controle negativo (0 µg/mL). B) Células U937 foram plaqueadas e incubadas com o extrato a 37°C por 48h. Foram utilizados como controle negativo células U937 não-tratadas e como controle positivo células U937 não-tratadas acrescidas de 10µL de uma solução de 10X Triton X-100 (ANOVA, Teste Tukey)

A lactato desidrogenase é uma enzima importante na rota metabólica celular. Atua na via de conversão do ácido láctico em ácido pirúvico e leva à produção de ATP. Encontra-se dispersa pelo citoplasma da grande maioria das células sendo liberada para o meio extracelular quando uma célula sofre danos em sua membrana plasmática. Sendo assim, a presença de LDH em um fluido ou meio extracelular é um indicativo de que houve morte celular seguida de rompimento de sua membrana, um processo patologicamente denominado de necrose (LANTTO et al, 2009; BALLS et al., 1992).

Os dados de citotoxicidade a partir da liberação específica de LDH do extrato aquoso foram confirmados através do método de metabolização do MTT, um método rápido, sensível e barato que permite avaliar a quantidade de células vivas em uma cultura, pois avalia a funcionalidade das mitocôndrias (BERNAS & DOBRUCKI, 2002). Este método consiste numa análise colorimétrica baseada na conversão do MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas, que permite dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas. Desta forma, o teste de MTT permite definir a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BARBOSA, 2009; MOSMANN, 1983).

Nos testes de metabolização do MTT o extrato aquoso não reduziu a viabilidade das linhagens celulares. Os macrófagos RAW 264.7 tratados com o extrato aquoso [500µg/mL] não apresentaram viabilidade estatisticamente diferente de macrófagos tratados com LPS (controle positivo) (densidade óptica: $1,55 \pm 0,15$ e $1,43 \pm 0,13$ respectivamente). Estes resultados estão ilustrados na Figura 3A.

O extrato aquoso também não interferiu na viabilidade das células tumorais U937. Os valores de densidade óptica obtidos para a viabilidade estão apresentados na Figura 3B, onde se pode observar que novamente não há diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade das culturas incubadas apenas com DMEM-F12 (controle positivo) e as células tratadas com o extrato aquoso na maior concentração. Esses dados indicam que o extrato aquoso não demonstrou efetividade *in vitro* no combate as células leucêmicas U937.

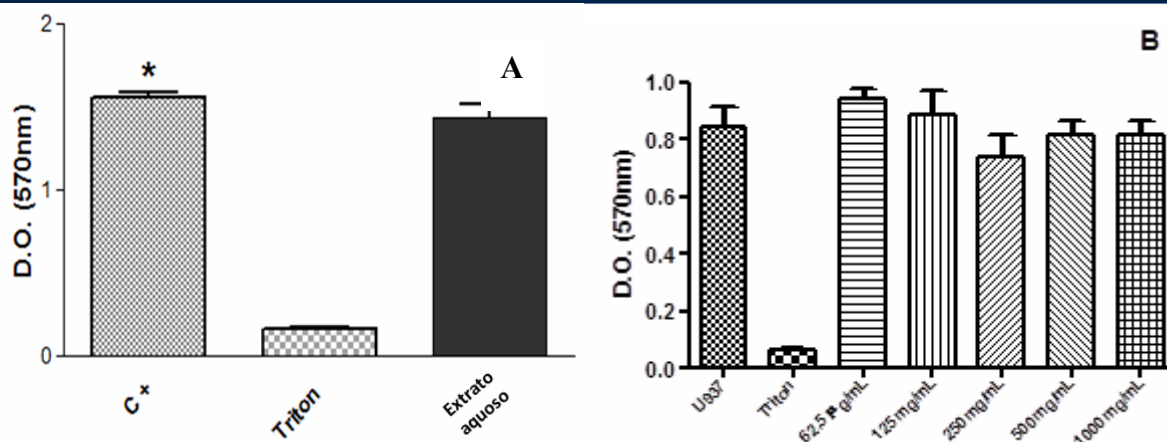


Figura 3: Testes de viabilidade do extrato aquoso em macrófagos RAW 264.7 e células leucêmicas U937 através do método de MTT 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol. A) Macrófagos RAW 264.7 (1×10^5 células/mL) e B) Células U937 (1×10^6 células/mL) foram incubadas respectivamente por 24 e 48 horas com o extrato aquoso e em seguida a viabilidade das culturas foi mensurada pelo teste de metabolização do MTT. Triton (células cultivadas apenas em meio de cultura mortas pela adição de triton 10X antes da adição do MTT) representa o controle negativo de viabilidade. Os valores de densidades ópticas (D.O.) foram obtidos por leitura das soluções formadas pela solubilização dos cristais de MTT e lidas em espectrofotômetro multicanal com comprimento de onda de 570nm. Média aritmética \pm desvio padrão ($n = 3$). $p < 0.05$ em relação ao grupo não-tratado ($0 \mu\text{g/mL}$), (ANOVA, Teste Tukey)

Considerando a alta prevalência do uso de plantas medicinais na área oncológica, os estudos realizados com as Annonaceae abordam seus efeitos citotóxicos *in vitro* dando ênfase aos efeitos antitumorais (BARQAWI et al., 2004).

Pesquisas relacionadas aos efeitos de outras partes desta planta, tais como folhas, cascas e sementes, apresentam resultados contrastantes aos obtidos no presente estudo (OBERLIES et al. 1995), uma vez que o extrato aquoso da polpa dos frutos avaliado neste trabalho não apresentou citotoxicidade.

Estudos *in vitro* com o objetivo de avaliar a citotoxicidade das Annonaceas têm demonstrado a inibição do crescimento de células tumorais humanas. JARAMILO et al. (2000) testaram a citotoxicidade de folhas de *A. muricata* obtendo resultados inibitórios em linhagens de células tumorais U937. Barbosa (2009) analisando o extrato hidroetanólico das folhas de *A. muricata* verificou uma alta toxicidade, sendo este resultado corroborado por Luna et al. (2006) em seus estudos com extratos etanólicos. Além disso, na avaliação da atividade antitumoral *in vivo* utilizando o sarcoma 180 em camundongos, o extrato foliar de *A. muricata* apresentou um percentual de 57% com uma dose de 30mg/Kg, sendo que na dose de 100 mg/Kg este extrato provocou 80% de mortes dos camundongos (BARBOSA, 2009).

Verifica-se ainda pesquisas com folhas, sementes e cascas de *A. muricata* em outras cepas tumorais como SF-295 (glioblastoma), HCT-8 (côlon) e MDA-MB-435 (mama), apresentando alta toxicidade, o que corrobora as informações acerca dos estudos realizados com substâncias ativas isoladas desta espécie chamadas de acetogeninas, as quais têm sido amplamente estudadas quanto à sua atividade citotóxica sobre linhagens tumorais (BARBOSA, 2009).

As acetogeninas isoladas das folhas de *A. muricata* demonstraram citotoxicidade sobre linhagens tumorais em ensaios *in vitro* (WU et al., 1995). A muricatacina (5-hidróxi-4-heptadecanolido) isolada das sementes apresentou promissora ação citotóxica nas células de linhagens tumorais de pulmão, de mama e de côlon (CAVÉ et al., 1997) e as acetogeninas anomuricina e muricapentocina mostraram seletividade quando testadas em linhagem de carcinoma pancreático (PACA-2) e adenocarcinoma de côlon (HT-29). Muricina H, muricina I e cis-anomontacina, também isoladas da semente, exibiram significativa atividade citotóxica contra as linhagens tumorais de hepatoma humano (LIAW, 2002).

Pesquisas relacionadas à atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico também mostraram que o extrato das folhas de *A. muricata* apresentou alta atividade no modelo de toxicidade para células normais, o que não foi observado no tratamento dos macrófagos murinos com o extrato aquoso da polpa dos frutos de *A. muricata* analisados no presente trabalho.

4. CONCLUSÃO

O extrato aquoso oriundo da polpa dos frutos de *Annona muricata* L. não apresentou citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 e em células leucêmicas U937, não interferindo na viabilidade celular, o que sugere ausência de morte celular por necrose. A atividade inibitória da produção de óxido nítrico do extrato aquoso oriundo da polpa dos frutos desta planta foi significativa em relação à inibição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipolissacarídeo, embora de forma não expressiva. Mediante esses resultados, observa-se a necessidade de purificação em busca de substâncias mais ativas que favoreçam a atividade observada e de testes mais aprofundados para verificar o mecanismo de ação antiinflamatória.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S. S., KASOJU, N., LUTHRA, A., SINGH, A., SHARANABASAVA, H., SAHU, A., BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, v. 4, p. 1–15, 2009.
- ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant action of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, v. 523, p. 9-20, 2003.
- BALLS, M. & CLOTHIER, R.H. Cytotoxicity assays for intrinsic toxicity and irritancy. In: *In Vitro Methods for Toxicology* (ed. R.R. Watson), p. 37-52, 1992.
- BARBOSA, C.V. Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL. Dissertação de Mestrado – Maceió – AL, Universidade Federal de Alagoas, 98 páginas, 2009.
- BARON, D. Desenvolvimento de plantas jovens de *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer (Araticum-de-terra-fria) cultivadas em solução nutritiva. Dissertação de Mestrado – Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista, 111 páginas, 2010.
- BARQAWI, A.; GAMITO, E.; O'DONNELL, C.; CRAWFORD, E.D. Herbal and vitamin supplement use in a prostate cancer screening population. *Urology*, v.63, n. 2, p. 288-92, 2004.
- BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T.S. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal Of Experimental Biology*, v. 45, n. 5, p. 480-485, 2007.
- BERNARDES, N. R.; PESSANHA, F. F.; OLIVEIRA, D. B. Alimentos Funcionais: Uma breve revisão. *Ciência e Cultura - Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB*, v.6, n. 2, Novembro, 2010.
- BERNAS, T; DOBRUCKI, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, v. 47, n. 4, p. 236-242, 2002.
- CAVÉ, A.; FIGADERE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. Progress in the chemistry of organic. *Natural Products*; Herz, W.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Steglich, W.; Tamm, Ch., Eds; Springer-Verlag: New York, v. 70, p. 81-288; 1997.
- FANG, Y. N. ; LIU, G. T. Effect of isorhapontigenin on respiratory burst of rat neutrophils. *Phytomedicine*, v.9:, p. 734-738, 2002.
- GRIESS, J. P. Philos. Trans. R. Soc. Lond. 154: 679. / A.C. Bratton, E.K. Marshall Jr., *Journal of Biology and Chemical* 128 (1939), v. 537, 1864.
- HERNANDEZ-PANDO, R.; OROZCO, H.; AGUILAR, D. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, v. 57, p. 355-367, 2009.
- JARAMILLO, M.C.; ARANGO, G.J.; GONZALEZ, M.C.; ROBLEDO, VELEZ, I.D. Citotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*, v. 71, p. 183-186, 2000.

- LANTTO, T. A.; DORMAN, H.J. D.; SHIKOV, A. N.; POZHARITSKAYA, O. N.; MAKAROV, V.G.; TIKHONOV, V. P.; HILTUNEN, R.; RAASMAJA, A. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry*, v. 112, p. 936–943, 2009.
- LIAW, C.C.; CHANG, F. R.; LIN, C.Y.; CHOW, C. J.; CHIU, H. F.; WU, M. J. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, v. 65, n.4, p. 470-75, 2002.
- LIMA, M. D. Perfil cromatográfico dos extratos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência. Dissertação de Mestrado – Maceió – AL, Universidade Federal de Alagoas, 102 páginas, 2007.
- LUNA, J. S.; CARVALHO, J. M.; LIMA, M. R. F.; BIEBER, L. W.; BENTO, E. S.; FRANCK, X.; SANT'ANA, A. E. G. Acetogenins in *Annona muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides. *Natural Product Research*, v. 20, n.3, p. 253-257, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUZITANO, M. F.; TINOCO, L. W.; GUETTE, C.; KAISER, C. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Assessment of antileishmanial activity of new and unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2071-2077, 2006.
- OBERLIES, N.H.; JONES, J.L.; CORBETT, T.H.FOTOPOULOS, S.S.; MECLAUGHLIN, J.L. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Letters*, v. 96, p. 55-62, 1995.
- PEREIRA, R.C.; OLIVEIRA, M.T.R.; LEMOS, G.C.S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.14, n. 01, p. 40-44, 2004.
- SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.
- SPADA, P. D. S.; DE SOUZA, G. G. N.; BORTOLINI, G. V.; HENRIQUES, J. A. P. & SALVADOR, M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. *Journal Of Medicinal Food*, v. 11, n. 1, p. 144-151, 2008.
- WU, F. E.; LU, Z.; GU, Z. M.; ZHAO, Z.X.; ZHANG, Y.; SCHWEDLER, J. T.; MCLAUGHLIN, J. L. New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, annomuricin c and muricatocin c, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, v. 58, n. 6, p. 909-915, 1995.
- ZHAO, L.; ZHANG, S-L.; TAO, J-Y.; PANG, R.; JIN, F.; GUO, Y-J.; DONG, J-H.; YE, P.; ZHAO, H-Y.; ZHENG, G-H. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-O -galloyl-3,6-(R)- hexahydroxydiphenoyl-D -glucose) in vitro. *International Immunopharmacology*, v. 8, p. 1059–1064, 2008.