

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Marta Maria Caetano de Souza

Avaliação da atividade ovicida de *Annona squamosa*
Linnaeus sobre o nematóide *Haemonchus contortus*
Rudolphi e toxicidade em camundongos

Fortaleza-Ceará
Dezembro de 2003

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Marta Maria Caetano de Souza

Avaliação da atividade ovicida de *Annona squamosa*
Linnaeus sobre o nematóide *Haemonchus contortus*
Rudolphi e toxicidade em camundongos.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua

Fortaleza, Ceará
Dezembro de 2003

5719 Souza, Marta Maria Caetano

Avaliação da atividade ovicida de *Annona squamosa* Linnaeus sobre o nematóide *Haemonchus contortus* Ruldophi e toxicidade em camundongos / Marta Maria Caetano de Souza.

100p, 30cm

Orientadora: Claudia Maria Leal Bevilaqua

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias).
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1.*Annona squamosa* 2.ovicida 3.*Haemonchus contortus*.

I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho: Avaliação da atividade ovicida de *Annona squamosa* Linnaeus sobre o nematóide *Haemonchus contortus* Rudolphi e toxicidade em camundongos.

Autor: Marta Maria Caetano de Souza

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua
Orientadora

Profa. Dra. Selene Maia de Moraes
Co-orientadora /Examinadora

Prof. Dr. Hécio Resende Borba
Examinador

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua por sua orientação e dedicação, requisitos fundamentais para a realização desse trabalho.

À professora Dra. Selene Maia de Moraes, por sua importante contribuição, no seu papel de co-orientadora.

À professora Dra. Diana Célia Nunes-Pinheiro, por colaborar em etapas importantes para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Cláudio Cabral por sua amizade e contribuição para a finalização do projeto.

Ao professor Olivardo Facó por sua colaboração.

À professora Verônica Batista, por sua amizade e contribuição para a realização do projeto.

À professora Dra. Andrelina, por seus ensinamentos que foram de grande importância para o direcionamento do trabalho.

À todos os alunos e mestrandos do Laboratório de Química em Produtos Naturais, que contribuíram com seus conhecimentos e trabalho e mostraram-se bons amigos, em especial (Ana Raquel, Kelly, Jarson, Everardo, Eduardo, Joana, Cristiane, Higina, Ricardo).

À todos os alunos e mestrandos do Laboratório de Imunologia, que me acolheram juntamente com a professora Diana Célia, contribuindo para o término desse trabalho, em especial (Ana Karine Leite, Iraína, Vivina, Viviane, Luziana, Cláudio, Juliana, Giovana).

À todos os colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias do PPGCV, que me ajudaram na realização desse projeto e estiveram ao meu lado durante este período, em especial (Cícero, Lucilene, Ana Loudes, Iarle, Micheline, Ana Carolina e Profa. Claudia).

À todos os colegas do mestrado em Ciências Veterinárias do PPGCV, que fizeram parte dessa caminhada de dois anos, passando juntos por mais uma etapa no caminho da nossa realização profissional.

À minha querida amiga Ana Karine Rocha de Melo Leite, por sua verdadeira amizade e sua grande colaboração no projeto, superando comigo muitas dificuldades ao longo desses dois anos.

Ao meu querido amigo Cícero Temístocles Coutinho Costa, por sua enorme contribuição e verdadeira amizade ao longo desses dois anos.

Às Médicas Veterinárias do Laboratório de Patologia Clínica da FAVET: Irene, Raquel, Ivanilde e Profa. Telma, com as quais compartilhei do mesmo ambiente de trabalho e pude contar com a amizade e colaboração.

À Auzenira e Adriana Albuquerque, secretárias do PPGCV, que em muito me ajudaram durante todo o tempo do mestrado.

À Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP) pelo financiamento da bolsa durante o período de dois anos.

À minha família que sempre me apoiou, principalmente nos momentos difíceis da realização deste trabalho, em especial a **Edineuza Caetano de Souza**, exemplo de mãe dedicada.

Ao meu grande amor e amigo, **Renato Irineu Moraes de Araújo**, que me acompanhou durante esta caminhada.

Aos meus queridos amigos caninos Doc e Fofinha, que me proporcionaram momentos agradáveis de descontração ajudando a superar os momentos difíceis.

Resumo

O parasitismo causado pelo nematóide *Haemonchus contortus* tem sido uma das grandes causas de perdas econômicas na produtividade de pequenos ruminantes. A ampla utilização de anti-helmínticos comerciais ocasionou a resistência anti-helmíntica, sendo um entrave no tratamento das parasitoses. A fitoterapia vem assumindo uma posição importante nas pesquisas científicas sobre produtos com efeito anti-helmíntico. O objetivo geral do trabalho foi avaliar o potencial anti-helmíntico de *A. squamosa* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos. Para a obtenção dos extratos foram utilizadas sementes de *A. squamosa*, as quais passaram por diferentes soluções, tais como: mistura de metanol/água, acetato de etila e solução aquosa. Após evaporação das soluções foram obtidos os extratos metanol/água, acetato de etila (EAC) e aquoso (EA), respectivamente. O EAC foi submetido à cromatografia de camada delgada e a ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e espectrofotometria de massa. Os extratos metanol/água, EA e EAC e as frações obtidas do EAC foram utilizados no teste de inibição de eclosão de ovos (TEO) de *H. contortus*. O EAC foi utilizado para os testes de toxicidade aguda em camundongos. As acetogeninas identificadas foram Squamosina e Isosquamosina. O EAC inibiu em 99% a eclosão de ovos de *H. contortus* na concentração de 5 mg ml^{-1} , bem como as frações testadas. A DL_{50} do EAC por via oral e intraperitoneal foi de 433 mg ml^{-1} e $3,63 \text{ mg ml}^{-1}$ respectivamente. *A. squamosa*, mostrou um promissor efeito anti-helmíntico sobre *H. contortus*, no entanto são necessários estudos complementares de atividade anti-helmíntica in vivo e outros testes de toxicidade para o uso seguro da planta.

Abstract

The nematode parasitism is one of the causes of loss in the productivity of small ruminant. *Haemonchus contortus*, is an abomasal nematode of high prevalence and pathogenicity for sheep and goats. The wide and incorrect use of synthetic anthelmintics is the cause of resistance development populations, and is the major obstacle to the treatment of parasitosis. Besides resistance, anthelmintics are expensive and left residue in food. These problems made necessary the use of alternative products. The fitotherapy is important in scientific research about anthelmintic plants. The aim of this work was to evaluate the anthelmintic effect of *A. squamosa* against gastrointestinal nematodes.

To obtain the extracts, the power of seeds of *A. squamosa*, stayed in methanol/water solution for seven days. After evaporation of this solution, the aqueous and ethyl acetate extracts (EAE), were obtained. The EAE was submitted to chromatography treatment to isolate the acetogenins which were identified by RMN of ^1H e ^{13}C and spectrometry of mass. The methanol/water, aqueous and EAE extracts and the acetogenins were used in egg hatch test (EHT) of *H. contortus*. The EAE was used to acute toxicity test in mice by oral and intraperitoneal route. The acetogenins identified were Squamosina and Isosquamosina. The EAE showed the greater percentage in EHT, of 99% in 5 mg ml^{-1} , and the acetogenins the same result. The LD_{50} of EAE was 433 mg ml^{-1} and $3,63\text{ mg ml}^{-1}$ by oral and intraperitoneal route respectively. *A. squamosa* has a promissor anthelmintic effect against *H. contortus*, however in vivo tests and other toxicity study are needed to ensure the use of this plant.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

INTRODUÇÃO -----	15
REVISÃO DE LITERATURA -----	16
1) Plantas Medicinais-----	16
2) Plantas com atividade anti-helmíntica na Medicina Veterinária -----	17
3) Família Annonaceae -----	19
4) Estrutura Química das acetogeninas das Annonaceas-----	19
4.1) Mecanismo de ação das acetogeninas-----	20
4.1.1.) Complexo Mitocondrial I-----	20
4.2) Relação estrutura-atividade e feitos das Acetogeninas -----	22
5) <i>Annona squamosa</i> -----	24
5.1) Utilizações de <i>A. squamosa</i> -----	25
5.2) Componentes de <i>A. squamosa</i> e seus efeitos -----	25
5.3) Estudos da atividade anti-helmíntica de <i>A. squamosa</i> -----	27
5.4) Testes de avaliação de anti-helmínticos -----	28
5.5) Estudos de toxicidade aguda com plantas-----	29
5.6) Estudos de toxicidade aguda com Annonaceas-----	31
JUSTIFICATIVA -----	32
OBJETIVOS -----	33
Objetivo Geral -----	33
Objetivos Específicos -----	33
METODOLOGIA -----	34
1) Obtenção das sementes de <i>A. squamosa</i> -----	34
2) Obtenção dos extratos da planta-----	34
3) Isolamento das acetogeninas a partir do extrato acetato de etila da <i>A. squamosa</i> ---	34
4) Análise fitoquímica do extrato acetato de etila de <i>A. squamosa</i> -----	35
5) Parasitos -----	35
6) Teste <i>in vitro</i> de eclosão de ovos de <i>H. contortus</i> -----	35

7) Teste de toxicidade aguda com extrato acetato de etila de <i>A. squamosa</i> -----	36
7.1) Animais -----	36
7.2) Toxicidade aguda de <i>A. squamosa</i> -----	36
8) Análise estatística -----	37
RESULTADOS -----	38
DISCUSSÃO -----	48
CONCLUSÕES GERAIS -----	52
PERSPECTIVAS -----	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	54

ANEXOS

ANEXOS I- Fluxograma da extração de acetogeninas a partir do extrato acetato de etila de *Annona squamosa*

ANEXO II- ARTIGO I: Effect of the seed extracts and acetogenins of *Annona squamosa* Linn on the egg hatch test of *Haemonchus contortus*

ANEXO III- ARTIGO II: Avaliação da toxicidade do extrato acetato de etila de *Annona squamosa* em camundongos

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Percentual de inibição de eclosão de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> com extratos de <i>Annona squamosa</i>	41
TABELA 2. Percentual de inibição de eclosão de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> com extrato acetato de etila e acetogeninas de <i>Annona squamosa</i>	42
TABELA 3. Valores de CE50 para os extratos e acetogeninas de <i>Annona squamosa</i>	42
TABELA 4. Toxicidade aguda do extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i>	43
TABELA 5. Efeito extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> do sobre o peso corporal de camundongos, após 24 horas e 7 dias da administração intraperitoneal.	44
TABELA 6. Efeitos do extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal.	44
TABELA 7. Efeitos do extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos, após 7 dias da administração intraperitoneal.	45
TABELA 8. Variáveis hematológicas e bioquímicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> após 24 horas da administração intraperitoneal.	45
TABELA 9. Variáveis hematológicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> após 7 da administração intraperitoneal.	46
TABELA 10. Variáveis bioquímicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> após 7 da administração intraperitoneal	46
TABELA 11. Efeito do extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> sobre o peso corporal de camundongos, após 24 horas e 7 dias da administração oral.	47
TABELA 12. Efeito do extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos, após 7 dias da administração oral.....	47
TABELA 13. Efeitos do extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos, após 24 horas da administração oral.	48
TABELA 14. Variáveis hematológicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> após 7 dias da administração oral.	48
TABELA 15. Variáveis bioquímicas e hematológicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> após 24 horas da administração oral.....	49
TABELA 16. Variáveis bioquímicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de <i>Annona squamosa</i> após 7 dias da administração oral.	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Modelos de estruturas químicas das acetogeninas.....	20
FIGURA 2. Cadeia de transporte de elétrons representando os complexos I, II, III e IV.	23
FIGURA 3. Folhas e flores de <i>A. squamosa</i>	26
FIGURA 4. Frutos de <i>A. squamosa</i>	26
FIGURA 5. Estrutura química das acetogeninas isoladas do extrato acetato de etila.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALT- Alanina amino transferase
AST- Alanina aspartato transferase
ATP-Adenosina tri fosfato
CE50- Concentração efetiva 50
CEME- Central de Medicamentos
CHCL₃- Clorofórmio
CR- Cadeia respiratória
DL50- Dose letal 50
EAC-Extrato acetato de etila
EAE- Ethyl Acetate Extract
EC50- Concentração efetiva 50
EHT- Egg Hatch Test
EtOAc-Acetato de etila
FAD-Flavina adenina nucleotídeo
FECRT- Teste de redução de contagem de ovos nas fezes
FMN- Flavina mononucleotídeo
HCL- Ácido clorídrico
HIV- Virus da Imundeficiência Humana
H₂S-Ácido sulfídrico
KOH- Hidróxido de potássio
MeOH/H₂O- metanol/água
NAD- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH- NAD reduzido
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
OMS- Organização Mundial de Saúde
pH-Potencial hidrogeniônico
TEO- Teste de eclosão de ovos
THF-Tetrahidrofurano
TLC- Thin layer chromatography

INTRODUÇÃO

O parasitismo por nematóides gastrintestinais constitui-se numa das maiores causas de redução na produtividade de rebanhos de pequenos ruminantes. A verminose de caprinos na região Nordeste do Brasil é uma das principais causas de mortalidade desses animais principalmente dos jovens, sendo responsável pelo aparecimento de anemia em mais de 70% do rebanho (PINHEIRO, 2000). O parasito abomasal *Haemonchus contortus* possui alta patogenicidade e alta prevalência, principalmente no período chuvoso (GIRÃO *et al.*, 1992; AROSEMENA *et al.*, 1999).

O controle dos parasitos gastrintestinais é feito quase que exclusivamente pela utilização de anti-helmínticos sintéticos (CHARLES, 1995). Os anti-helmínticos disponíveis no comércio deixam resíduos nos alimentos (WALLER *et al.*, 1995; HERD, 1995) além de impor risco de poluição ambiental.

O desenvolvimento de populações de nematóides resistentes a anti-helmínticos é uma realidade no Nordeste brasileiro (VIEIRA & CAVALCANTE, 1999 a; MELO *et al.*, 2003), sendo um dos mais importantes e atuais problemas do controle dos parasitos. O alto custo dos produtos comerciais é uma das causas que levam muitos criadores a não medicar adequadamente seu rebanho (MENEZES, 1992). Tendo em vista esses entraves, torna-se necessária a busca de outras alternativas para o controle de nematóides gastrintestinais. Dependendo da eficácia, os fitoterápicos podem oferecer uma alternativa para minimizar alguns dos problemas citados, sendo as espécies botânicas uma fonte clássica de produtos naturais que contém compostos químicos os quais podem provocar reações nos organismos (MARTINS, 1992).

REVISÃO DE LITERATURA

1. Plantas Medicinais

A utilização de plantas no combate de doenças vêm desde o início da civilização, e continua até os dias atuais. As plantas já eram utilizadas por nossos ancestrais e muitas delas já tiveram seu valor medicinal comprovado.

A planta dita medicinal é aquela que contém um ou mais princípios ativos que conferem atividade terapêutica (MARTINS, 1992). O uso de plantas medicinais no Brasil vem crescendo substancialmente nos últimos anos, haja vista a facilidade de acesso, o baixo custo e sua compatibilidade cultural, principalmente na região Nordeste (NOGUEIRA *et al.*, 1996).

A fitoterapia é reconhecida como o método de tratamento de enfermidades que utiliza vegetais, drogas vegetais ou extratos vegetais provenientes dessas matérias-primas. Os fitoterápicos são os medicamentos obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais, os quais correspondem a uma mistura complexa de substâncias (OLIVEIRA e AKISUE, 1998).

Num contexto geral, das 119 drogas derivadas de plantas em uso na atualidade, 74 % são de plantas utilizadas anteriormente na medicina popular e que tiveram seus princípios ativos isolados e esclarecidos. Dentre estes podemos citar exemplos, como os efeitos antimaláricos da quinina isolada da *Cinchona ledgeriana*, os anti-hipertensivos e agentes tranqüilizadores como reserpina isolada da planta indiana *Rauvolfia serpentina* (L.) e os analgésicos, codeína e morfina, da *Papaver somniferum*, dentre outros (TURNER, 1996).

A fitoterapia avançou em 1978, quando a OMS deu início a um programa dando ênfase ao uso de plantas medicinais, e cujo objetivo era alcançar a meta de saúde para todos no ano 2000. No Brasil, a CEME elaborou a lista de plantas selecionadas para a pesquisa de suas propriedades medicinais, porém muito ainda falta para se realizar o controle de qualidade dos fitoterápicos, para sua utilização segura (OLIVEIRA e AKISUE, 1998). Além disso muitas das espécies de plantas originárias no Brasil permanecem sem estudos químicos e estas representam no contexto mundial um importante potencial econômico (RATES, 2000).

2. Plantas com atividade anti-helmíntica na Medicina Veterinária

Em contraste à medicina humana, a fitoterapia não é tão desenvolvida na medicina veterinária (HAMMOND *et al.*, 1997).

GIRÃO *et al.* (1992), relataram que dentre as espécies de plantas utilizadas no tratamento de várias doenças, algumas são conhecidas como anti-helmínticas. Entretanto, poucas foram avaliadas cientificamente (HAMMOND *et al.*, 1997). Várias plantas utilizadas na medicina veterinária tradicional foram relacionadas em um encontro de membros de países asiáticos e dentre as 223 plantas descritas, 23 foram usadas como anti-helmínticas.

HAMMOND *et al.* (1997) verificaram que o óleo de *Chenopodium* (mastruz) foi útil no controle de *Ascaris* de cavalos e suínos, *Toxocara* spp de cães, e *Strongylus* spp de cavalos. A arecolina, um alcalóide da semente de *Areca catechu*, foi amplamente usada contra cestódeos de cães e de aves domésticas, como descrito no Códex Veterinário Britânico.

AMORIM *et al* (1996) testaram extratos aquosos de epicarpo de *Punica granatum* (romã) sobre as larvas de nematóides gastrintestinais de bovinos, obtendo mortalidade de 84% confirmando os estudos de ALMEIDA (1993) que verificou um potente efeito tenífugo da planta. HUKKERI *et al* (1993), verificaram o efeito anti-helmíntico dos extratos aquosos da polpa e da casca da *P. granatum* sobre *Taenia solium* e *Ascaridia galli*.

Estudos realizados com extratos das folhas da *Alstonia boonei* e das cascas de *Nauclea latifolia* sobre *Trichostrongylus colubriformis*, demonstraram um efeito paralisante sobre as larvas de terceiro estágio desse parasito (ASUZU e NJOKU, 1996).

BATISTA *et al.* (1999) testaram infusos de *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* sobre a eclosão de ovos de *H. contortus* concluindo que a concentração inibitória de 50 % dos ovos foi de 0,17 mg/mL para *S. anthelmia* e de 0,1mg/mL para *M. charantia*. Estes resultados demonstraram boas possibilidades da utilização de plantas no controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

VIEIRA & CAVALCANTE (1999b) testaram plantas tidas como anti-helmínticas sobre o nematóide *H. contortus*, sendo estas *Allium sativum*, *Carica papaya*, *Musa acuminata*, *M. charantia*, *Annona squamosa*, *Menta sp*, *Chenopodium ambrosioides* e *Hymenaea courbaril*. O teste de redução na contagem de ovos nas fezes mostrou que os

maiores percentuais de inibição foram com *Menta* sp 72%, *M. charantia* 40%, *Canavalia brasiliensis* 36%, estando as demais inferiores a esta taxa e ainda com relação a eficácia contra vermes adultos apenas *Canavalia brasiliensis* e *A. squamosa* mostraram maiores índices de mortalidade, sendo de 17,6% e 30,4% respectivamente.

Estudos com o óleo essencial de *C. ambrosioides* demonstraram efeito ovicida sobre *H. contortus*, obtendo nas concentrações de 3,33 e 1,33µL/mL resultados semelhantes ao controle positivo, com o tiabendazol (2 µg/mL) (KETSIIS *et al.*, 2002).

ALAWA *et al.* (2003) utilizaram extratos das folhas da *Vernonia amygdalina* e as cascas de *Annona senegalensis* sobre a eclosão de ovos de *H. contortus*. Os resultados dos testes de inibição de eclosão dos ovos de *H. contortus* por *V. amygdalina* foram insatisfatórios, mesmo na mais elevada concentração de 11,2 mg/ml. *A. senegalensis* mostrou resultados superiores demonstrando possuir propriedades anti-helmínticas.

PESSOA *et al.* (2002), testaram o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e do seu principal constituinte, o eugenol, sobre a eclosão de ovos de *H. contortus*. O óleo essencial e o eugenol apresentaram 100% de inibição na concentração de 1% e 95,43% e 92,45% de inibição na concentração de 0,25%, respectivamente. Outras plantas também foram avaliadas sobre *H. contortus*, sendo elas, *Croton zehntneri* e seu principal constituinte o anetol, *Lippia sidoides* e a *Azadirachtina*, constituinte da *Azadirachta indica*, apresentando uma taxa de inibição de eclosão de ovos de 100%; 100%; 90,91% e 68,30% respectivamente (PESSOA, 2001).

PADJAMA *et al.* (1993) avaliaram os efeitos antibacteriano, antifúngico e anti-helmíntico das raízes e cascas da *Uvaria hookeri* e *Uvaria narum*. Com relação aos efeitos anti-helmínticos os testes foram realizados com a forma adulta do parasito *H. contortus*, obtendo com as duas plantas resultados semelhantes aos do controle positivo, com o mebendazol.

3. Família Annonacea

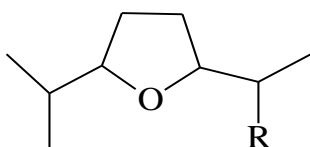
A família Annonacea inclui aproximadamente 50 gêneros, onde dois deles são comercialmente importantes: o gênero *Annona* que compreende cerca de 100 espécies e *Rollinia* com cerca de 50 espécies. Dentre as espécies do gênero *Annona* comercialmente

importantes tem-se *Annona cherimoya* Mill, a híbrida *A. atemoya* (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.), *A. squamosa* L. e *Annona muricata* L. (RASAI, 1995).

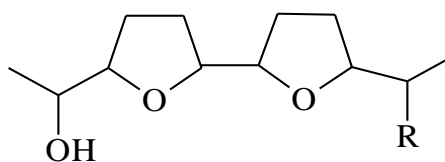
As Annonaceas caracterizam-se principalmente por apresentarem uma classe de substâncias denominadas acetogeninas. As acetogeninas são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa combinados com uma unidade 2-propanol, sendo aparentemente de origem policetídica (C₃₅-C₃₇), possuindo ou não anéis tetrahydrofurano e um terminal γ -lactona (HOPP *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2002).

4.0. Estrutura química das acetogeninas das Annonaceas

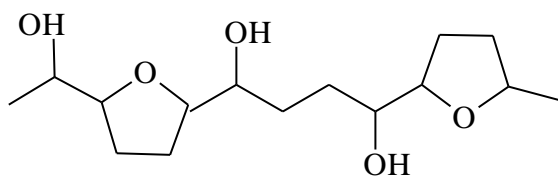
As acetogeninas são classificadas em mono tetrahydrofurano (THF), bis-THF adjacente, bis-THF não adjacente e compostos não-THF (HOOP *et al.*, 1996), representadas abaixo:



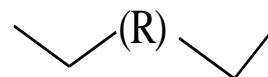
Acetogenina Mono THF



Acetogenina Bis THF adjacente



Acetogenina Bis THF não adjacente



R= cetona, CH OH, epoxide

4.1. Mecanismo de ação das acetogeninas

Diversos estudos apontam como alvo de ação das acetogeninas a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, conhecido como complexo I da cadeia respiratória, tendo as mesmas uma ação específica na enzima NADH-ubiquinona-oxidoreductase, (GALLARDO *et al.*,1998; GUADANO *et al.*,2000; ALALI *et al.*,1999; TORMO *et al.*, 2001). Além disso inibe a NADH-oxidase ligada a ubiquinona, presente nas membranas de células tumorais (ZENG *et al.*,1996; GLEYE *et al.*, 1998; ALALI *et al.*,1999).

4.1.1. Complexo Mitocondrial I

O complexo NADH-ubiquinona-oxidoreductase é um complexo protéico presente na membrana mitocondrial interna (ZAFRA-POLO *et al.*,1996). As mitocôndrias são organelas de células eucarióticas e apresentam uma membrana externa, uma membrana interna e a matriz mitocondrial. A membrana externa é permeável a pequenas moléculas e íons e a membrana interna é impermeável a maioria das moléculas e contém os componentes da cadeia respiratória e o complexo enzimático responsável pela síntese de ATP. A matriz mitocondrial contém o complexo da desidrogenase pirúvica e as enzimas do ciclo do ácido cítrico, da via da β -oxidação dos ácidos graxos e das vias da oxidação dos aminoácidos (LEHNINGER *et al.*, 1995).

A cadeia respiratória mitocondrial é constituída por uma série de transportadores de elétrons, que são na sua maioria proteínas integrais de membrana. O NADH e o NADPH, são transportadores de elétrons hidrossolúveis, onde o primeiro transporta elétrons derivados de reações catabólicas ao complexo das NADH desidrogenases e o segundo é um transportador que supre de elétrons as reações anabólicas. As flavoproteínas por estarem associadas a uma flavina nucleotídeo, FMN ou FAD podem participar da transferência de elétrons, e desta forma podem funcionar como intermediárias entre reações onde ocorre a doação de dois elétrons. Além do NAD e das flavoproteínas, existem dois grupos de transportadores na cadeia respiratória: uma benziquinona, a ubiquinona Q e dois tipos de proteínas contendo ferro, os citocromos e as proteínas ferro-enxofre. O transporte de elétrons ao longo da cadeia mitocondrial segue uma ordem de complexos que vai do I ao IV. O complexo I, que é o sitio de ação das acetogeninas presentes nas Annonaceas,

envolve a transferência de elétrons do NADH até a ubiquinona. Este complexo contém flavoproteínas com longas cadeias polipeptídicas e está alocado na membrana mitocondrial interna. O complexo II envolve a transferência de elétrons do succinato a ubiquinona através da atividade enzimática da succinato desidrogenase. O complexo III é chamado também de complexo dos citocromos, pois contém os citocromos b e c, uma proteína ferro-enxofre e pelo menos seis outras subunidades protéicas. O complexo IV é também chamado de citocromo oxidase e contém os citocromos a e a₃. A citocromo oxidase contém íons cobre que são cruciais para a transferência de elétrons para o O₂. O fluxo de elétrons através da ubiquinona do complexo I até o complexo III, é seguido pela movimentação de prótons da matriz mitocondrial para o lado externo da membrana, sendo este processo acompanhado pelo bombeamento de prótons para fora da membrana interna ocasionando uma diferença de concentração transmembrana. O gradiente eletroquímico referente a esta diferença de concentração de prótons é a força próton-motora e representa a conservação de uma parte da energia da oxidação. A força próton-motora é utilizada para impulsionar a síntese de ATP catalisada pela ATP-sintase à medida que os prótons fluem passivamente de volta para a matriz, sendo o papel primário da transferência de elétrons nas mitocôndrias fornecer energia para síntese do ATP (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Alguns tipos de inibidores da CR inibem o transporte de elétrons impedindo a oxidação de substratos que se comunicam diretamente com a CR via uma desidrogenase ligada ao NAD e assim paralisam a respiração, como exemplo desses inibidores tem-se barbitúricos, o antibiótico piericidina A e o composto pesticida rotenona (MURRAY *et al.*, 1994). As acetogeninas inibem a CR de forma semelhante aos compostos mencionados, embora exista pouca similaridade estrutural entre elas e substâncias como piericidina A e rotenona (MOTOYAMA *et al.*, 2002).

Os estudos da ação das acetogeninas como inibidores do complexo I em células tumorais reside no fato de que as mesmas inibem também a síntese de ATP, a fosforilação oxidativa, pelo bloqueio do complexo I como já mencionado. As pesquisas feitas com linhagens de células tumorais verificaram que a alta demanda de ATP justificou a sensibilidade de células carcinogênicas a estes inibidores (ZAFRA-POLO *et al.*, 1996).

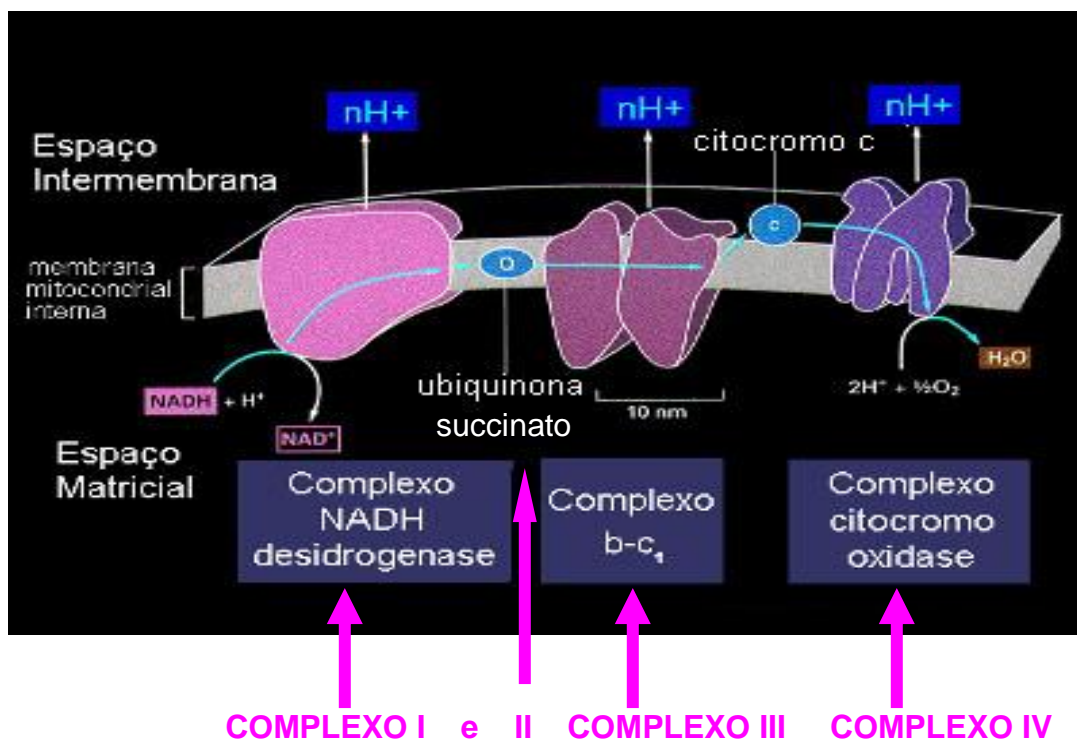


Fig. 1. Cadeia de transporte de elétrons representando complexos I, II, III e IV

4.2. Relação estrutura atividade e efeitos das Acetogeninas

As acetogeninas por atuarem como potentes inibidoras da respiração mitocondrial, interferindo com a produção de ATP, levam a uma morte celular programada (ZENG *et al.*, 1996).

A estrutura química dessas acetogeninas parece ser crucial para uma potente atividade inibitória. Segundo RODIER *et al.* (2000), há evidências indicando que o terminal lactona confere uma atividade limitada as acetogeninas em contraste com os núcleos THF, porém de acordo com outros autores as duas unidades funcionais: um anel THF e um terminal α,β insaturado γ -lactona, bem como a estereoquímica dos mesmos não são unicamente responsáveis por todos os efeitos das acetogeninas (MOTOYAMA *et al.*, 2002; TAKADA *et al.*, 2000).

A partir dos vários estudos da relação estrutura atividade das acetogeninas, diversas propostas surgiram na tentativa de elucidar os fatores cruciais presentes na estrutura

química dessas substâncias. Segundo TAKADA *et al.* (2000) o número de carbonos, entre as duas subunidades, anel THF e γ -lactona, pode ser um fator importante para justificar os diversos efeitos das Annonaceas, sendo o tamanho ideal em torno de 13 carbonos. De acordo com MOTOYAMA *et al.* (2002), em estudos prévios com as acetogeninas verificou-se que estas atuam como potentes inibidores quando o terminal γ -lactona e os anéis THF estão diretamente ligados ao espaço alquil da cadeia e que a cauda hidrofóbica presente nas acetogeninas é importante para seus efeitos, embora não seja um fator essencial, de modo que o padrão estrutural crucial para uma potente atividade ainda é duvidoso.

De acordo com o trabalho de MIYOSHI *et al.* (1998), ao contrário do que se pensava, a existência do único anel THF é suficiente para uma potente atividade das acetogeninas e que o encurtamento do espaço entre o anel THF e o terminal γ -lactona enfraquece a atividade de algumas acetogeninas. Resultados semelhantes a estes foram obtidos por TORMO *et al.* (1999), que verificaram que as acetogeninas com um anel, portanto mono-THF, podem agir de forma inibitória semelhante aquelas com dois anéis THF, quando agem na NADH oxidase, porém as acetogeninas mono-THF possuem menor potência inibitória sobre a NADH-ubiquinona oxidoreductase.

GLEYE *et al.* (2000) isolaram substâncias das sementes de *A. muricata* e das raízes de *A. nutans*, que não apresentaram na sua estrutura anel THF ou terminal γ -lactona, sugerindo que estas substâncias podem ser precursoras para a síntese de acetogeninas presentes nessas annonaceas.

As acetogeninas annonaceas constituem uma classe promissora com efeito anticâncer e pesticida. Cerca de 350 acetogeninas, usualmente conhecidas como grupos mono, bis- e tris-tetrahidrofurano têm sido relatadas. As acetogeninas tem demonstrado além das ações parasitocida, inseticida, citotóxica (DURET *et al.*, 1998) uma ação antitumoral e imunossupressora (HOOP *et al.*, 1998), contra malária e antiprotozoária (ALALI *et al.*, 1999), acaricida, fungicida e herbicida (GUADANO *et al.*, 2000) e ainda antimicrobiana (YANG *et al.*, 1992).

De acordo com CHAO-MING *et al.* (1997) as acetogeninas são estudadas por suas propriedades anti-tumorais, sendo as atividades desses compostos mais fortes que as do taxol, droga extraída da planta *Taxus cuspidata* utilizada como antineoplásico.

Diversos estudos já foram realizados com espécies de *Annonas*. Em estudo realizado com o extrato alcoólico da *Annona glabra* foi possível isolamento de acetogeninas com ação parasitocida e inseticida (GALLARDO *et al.*, 1998). *Annona montana* apresentou acetogeninas com ação pesticida e antitumoral (WANG *et al.*, 2002) e o mesmo foi verificado com *A. atemoya* (CHANG *et al.*, 1999).

Com relação aos efeitos parasitocidas, especificamente anti-helmínticos, das annonáceas tem-se o trabalho de ALAWA *et al.* (2003), que testaram a ação de infuso das cascas de *Annona senegalensis* contra o *H. contortus*. No entanto não existem estudos detalhados dos efeitos das acetogeninas das annonáceas e de *A. squamosa* sobre nematódeos.

5. *Annona squamosa*

A. squamosa é também conhecida como fruta-de-conde, pinha ou ata. Acredita-se que ela se origina da América Central ou do oeste da Índia. A árvore é pequena atingindo 5m de altura. Seu fruto tem de 7 a 10 cm de diâmetro, é redondo e coberto de saliências arredondadas que tem coloração verde-pardo acinzentado e sua polpa é branca ou creme, macia e doce. Suas folhas são longas, finas e ovais e as flores de coloração amarelo esverdeado aparecem com o crescimento de novas folhas na primavera (MORTON, 1987)

A pinha se adapta bem ao clima com pouca chuva e estação seca bem definida. Sua propagação se dá pelas sementes e botões das plantas. As árvores podem ser fertilizadas de três a quatro meses com um fertilizante com bons níveis de micro-nutrientes começando a produzir após três anos e aos cinco atingindo seu pico de produção que se mantém por pelos menos 20 anos (JOYNER, 2000). As pinhas devem ser plantadas logo após a fruta ser consumida, caso contrário o tegumento vai secar e a semente entra em dormência, estado no qual não absorve água e não germina (AGRICOLA, 1999).

A. squamosa é rica fonte nutricional em vitamina C, vitaminas do complexo B e açúcar, sendo muita mais calórica que os outros frutos, tendo a cada 100g, 69 Kcal. Sais como cálcio, potássio e ferro também fazem parte da sua composição.



Figura 2. Flores e folhas de *A. squamosa*



Figura 3. Frutos de *A. squamosa*

5.1. Utilizações de *A. squamosa*

Todas as partes da planta são referidas como tendo valor medicinal. A literatura relata que as folhas das plantas são ricas em aporfinas e as sementes são utilizadas por tribos na Índia para produzir abortos (SALUJA e SATANEI, 1989).

De acordo com BALBACH *et al.* (1993) entre suas utilidades tem-se que:

- ✓ A fruta verde, folhas e a casca da árvore tem propriedades adstringentes. Usa-se em decocção: várias xícaras ao dia que servem para combater a colite crônica e alterações no estômago e intestino.
- ✓ A fruta madura é recomendada às pessoas débeis, anêmicas e desnutridas.
- ✓ As folhas em infusão servem para acalmar espasmos e caimbras.
- ✓ As sementes são emetocatórticas: produzem vômitos e aumentam o trânsito intestinal.
- ✓ O macerado das sementes pulverizadas em álcool é útil no combate a caspa

5.2. Componentes de *A. squamosa* e seus efeitos

A partir de estudos realizados com as diversas Annonaceas foi possível isolar diferentes acetogeninas da *A. squamosa* com características butenolida e tetrahydrofurano ou bistetrahydrofurano, onde verificou-se ação citotóxica das sementes, o que explica o uso de *A. squamosa* na medicina popular como um remédio antitumoral (ALKOFAHI apud NONFON *et al.*, 1990) e antiparasitária da casca (LONDERSHAUSEN *et al.*, 1991).

No estudo realizado com plantas Annonaceas na China isolou-se 22 acetogeninas das quais 8 eram novas como também encontrou-se ciclopeptídeos em algumas espécies. Foi relatado um novo ciclopeptídeo chamado annosquamosina A, obtido da fração CHCl₃ do

extrato alcoólico das sementes de *A. squamosa*. Trata-se de um alcalóide benzoquinazolinico, isolado de sementes de *A. squamosa* com ação antimalárica, citotóxica e atividade imunossupressora (MORITA *et al.*, 2000). Frutos imaturos dessa planta e as sementes podem matar parasitos e as raízes são usadas para tratar desinteria aguda, depressão, doenças da medula espinhal e ainda as folhas são usadas para prolapso retal, feridas e inchaços. (CHAO-MING *et al.*, 1997).

Em um estudo realizado a partir das análises fitoquímicas dos frutos de *A. squamosa* foram obtidos 12 derivados kauranes conhecidos e dois novos kauranes diterpenóides, os quais foram chamados annosquamosin A e annosquamosin B (YANG *et al.*, 1992; WU *et al.*, 1996). A respeito dos 14 compostos o annosquamosin A mostrou significante atividade contra a replicação do HIV em células H9 dos linfócitos com um EC50 de 0,8 µg/mL (WU *et al.*, 1996).

A partir de estudos realizados com sementes e cascas de *A. squamosa* foi possível extrair a squamotacina que é referida como um ácido graxo bis-tetrahidrofurano. Nesse estudo identificou-se a squamotacina-A, também referida como um ácido graxo bis-tetrahidrofurano, mas diferindo da squamotacina por possuir dois anéis bis-tetrahidrofurano separados pelo carbono 4 da cadeia principal (FUJIMOTO *et al.*, 1990). A squamotacina é um composto idêntico a potente acetogenina bulatacina exceto pelo bis-tetrahidrofurano adjacente (THF) e mostrou toxicidade seletiva para tumor de células prostáticas em humanos (HOOP *et al.*, 1996).

A partir das cascas da *A. squamosa* foi possível identificar três novas acetogeninas THF: a squamolinone, a 9-oxo-asimicinone e a bullacina, todas mostraram atividade significante contra células tumorais humanas (HOPP *et al.*, 1998).

Plantas moluscidas foram utilizadas para o controle do vetor de Equistossomias e os extratos etanólicos de diferentes partes de seis espécies da família Annonaceae foram avaliados contra formas adultas e ovos de *Biomphalaria glabatra*. Os resultados dos experimentos indicaram que a maioria dos extratos analisados possuíam propriedades letais contra *Biomphalaria* com ênfase para a folha de *A. muricata* e a raiz de *A. squamosa* (SANTOS e SANT'ANA, 2001).

Em trabalho realizado com espécies de plantas das Filipinas *A. squamosa* dentre outras foi testada em duas espécies de mosquitos: *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

A. squamosa e *Lansium domesticum* foram as mais efetivas contra larvas de terceiro e quarto estágios. Os extratos mostraram uma atividade inseticida após 48 horas de exposição (MONZON *et al.*, 1994).

Segundo SAXENA *et al.* (1993) os alcalóides isolados de *A. squamosa* tem mostrado ação larvicida contra *Anopheles stephensi* na concentração de 50 a 200 ppm.

WAECHTER *et al.* (1998) avaliaram a ação de nove acetogeninas sobre *Leishmania* spp, *in vitro*, e *Trypanossoma cruzi*, *in vivo*. A acetogenina annonacin A isolada da *A. glauca* mostrou melhores resultados inibindo tanto espécies de *Leishmania* como *T. cruzi*.

Avaliando-se uma possível relação do parksonismo em humanos no oeste da Índia com o consumo de plantas tropicais, entre elas *A. squamosa*, concluiu-se que a exposição crônica à alcalóides neurotóxicos podem induzir o aparecimento do parksonismo em animais. Um estudo mais detalhado para esclarecer a ligação entre o consumo de frutas tropicais e o parksonismo em humanos tem sido proposto (CAPARROS-LEFEBVRE e ELBAZ, 1999).

5.3. Estudos da atividade anti-helmíntica de *Annona squamosa*

LAINETI e BRITO (1979), PIO CORREA, (1984) verificaram que o infuso de folhas da *A. squamosa* era tido como eficaz no combate de vermes intestinais.

No trabalho realizado por AMORIM *et al.* (1987), o chá obtido das folhas de *A. squamosa* foi administrado a camundongos infectados por oxyurídeos, *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. *A. squamosa* mostrou uma taxa de mortalidade de 43,4% dos oxiurídeos.

AMORIM *et al.* (1996) avaliaram o extrato aquoso das folhas de *A. squamosa*, *in vitro*, sobre larvas de primeiro e terceiro estágios de nematóides gastrintestinais de bovinos, obtendo a mortalidade de 19,4% entre as larvas de primeiro estágio .

VIEIRA E CAVALCANTE (1999 b) testaram *A. squamosa in vivo*, dentre outras plantas sobre nematóides gastrintestinais de caprinos. A planta reduziu em 40% a contagem de ovos do parasito *H. contortus*. Com relação as formas adultas de parasitos *A. squamosa* mostrou índices de redução da população de *H. contortus* e *Trichostrongylus columbriformis* de 21,8% e 31,4%, não reduzindo a população de *Strongyloides papillosus*

mostrou ainda ser efetiva contra a forma adulta do *Oesophagostomum columbianum*, reduzindo em 74%, os parasitos adultos.

5.4. Testes de avaliação de anti-helmínticos

Os testes *in vitro* com anti-helmínticos surgiram inicialmente para detectar a presença da resistência anti-helmíntica em nematóides gastrintestinais. Esses testes são realizados com fezes de animais contaminados, natural ou experimentalmente, com ovos de nematóides. O teste *in vitro* comumente utilizado é de eclosão de ovos (TEO). O TEO foi elaborado para a detecção de resistência aos benzimidazóis, sendo o teste original descrito por Le Jambre em 1976 (COLES *et al.*, 1992). Os benzimidazóis inibem o embrionamento e a eclosão dos ovos (COLES *et al.*, 1992; TAYLOR *et al.*, 2002). No TEO as fezes coletadas passam por um processo de sucessivas lavagens em tamises, de forma que será obtida uma solução contendo os ovos dos nematóides, processo este chamado de recuperação de ovos nas fezes, desenvolvido por HUBERT E KOERBOEUF (1984). Os ovos sofrerão eclosão dentro de 36 a 48 horas, quando então serão observados ao microscópio larvas de primeiro estágio e ovos.

O FECRT é um teste *in vivo* que pode ser utilizado para identificar a resistência anti-helmíntica, porém o teste nem sempre pode estimar a eficácia anti-helmíntica porque a contagem de ovos nas fezes pode não ser uma medida correta da real infecção e além disso o teste mede somente os efeitos dos adultos que estão eliminando ovos nas fezes (TAYLOR *et al.*, 2002).

Em se tratando do teste *in vitro* com plantas com efeito anti-helmíntico estas são preparadas sob a forma de extratos ou óleos, diluídas em diferentes concentrações, sendo posteriormente colocadas em contato direto com os ovos do nematóide estudado. Após 48 horas, a leitura é feita e então pode-se observar se houve a inibição da eclosão das larvas e em que concentração ocorreu essa inibição. Na realização deste teste utiliza-se um controle positivo, constituído pela droga de referência, um benzimidazol e um controle negativo, o diluente. A ação de produtos sintéticos da família dos benzimidazóis sobre a eclosão dos ovos é através da inibição das mitoses e desta forma interferem com a formação de estruturas vitais do parasito. O mecanismo de algumas plantas da família annonaceae que atuam sobre a eclosão das larvas não foi elucidado, mas acredita-se que sua atuação seja de

forma semelhante aos benzimidazóis, isto é, impedindo o funcionamento normal da CR (HENNON, 1993). Dessa forma pode-se dizer que *A. squamosa* possui ação semelhante à dos fármacos do grupo dos benzimidazóis, por interferir no funcionamento da cadeia respiratória (MOTOYAMA *et al.*, 2002).

6. Estudos de Toxicidade aguda com plantas

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo e o termo toxicidade se refere a propriedade de agentes tóxicos de promoverem injúrias às estruturas biológicas através de interações físico-químicas. A intoxicação é um processo patológico provocado por substâncias endógenas ou exógenas e caracterizado por desequilíbrio fisiológico, sendo esse processo evidenciado por sinais e sintomas ou mediante dados laboratoriais (OGA, 1996).

É válido salientar que os testes para a avaliação de plantas visando testar efeitos tóxicos deve seguir a seguinte sequência: testes *in vitro* e testes *in vivo*, com animais de laboratório, seguido da realização dos testes de toxicidade na espécie alvo.

Nos estudos de toxicidade realiza-se inicialmente testes de toxicidade aguda, sendo esta definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto, após administração de uma dose única ou doses múltiplas administradas em 24 horas (BARROS e DAVINO, 1987). O teste de toxicidade aguda tem por finalidade determinar a sintomatologia conseqüente a administração do composto testado como também a letalidade deste (LOOMIS e HAYES, 1996).

Nas pesquisas realizadas com testes de toxicidade aguda, *in vivo*, são utilizadas duas vias de administração: a intraperitoneal e a oral, utilizando ratos ou camundongos (LOOMIS e HAYES, 1996). No protocolo de toxicidade aguda os animais devem ser avaliados em 24 horas, podendo ser observados até 14 dias, verificando diariamente sinais de intoxicação, letargia e mudanças comportamentais (AMDUR *et al.*, 1991).

As pesquisas já realizadas com toxicidade aguda de plantas, verificaram que muitas não demonstram efeito tóxico quando da administração em dose única. No entanto não descarta-se a possibilidade de uma ação tóxica com administração por tempo prolongado.

Pesquisas realizadas por HIRUMA-LIMA *et al.* (2000), avaliaram o efeito gastroprotetor do óleo de *Croton cajucara* Benth, realizando para tanto testes de toxicidade aguda. O protocolo dos testes de toxicidade aguda adotado pelos autores segue o

recomendado por AMDUR *et al.* (1991). Os camundongos receberam o óleo por via oral e foram observados com 0, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, sendo acompanhados diariamente por 14 dias. Testes de toxicidade subcrônica ou crônica não foram realizados e neste protocolo a planta não demonstrou efeito tóxico. Da mesma forma MONTEIRO *et al.* (2001), realizaram teste de toxicidade aguda das folhas de *Vernonia condensata* em camundongos que receberam o extrato da planta por via oral e intraperitoneal em dose única de 5.000 mg/kg. A planta também não mostrou efeitos tóxicos agudos.

No trabalho realizado por REBECA *et al.* (2002), a toxicidade aguda de *Stryphnodendron adstringens* foi realizada em camundongos. O protocolo adotado seguiu a administração do extrato em dose única, por via oral, observando os animais durante 7 dias. A planta não demonstrou efeitos tóxicos na dose de 2.000 mg/kg. No entanto o extrato das cascas de *S. adstringens* administrado diariamente por 30 dias na dose de 800mg/kg foi tóxico, causando efeitos indesejáveis nos animais.

WITTHAWASKUL *et al.* (2003), realizaram testes de toxicidade aguda e subaguda de mistura de saponinas extraídas de *Schefflera leucantha*, inoculando os camundongos por via oral com mistura de saponinas, extratos metanólico e aquoso das folhas da planta, na dose de 5.000mg/kg em dose única e na dose de 1.000mg/kg /dia por 14 dias. Os animais foram observados com 2, 4, 6 e 24 horas e durante 14 dias, para avaliação do peso corporal e peso dos órgãos. Em dose única a planta não mostrou efeitos tóxicos. Os estudos de toxicidade subaguda demonstraram que a planta não provocou a morte dos animais, porém a mistura de saponinas foi implicada em efeitos sobre a função renal e hepática.

No que diz respeito a plantas com comprovada ação tóxica aguda tem-se o trabalho de RUJJANAWATE *et al.* (2003), que avaliaram a toxicidade aguda de alcalóides do *Gelsemium elegans* Benth em camundongos por via oral e intraperitoneal, sendo os mesmos 100% letal na dose de 25mg/kg por via oral e na dose de 7mg/kg por via i.p. Os valores foram expressos em DL50, sendo esta de 15m/kg e 4mg/kg. por via oral e i.p respectivamente.

SHANKER *et al.* (2002), avaliaram a toxicidade aguda do extrato bruto e dos alcalóides de *Taxus baccata* L. em camundongos, utilizando doses que variaram de 15 a 35 mg/kg. Os alcalóides isolados mostraram-se tóxicos, sendo a DL50 do alcalóide mais tóxico de 0,150mg/30g.

7. Estudos de Toxicidade aguda com Annonaceas

A toxicidade aguda de plantas da família Annonacea é ainda pouco estudada e os trabalhos realizados com as mesmas abordam seus efeitos citotóxicos *in vitro* dando ênfase aos efeitos anti-tumorais. OBERLIES *et al.* (1995) através de estudos *in vitro* avaliaram a citotoxicidade das Annonaceas e das acetogeninas, demonstrando a inibição do crescimento de células tumorais humanas. JARAMILO *et al.* (2000) testaram a citotoxicidade de *A. muricata*, obtendo resultados inibitórios em linhagens de células tumorais U -937.

As pesquisas com testes de toxicidade *in vivo* com acetogeninas envolvem os estudos realizados por DURET *et al.* (1999) que testaram acetogeninas da *A. atemoya* em células tumorais humanas, realizando testes de toxicidade aguda em camundongos, utilizando a via intraperitoneal. Os resultados mostraram a toxicidade das acetogeninas que causaram a morte de camundongos nas doses que variaram de 5 a 200 mg/kg em 24 ou 48 horas.

DAMASCENO *et al.* (2002) avaliaram efeitos do extrato aquoso obtido de sementes de *A. squamosa* na performance reprodutiva de ratas. O extrato foi administrado por via oral em doses de 300 e 600mg/kg durante 5 dias, correspondendo ao período de pré-implantação. Nas doses testadas não foram verificados sinais aparentes de toxicidade por 5 dias, nem alterações no corpo lúteo, implantação e número de fetos, bem como não ocorreram modificações de células epiteliais uterinas, de forma que a planta não interferiu na performance reprodutiva de ratas gestantes.

No entanto efeitos tóxicos *in vivo* das Annonaceas e dentre estas de *A. squamosa*, são ainda pouco estudados bem como seus efeitos adversos em organismos vivos.

JUSTIFICATIVA

O parasitismo por nematóides gastrintestinais tem sido um dos maiores obstáculos na produtividade do setor de ovinocaprinocultura. No combate a este parasitismo utilizam-se anti-helmínticos onerosos e que determinam o surgimento da resistência. A utilização de fitoterápicos no controle de verminoses gastrintestinais de pequenos ruminantes pretende promover a redução de custos na produção de ovinos e caprinos tornando esta atividade mais produtiva.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Averiguar a ação de *A. squamosa* como anti-helmíntico sobre nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos.

Objetivos Específicos

- Isolar e identificar as acetogeninas das sementes de *A. squamosa*.
- Avaliar a ação ovicida de extratos de *A. squamosa*, contra *H. contortus*.
- Realizar teste de toxicidade aguda em camundongos com o extrato de *A. squamosa* que apresente melhor atividade ovicida.

METODOLOGIA

1. Obtenção das sementes de *A. squamosa*

As sementes de *A. squamosa* foram obtidas, por extração manual, a partir dos frutos maduros comercializados no município de Fortaleza, Ceará, situado no nordeste do Brasil, entre os meses de abril e junho de 2001. A exsicata foi identificada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, depositada com Voucher 31710.

2. Obtenção dos extratos da planta

Dois quilos de sementes de *A. squamosa* foram trituradas até a obtenção de pó (Anexo I). O pó foi misturado a uma solução de metanol a 10%, na qual ficou totalmente submerso por sete dias. Posteriormente este material foi filtrado, obtendo-se assim uma solução metanol/água. A seguir, esta solução passou por um processo de evaporação, em um evaporador rotatório, por quatro dias em torno de 64°C, passando posteriormente por lavagens sucessivas com o solvente acetato de etila. Este procedimento foi realizado quatro vezes, utilizando-se um funil de separação, de onde se obteve duas soluções: a solução aquosa e a solução de acetato de etila. À solução de acetato de etila foi acrescido sulfato de sódio anidro, para retirar o excesso de água. Posteriormente a solução foi filtrada, retirando assim o sulfato de sódio, e em seguida foi levada ao banho-maria, a 100°C, em tempo necessário para obtenção do extrato acetato de etila sob forma pastosa. A solução aquosa foi levada ao banho-maria, em tempo necessário para posterior obtenção do extrato aquoso sob forma pastosa.

3. Isolamento das acetogeninas a partir do extrato acetato de etila de *A. squamosa*

A partir do extrato acetato de etila fez-se a separação de componentes químicos através da cromatografia em coluna de sílica gel, sendo esta eluída com os seguintes solventes: hexano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridade crescente,

aumentando a percentagem dos solventes de 10 em 10%, indo de 0 a 100% o percentual de cada solvente. Inicialmente foi acrescentado à coluna o hexano e acetato de etila em percentuais decrescentes de hexano e crescente de acetato de etila, em seguida o percentual de acetato de etila foi gradativamente reduzido a medida que aumentava o percentual de metanol até 100%, obtendo-se desta forma um total de 64 frações. Todas as frações foram submetidas à cromatografia de camada delgada de sílica gel, no intuito de separar as substâncias puras. Microlitros de amostras das 64 frações foram colocados nas placas com sílica gel sendo estas posteriormente submersas em cuba contendo solventes de diferentes polaridades. Após secagem as placas foram reveladas em cuba de iodo sendo a seguir interpretadas de acordo com a coloração de imagens reveladas nas placas. A partir das placas obtidas duas frações, a 22 (eluída com CHCL₃/ EtOAc, 30:70) e a 31 (eluída com 100% acetato de etila), demonstraram um maior grau de pureza de substâncias, a partir de imagens com coloração homogênea. A determinação estrutural das substâncias presentes nestas duas frações foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 e por espectro de massa. As análises foram realizadas no CENAUREN (Centro Nordeste de Utilização e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará) e os resultados interpretados pela profa. Selene Maia de Moraes, do laboratório de Química em Produtos Naturais da Universidade Estadual do Ceará.

4. Análise Fitoquímica do Extrato Acetato de Etila de *Annona squamosa*

O extrato acetato de etila (150mg) foi misturado com 30mL de uma solução hidrofílica (etanol com 30% água) para detecção de fenóis e taninos. A solução hidrofílica inicial foi dividida em 7 tubos (cerca de 3mL em cada). Ao tubo 1 foi adicionada solução de FeCL₃ para verificação de formação de precipitado escuro indicativo de presença de compostos fenólicos. Para caracterizar os diferentes tipos de flavonóides, HCl concentrado ou solução de KOH foram adicionados aos tubos 2 (pH 3), 3 (pH 8,5), 4 (pH 11), 5 (pH 1 a 3) e 6 (pH 11), sendo os dois últimos submetidos a aquecimento, cada tubo em diferente pH para observação das diversas cores específicas de cada tipo de flavonóide. Ao tubo 7 adicionaram-se algumas centigramas de magnésio e 0,5mL de HCl concentrado para detecção de flavonas e flavonóides, pela formação de coloração vermelha. Para detecção de

alcalóides e triterpenos, à solução inicial foi acrescentado anidrido acético e ácido sulfúrico, havendo a formação de um precipitado de coloração vermelha indicativo da presença de triterpenos. Para detecção de alcalóides foi acrescentado sulfato de amônio à solução inicial, sendo realizadas lavagens com clorofórmio e ácido clorídrico, formando duas soluções. A solução de ácido clorídrico foi acrescentado gotas do reagentes de Mayer e Hager, obtendo-se um solução de coloração amarelada quando da presença de alcalóides (MATTOS, 1997).

5. Parasitos

Fêmeas adultas de *H. contortus* foram obtidas a partir da necropsia de ovinos adultos. Os ovos foram coletados das fêmeas sendo mantidos em fezes esterilizadas e umedecidas com solução de *Escherichia coli*, fonte de alimento para as larvas, durante sete dias, com o intuito de obter larvas de terceiro estágio. Após uma semana cerca de 5000 larvas de terceiro estágio de *H. contortus* foram inoculadas, por via oral, em dois ovinos livres de nematóides, mantidos em gaiolas metabólicas alimentando-se de feno e ração comercial.

6. Teste *in vitro* de eclosão de ovos

As fezes foram coletadas dos ovinos portadores de infecção monoespecífica e o método de recuperação dos ovos foi realizado segundo HUBERT KERBOEUF (1984). O teste de eclosão de ovos foi realizado segundo o método de Coles *et al.* (1992). O volume de 500µL, contendo 250µL da suspensão aquosa de ovos (com cerca de 120 ovos), e 250µL do extrato da planta, foram colocados em tubos esterilizados de 5mL. As concentrações testadas foram acompanhadas de um controle negativo contendo o diluente Tween 80 e um controle positivo com tiabendazol a 0,1µg mL⁻¹. Os extratos obtidos foram diluídos em Tween 80 a 3%, nas seguintes concentrações, 25, 5, 1, 0,2, 0,04 mg mL⁻¹, sendo feito um total de cinco repetições para cada concentração. Após 48 horas da incubação dos ovos a 27°C, uma gota de lugol foi acrescentada a cada tubo no intuito de parar a eclosão de ovos e imobilizar as larvas até o momento da leitura. Todas as larvas e ovos foram contados ao microscópio. As frações 22 e 31 obtidas do extrato acetato de etila foram também utilizadas

nos testes de inibição de eclosão de ovos, seguindo o mesmo protocolo utilizado para os extratos MeOH/H₂O, aquoso e acetato de etila.

7. Teste de Toxicidade aguda com extrato acetato de etila de *A. squamosa*.

7.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, de ambos os sexos, entre 6 e 10 semanas de idade, pesando de 25 a 30g, oriundos de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em caixas plásticas sob condições adequadas de luz e temperatura, recebendo ração e água à vontade.

7.2. Toxicidade aguda de *A. squamosa*

O EACAS foi administrado em camundongos, divididos em grupos (n=10), por via oral e intraperitoneal (i.p.). O extrato foi diluído em Tween 80 a 3%, e água destilada, obtendo a concentração de 0,15 mg μL^{-1} . Os animais receberam 0,2 mL/animal do EACAS por via oral, através de sonda oro-gástrica nas doses de :1000, 750, 500, 400, 300, 200 mg kg^{-1} e por via i.p., por injeção na região abdominal, em doses de: 15, 9, 7, 3 e 0,75 mg kg^{-1} . Os grupos controle receberam 0,2 mL de Tween 80 a 3% diluído em água destilada e salina por ambas as vias.

Os animais receberam o EACAS em dose única e foram observados diariamente por seis dias, avaliando-se as variáveis comportamentais, tais como irritabilidade, deambulação, pêlos eriçados, espasmos musculares e hipoatividade, e ainda variáveis fisiológicas, tais como dispnéia e taquicardia, que eram avaliados somente após 30 minutos de qualquer tipo de manipulação dos animais, na tentativa de reduzir a condição de stress. Antes do início do tratamento realizou-se em todos os animais, coletas de sangue, pelo plexo retro-orbital, para contagem total de leucócitos, hematócrito e avaliação dos níveis de uréia, creatinina, AST e ALT, sendo as variáveis bioquímicas expressos pelo valor médio dos grupos antes e depois do tratamento. As variáveis bioquímicas foram avaliados somente nas doses que não provocaram mortalidade, uma vez que neste protocolo, se objetivava verificar alguma alteração bioquímica após 7 dias em doses que não provocaram sintomas aparentes de toxicidade. No 7º dia, após a administração do extrato, os animais sobreviventes foram

pesados, submetidos a nova coleta de sangue, cerca de 300 μL para verificar os mesmos parâmetros já mencionados e sacrificados, para retirada e pesagem de : fígado, baço e rins. O efeito tóxico agudo foi interpretado com base na mortalidade. Em outro protocolo os animais foram avaliados em 24 horas, observando o número de vivos/mortos, e outras variáveis também avaliados no primeiro protocolo. No entanto para avaliação após 24 horas duas doses por via oral e duas por via i.p. foram escolhidas, sendo uma que não provocou mortalidade e outra que causou 50% de mortalidade por ambas as vias. Outros animais (n=10) foram inicialmente pesados e a seguir inoculados com EACAS nas doses de 200 e 400 mg kg^{-1} por via oral e nas doses de 5 e 0,75 mg kg^{-1} por via i.p. Após 24 horas, o número de animais vivos e mortos foi determinado. Os animais vivos foram pesados, submetidos a coleta de sangue, repetindo o método de coleta anterior, para fazer a contagem total de leucócitos, hematócrito, níveis de uréia, creatinina, AST e ALT e foram sacrificados para a pesagem de: fígado, baço e rins.

8. Análise Estatística

No TEO a comparação entre os tratamentos e entre as doses foi feita pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A CE50 foi calculada por regressão, onde os dados obtidos tiveram tendência exponencial. Os valores correspondentes a CE50 do TEO e a DL50 do teste de toxicidade foram calculados a partir da equação que representasse a linha de tendência com coeficiente de determinação mínimo de 70% (). A análise de variância das CE50 foi feita através do PROC ANOVA SAS-2000, utilizando transformação dos dados em logaritmos.

Os valores de hematócrito e peso dos órgãos foram transformados em arco sen, de acordo com SAMPAIO (1998). O peso dos órgãos foi avaliado pelo peso relativo ($\text{g}/100\text{g}$). Para a comparação dos pesos dos animais, hematócrito, contagem total de leucócitos, antes e após tratamentos e peso dos órgãos foi utilizado o programa STAT VIEW, teste T Student a um nível de significância de 5%. As variáveis analisadas foram expressas em média \pm desvio padrão e os níveis de uréia, creatinina, AST e ALT foram expressos em média \pm erro padrão.

RESULTADOS

1. Determinação estrutural das acetogeninas presentes nas frações 22 e 31

Através dos espectros de ressonância magnética nuclear de Carbono-13 e Próton, e espectro de massa das frações 22 e 31 do extrato acetato de etila, foram identificadas duas substâncias tidas como acetogeninas polihidroxiadas com dois anéis tetrahydrofurânicos, as quais possuem estruturas químicas ainda não relatadas na literatura. As acetogeninas encontradas foram denominadas Isosquamosina, isolada da fração 22 e Squamosina, isolada da fração 31.

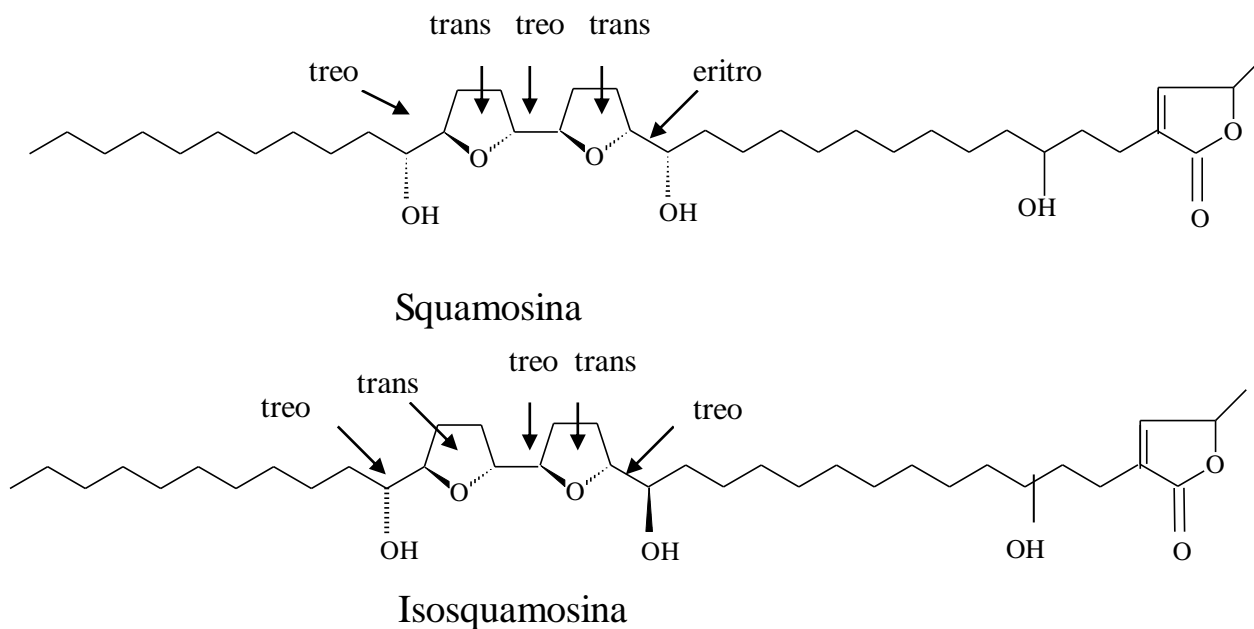


Figura 5. Estrutura química das acetogeninas isoladas do extrato acetato de etila de *A. squamosa*.

2. Análise Fitoquímica

A análise fitoquímica do EAC revelou a presença de fenóis, taninos catéquicos, flavonóides, triterpenos pentacíclicos livres e alcalóides.

3. Testes de inibição de eclosão de ovos de *H. contortus*

Os percentuais de inibição de eclosão de ovos de *H. contortus* com os extratos metanol/H₂O, aquoso e acetato de etila estão demonstrados na tabela 1. O maior percentual de inibição de eclosão de ovos foi obtido com o extrato acetato de etila, nas concentrações de 5 e 25 mg mL⁻¹, não diferindo estatisticamente do controle positivo com 0,1 µg mL⁻¹ de tiabendazol. O extrato aquoso comparado aos outros dois extratos, mostrou um baixo percentual de inibição (52,64%) mesmo na concentração de 25 mg mL⁻¹. As acetogeninas Isosquamosina e Squamosina, inibiram a eclosão de ovos em mais de 90% nas concentrações de 5 e 25 mg mL⁻¹, não diferindo estatisticamente do extrato bruto de acetato de etila. Os resultados do TEO obtidos com as acetogeninas estão demonstrados na tabela 2. A CE50 para os extratos aquoso, metanol/ H₂O, acetato de etila, e para a Isosquamosina e Squamosina, foram de 10,02mg/mL, 1,03mg/mL, 0,98mg/mL, 0,96 mg/mL e 0,94mg/mL, respectivamente (tabela 3).

Tabela 1. Percentual de inibição de eclosão de ovos de *H. contortus* com os extratos metanol/H₂O, aquoso e acetato de etila de *A. squamosa*.

Concentração mg mL ⁻¹	Extratos		
	Hidroalcóolico	Aquoso	Acetato de Etila
25	81,58 ^{BCbc}	52,64 ^{Ac}	100,00 ^{Aa}
5	81,95 ^{ABab}	14,28 ^{Bc}	99,03 ^{Aab}
1	53,10 ^{Ca}	13,74 ^{BCb}	39,47 ^{Bab}
0,2	4,81 ^{Dab}	3,02 ^{Db}	8,97 ^{BCa}
0,04	2,80 ^{Da}	6,25 ^{Ca}	5,31 ^{Ca}
Tween 80- 3%	4,25 ^D	4,25 ^{CD}	4,25 ^C
Tiabendazol- 0,1 µg mL ⁻¹	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A

Letras minúsculas comparam valores na linha, letras maiúsculas comparam valores na coluna e letras diferentes representam diferença estatística (p< 0,05).

Tabela 2. Percentual de inibição de eclosão de ovos de *H. contortus* com o extrato acetato de etila e acetogeninas de *A. squamosa*.

Concentração mg mL ⁻¹	Acetato de etila	Isosquamosina	Squamosina
25	100,00 ^{Aa}	98,10 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}
5	99,03 ^{Aab}	84,52 ^{Ab}	99,70 ^{Aa}
1	39,47 ^{Ba}	45,44 ^{Ba}	51,60 ^{Ba}
0,2	8,97 ^{BCa}	4,39 ^{Cab}	2,58 ^{Cb}
0,04	5,31 ^{Ca}	3,35 ^{Ca}	3,33 ^{Ca}
Tween 80-3%	4,25 ^C	4,25 ^C	4,25 ^C
Tiabendazol- 0,1µg mL ⁻¹	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A

Letras minúsculas comparam valores na linha, letras maiúsculas comparam valores na coluna e letras diferentes representam diferença estatística (p< 0,05)

Tabela 3. Concentração efetiva de 50% dos ovos de *H. contortus* tratados com extratos e acetogeninas de *A. squamosa*.

Extratos e acetogeninas	CE50 (mg mL ⁻¹)
Metanol/água	1,0303 ± 0,2980
Aquoso	10,0249 ± 5,1267
Acetato de Etila	0,9887 ± 0,3352
Isosquamosina	0,9664 ± 0,1589
Squamosina	0,9435 ± 0,1514

4. Testes de Toxicidade

Os animais que receberam o EAC por via intraperitoneal nas doses de 15 e 9mg/kg apresentaram sintomas de dispnéia e espasmos musculares seguidos de morte em menos de 24 horas. Nas demais doses os animais apresentaram dispnéia, no entanto a dose de 0,75mg/kg não provocou alterações comportamentais aparentes e não foi letal. Os animais que receberam o EAC, por via oral, nas doses acima de 300mg/kg apresentaram também dispnéia seguido de morte. Entretanto o EAC na concentração de 200mg/kg não provocou alterações comportamentais aparentes e nem foi letal (tabela 4).

O EAC por via i.p, não alterou o peso dos animais após 7dias, mas o fez na dose de 5 mg/kg após 24 horas (tabela 5). Não houve diferença significativa no peso dos órgãos dos animais após 24 horas nem após 7 dias (tabelas 6 e 7). Com relação a contagem total de leucócitos (CTL) e o hematócrito (Ht) não houve diferença estatística do controle após 24 horas e nem após 7 dias (tabelas 8 e 9). Os níveis de AST e ALT, uréia e creatinina, após 24 horas, não diferiram significativamente do controle (tabela 8). Os níveis de uréia, creatinina, AST e ALT mantiveram-se normais após 7 dias (tabela 10).

O EAC por via oral não alterou o peso dos animais nem após 24 horas nem após 7dias (tabela 11). O peso dos órgãos não diferiram significativamente do controle após 7 dias, no entanto o peso do fígado na dose de 400mg/kg, aumentou significativamente após 24 horas (tabela 12 e 13). O EAC após 7dias, na dose de 750mg/kg, reduziu significativamente o Ht, porém a CTL permaneceu, em todas as doses, dentro dos limites normais do controle (tabela 14). O EAC após 24 horas não alterou o Ht e nem o CTL (tabela13). Os parâmetros bioquímicos não diferiram significativamente do controle após 24 horas e 7dias (tabela 15 e 16).

Tabela 4. Toxicidade aguda do extrato acetato de etila de *A. squamosa*

Via	Dose mg/kg	Mortos/total	Efeitos
Oral	1000	10/10	D,M+,T
	750	5/10	D,M+,T
	500	6/10	D,H
	400	5/10	D,H
	300	2/10	D,H
	200	0/10	S
Intraperitoneal	15	10/10	D, E,M+
	9	9/10	D,M+,T
	7	5/10	D,H
	3	7/10	D,H
	0,75	0/10	S

S-sem sintomas, D-dispnéia, E-espasmos, M+-morte em 30minutos, H-hipoatividade, T-tremor.

Tabela 5. Efeito do extrato acetato de etila de *A. squamosa* sobre a massa corporal de camundongos, após 24 horas e 7 dias da administração intraperitoneal.

Tratamento	Após 24 horas		Após 7 dias	
	Dia 0	24 horas	Dia 0	Dia 7
Salina	24,09 ± 4,23 ^{Aa}	23,76 ± 2,99 ^{Aa}	25,67 ± 3,35 ^{Cc}	26,02 ± 3,48 ^{Ccd}
Tween 80	24,93 ± 1,68 ^{Aa}	24,50 ± 2,72 ^{Aa}	27,84 ± 1,72 ^{Cc}	28,70 ± 1,53 ^{Ccd}
7 mg/kg	—	—	28,18 ± 3,76 ^{Cc}	29,84 ± 4,72 ^{Cd}
5 m/kg	28,91 ± 2,11 ^{Aa}	33,62 ± 0,39 ^{Bb}	—	—
3 mg/kg	—	—	26,40 ± 1,19 ^{Cc}	24,15 ± 1,45 ^{Cc}
0,75 mg/kg	26,11 ± 2,48 ^{Aa}	27,45 ± 2,64 ^{Aa}	27,31 ± 1,28 ^{Cc}	25,54 ± 2,65 ^{Ccd}

A e B comparam valores na linha do grupo avaliado após 24h, a e b comparam valores na coluna do grupo avaliado após 24 h, C e D comparam valores na linha do grupo avaliado após 7 dias, c e d comparam valores na coluna do grupo avaliado após 7 dias, p < 0,05.

Tabela 6. Efeito do extrato acetato de etila de *A. squamosa* sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal.

Tratamento	Fígado	Rim D	Rim E	Baço
Salina	5,36 ± 0,23	0,80 ± 0,73	0,80 ± 0,69	0,38 ± 0,09
Tween 80	5,26 ± 0,93	0,87 ± 0,15	0,86 ± 0,16	0,43 ± 0,08
5 mg/kg	5,89 ± 0,51	0,76 ± 0,28	0,74 ± 0,00	0,43 ± 0,42
0,75 mg/kg	5,73 ± 0,66	0,75 ± 0,67	0,75 ± 0,10	0,49 ± 0,37

Tabela 7. Efeito do extrato acetato de etila de *A. squamosa* sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos, após 7 dias da administração intraperitoneal.

Tratamento	Fígado	Rim D	Rim E	Baço
Salina	5,23 ± 0,45	0,76 ± 0,12	0,72 ± 0,12	0,65 ± 0,32
Tween 80	5,17 ± 0,19	0,79 ± 0,11	0,81 ± 0,16	0,62 ± 0,15
7 mg/kg	4,82 ± 0,40	0,95 ± 0,11	0,87 ± 0,63	0,87 ± 0,63
3 mg/kg	5,59 ± 0,59	0,91 ± 0,16	0,78 ± 0,07	0,67 ± 0,25
0,75 mg/kg	5,72 ± 0,42	0,96 ± 0,18	0,80 ± 0,09	0,70 ± 0,36

Tabela 8. Variáveis bioquímicas e hematológicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de *A. squamosa*, após 24 horas da administração intraperitoneal.

Variáveis	Salina	Tween 80	0,75mg/kg
Ureia (mg/dL)	51,5 ± 4,50	40,5 ± 6,50	49,5 ± 2,50
Creatinina (mg/dL)	0,20 ± 0,00	0,25 ± 0,0	0,2 ± 0,00
AST (U/L)	128,5 ± 20,5	134 ± 15,0	124 ± 16,0
ALT(U/L)	69,5 ± 21,5	70,0 ± 21,0	86,0 ± 5,00
Ht (%)	49,8 ± 7,36	50,8 ± 4,49	44,4 ± 2,55
CTL	3800 ± 877	5170 ± 2505	4315 ± 1317

Tabela 9. Variáveis hematológicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de *A. squamosa*, após 7 dias da administração intraperitoneal.

Tratamento	Hematócrito		CTL	
	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia 7
Salina	45,8 ± 6,70 ^{Aa}	51,0 ± 7,17 ^{Ab}	5350 ± 1462 ^{Cd}	3040 ± 1377 ^{Cc}
Tween 80	47,6 ± 1,51 ^{Aa}	44,4 ± 8,02 ^{Aab}	2610 ± 1287 ^{Ccd}	4970 ± 1502 ^{Cc}
7 mg/kg	45,0 ± 3,39 ^{Aa}	9,2 ± 3,49 ^{Aa}	2510 ± 7920 ^{Ccd}	3680 ± 2085 ^{Cc}
3 mg/kg	43.85 ± 5,39 ^{Aab}	40,2 ± 3,40 ^{Ab}	3271 ± 1092 ^{Ccd}	2407 ± 1351 ^{Cc}
0,75 mg/kg	35.2 ± 4,43 ^{Ab}	41,0 ± 2,34 ^{Ab}	1890 ± 5600 ^{Cc}	3670 ± 1174 ^{Cc}

Letras minúsculas comparam valores na coluna e letras maiúsculas comparam valores entre linhas. Letras diferentes representam diferença estatística, ($p < 0,05$).

Tabela 10. Variáveis bioquímicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de *A. squamosa*, após 7 dias da administração intraperitoneal.

Tratamento	Uréia	Creatinina	AST	ALT
Salina	46,5 ± 6,5	0,2 ± 0,0	132,5 ± 31,5	83,5 ± 11,5
Tween 80	45,5 ± 7,5	0,1 ± 0,0	126,5 ± 22,5	83,5 ± 11,5
0,75 mg/kg	47,5 ± 0,5	0,15 ± 0,05	116,5 ± 45,96	70,5 ± 20,5

Tabela 11. Efeito do extrato acetato de etila de *A. squamosa* sobre o peso corporal de camundongos após 24 horas e 7 dias da administração oral.

Tratamento	Após 24 horas		Após 7 dias	
	Dia 0	24 horas	Dia 0	Dia 7
Salina	25,32 ± 0,70	26,38 ± 0,88	25,12 ± 0,88	27,46 ± 0,29
Tween 80	25,44 ± 0,75	26,19 ± 0,55	26,36 ± 2,16	27,90 ± 3,13
200 mg/kg	29,88 ± 4,24	31,13 ± 5,48	30,99 ± 3,01	28,89 ± 2,74
300 mg/kg	—	—	33,03 ± 2,28	31,72 ± 1,25
400 mg/kg	27,31 ± 2,05	29,55 ± 3,15	27,30 ± 2,60	29,65 ± 4,02
500 mg/kg	—	—	29,67 ± 2,67	31,64 ± 2,59
750 mg/kg	—	—	24,78 ± 9,10	29,46 ± 5,52

Tabela 12. Efeito do extrato acetato de etila de *A. squamosa* sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos após 7 dias da administração oral.

Orgãos	Fígado	Rim D	Rim E	Baço
Tratamento				
Salina	4,45 ± 0,86 ^a	0,81 ± 0,07 ^a	0,75 ± 0,09 ^a	0,48 ± 0,5 ^{ab}
Tween 80	5,17 ± 1,03 ^a	0,77 ± 0,65 ^a	0,80 ± 0,09 ^a	0,56 ± 0,26 ^a
200 mg/kg	4,69 ± 0,85 ^a	0,92 ± 0,17 ^a	0,85 ± 0,30 ^a	0,52 ± 0,27 ^{ab}
300 mg/kg	4,93 ± 0,69 ^a	0,63 ± 0,07 ^a	0,64 ± 0,05 ^a	0,31 ± 0,05 ^a
400 mg/kg	5,66 ± 1,23 ^a	0,94 ± 0,33 ^a	0,92 ± 0,28 ^a	0,85 ± 0,37 ^b
500 mg/kg	5,12 ± 0,79 ^a	0,93 ± 0,24 ^a	0,96 ± 0,24 ^a	0,29 ± 0,69 ^a
750 mg/kg	5,00 ± 0,53 ^a	0,86 ± 0,13 ^a	0,87 ± 0,12 ^a	0,51 ± 0,25 ^{ab}

Letras diferentes representam diferença estatística, ($p < 0,05$).

Tabela 13. Efeito do extrato acetato de etila de *A. squamosa* sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos após 24 horas da administração oral.

Tratamento	Fígado	Rim D	Rim E	Baço
Salina	$4,77 \pm 0,53^a$	$0,71 \pm 0,81^a$	$0,72 \pm 0,67^a$	$0,60 \pm 0,15^b$
Tween 80	$4,16 \pm 0,50^a$	$0,63 \pm 0,09^a$	$0,64 \pm 0,09^a$	$0,48 \pm 0,24^{ab}$
200 mg/kg	$5,10 \pm 1,15^{ab}$	$0,68 \pm 0,55^a$	$0,67 \pm 0,69^a$	$0,36 \pm 0,12^a$
400 mg/kg	$6,12 \pm 0,94^b$	$0,73 \pm 0,13^a$	$0,75 \pm 0,15^a$	$0,30 \pm 0,76^a$

Letras diferentes representam diferença estatística, ($p < 0,05$).

Tabela 14. Variáveis hematológicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de *A. squamosa*, após 7 dias da administração oral.

Variáveis	Ht (%)		CTL	
Tratamento	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia 7
Salina	$51,6 \pm 2,608^{Aab}$	$47,8 \pm 2,95^{Aa}$	5960 ± 2124^{Aa}	5020 ± 882^{Aa}
Tween 80	$52,8 \pm 7,79^{Aab}$	$44,2 \pm 6,38^{Aa}$	5720 ± 2170^{Aa}	5490 ± 2081^{Aa}
200 mg/kg	$45,9 \pm 7,82^{Aab}$	$46,2 \pm 5,95^{Aa}$	2959 ± 1908^{Aa}	4630 ± 3487^{Aa}
300 mg/kg	$56,3 \pm 6,03^{Aa}$	$58,3 \pm 4,50^{Aa}$	4083 ± 2012^{Aa}	3583 ± 1353^{Aa}
400 mg/kg	$44,2 \pm 5,21^{Aab}$	$44,0 \pm 4,58^{Aa}$	5120 ± 2198^{Aa}	6070 ± 2553^{Aa}
500 mg/kg	$40,3 \pm 16,6^{Ab}$	$44,3 \pm 4,04^{Aa}$	3075 ± 1668^{Aa}	2900 ± 813^{Aa}
750 mg/kg	$46,8 \pm 0,45^{Aab}$	$25,0 \pm 9,79^{Bb}$	2830 ± 840^{Aa}	4320 ± 1604^{Aa}

Letras minúsculas comparam valores na coluna e letras maiúsculas comparam valores entre as linhas. Letras diferentes representam diferença estatística. ($p < 0,05$).

Tabela 15. Variáveis bioquímicas e hematológicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de *A. squamosa*, após 24 horas da administração oral.

Variáveis	Ureia	Creatinina (mg/dl)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ht (%)	CTL
Tratamento						
Salina	51,5 ± 1,50	0,25 ± 0,05	173,5 ± 24,5	82,5 ± 22,5	50,40 ± 8,64	5260 ± 1247
Tween 80	47,0 ± 6,00	0,15 ± 0,05	126,5 ± 22,5	57,0 ± 15,0	46,20 ± 2,38	6120 ± 1279
200 mg/kg	40,0 ± 1,00	0,2 ± 0,00	136,0 ± 13,0	58,5 ± 1,50	49,33 ± 5,38	4450 ± 1239
400 mg/kg	42,0 ± 8,00	0,2 ± 0,00	137,0 ± 2,0	69,0 ± 9,00	46,20 ± 3,86	5455 ± 1454

Tabela 16. Variáveis bioquímicas de camundongos tratados com extrato acetato de etila de *A. squamosa*, após 7 dias da administração oral.

Variáveis	Ureia	Creatinina (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)
Tratamento				
Salina	46,5 ± 6,5	0,2 ± 0,00	162 ± 2,00	77,5 ± 17,5
Tween 80	45,5 ± 7,50	0,15 ± 0,50	132,5 ± 44,54	61,00 ± 34,0
200 mg/kg	49,5 ± 14,5	0,1 ± 0,00	170 ± 6,00	127,5 ± 55,5

DISCUSSÃO

O EAC demonstrou que, embora seu efeito seja inferior ao de anti-helmínticos comerciais, possui resultados superiores comparado a outros extratos de plantas tidas como anti-helmínticas. ASSIS *et al.* (2003), verificaram inibição com extrato acetato de etila de *S. anthelmia* em torno de 20% na concentração de 12,5 mg mL⁻¹, enquanto que com o mesmo extrato de *A. squamosa* obteve-se uma inibição de 99%, na concentração de 5 mg mL⁻¹.

O extrato aquoso das sementes de *A. squamosa*, não mostrou um bom percentual de inibição de eclosão de ovos de *H. contortus*. Resultados semelhantes foram obtidos com o infuso da casca de *Annona senegalensis* (ALAWA *et al.*, 2003). Provavelmente o método de extração com água, utilizado em ambos os trabalhos, determinou a fraca ação do extrato. Segundo ELLOF (1998), a extração com água limita os tipos de compostos extraídos, pela diferença de solubilidade das substâncias presentes.

O EACAS obteve melhor desempenho sobre a inibição de eclosão de ovos, por isso foi submetido a coluna cromatográfica para separar substâncias puras. As frações 22 e 31 demonstraram conter somente acetogeninas. O efeito anti-helmíntico do EACAS foi semelhante ao das acetogeninas isoladas das frações, provavelmente porque neste há um alto teor dessas substâncias. Em várias outras frações da coluna cromatográfica do EACAS foram detectadas acetogeninas em misturas difíceis de separar. Portanto o efeito anti-helmíntico do extrato foi provavelmente devido as acetogeninas isoladas e a outras mais que não possível identificar. Acredita-se que acetogeninas atuam de forma semelhante aos benzimidazóis, isto é, interrompendo o processo de mitose, impedindo a evolução de ovo até larva. É provável que a interferência com a mitose ocorra pelo corte no suprimento de ATP devido ao bloqueio da cadeia de transporte de elétrons, mecanismo de ação das acetogeninas.

PADJAMA *et al.* (1993), testaram efeito de oito acetogeninas isoladas da *Uvaria hookeri* e *Uvaria narum*, contra formas adultas de *H. contortus*, observando relação negativa entre o tempo de morte em minutos e a concentração das acetogeninas. Estas

acetogeninas apresentavam estrutura química semelhante às isoladas no presente trabalho.

Os efeitos observados após a administração do EACAS podem estar relacionados a presença de substâncias tóxicas e dentre elas as acetogeninas. No presente trabalho foram isoladas duas acetogeninas, com estruturas químicas semelhantes a acetogenina Rolliniastatin-1 isolada da *A. atemoya* (DURET *et al.*, 1999). Esta acetogenina foi utilizada para os testes de toxicidade aguda em camundongos, mostrando-se letal quando administrada por via intraperitoneal na dose de 5 mg kg⁻¹. O EACAS no presente trabalho, foi letal por via i.p em baixas doses, estando de acordo com os resultados de DURET *et al.*, (1999), demonstrando que a presença das acetogeninas pode ser determinante para o efeito tóxico da planta.

A presença de outras substâncias no EACAS de *A. squamosa*, tais como alcalóides, identificados pela análise fitoquímica, também podem ter contribuído com os efeitos tóxicos da planta. SHANKER *et al.* (2002) testaram o efeito de alcalóides extraídos de *Taxus baccata* em camundongos. O alcalóide isolado TXA-2 obteve uma DL50 de 3,38mg/kg, demonstrando o potente efeito tóxico dessas substâncias. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados no teste de toxicidade por via i.p com o EAC da *A. squamosa*, que apresentou uma DL50 de 3,63mg/kg.

O EACAS por via i.p. não alterou significativamente o peso dos animais, após 7 dias ou 24 horas, mostrando que o mesmo não afetou a ingestão da ração nem a absorção alimentar. O peso dos órgãos não diferiu significativamente do controle após 24 horas e 7 dias, nas doses estudadas, demonstrando que o extrato não causou alterações nestes órgãos, o que foi comprovado pelos níveis normais de uréia, creatinina, AST e ALT. Estes resultados, porém foram obtidos após uma única dose do EACAS e disfunções renais e hepáticas podem ocorrer após doses múltiplas ou em doses mais elevadas do extrato. GUPTA *et al.* (1994) verificaram que o extrato de folhas de *Clerodendron colebrookianum* administrado a camundongos por via i.p em dose de 2, 4 e 8 mg/kg não promoveu disfunção renal e/ou hepática ao passo que doses acima de 40 mg/kg administrados semanalmente, causaram aumento de AST, ALT e fosfatase alcalina. Da mesma forma no trabalho realizado por Al-H *et al.* (2002), a AST e ALT mostraram-se aumentadas somente após administração de folhas de *Catha edulis* por mais de 2 meses.

O EACAS por via i.p, não provocou mudanças significativas no Hematócrito (Ht) e contagem total de leucócitos (CTL), em nenhuma das doses estudadas, demonstrando que o extrato não promoveu a migração de células nem em curto período de 24 horas e nem após 7 dias. O extrato após 24 horas causou, na dose de 5 mg/kg, aumento significativo no peso dos animais, porém é provável que este efeito não tenha sido causado pela administração do extrato, mas pela diferença do consumo individual de ração, uma vez que não existem relatos de que o EACAS promova aumento do consumo alimentar.

O EACAS por via oral, após 7 dias e 24 horas, não alterou o peso dos animais, mostrando que o mesmo não interferiu com a ingestão alimentar. Os pesos dos órgãos não diferiram significativamente do controle, após 7 dias, no entanto o peso do fígado, na dose de 400 mg/kg, aumentou significativamente após 24 horas. Resultados parciais semelhantes a estes foram obtidos por WITTHAWASKUL *et al.* (2003), que avaliaram a toxicidade aguda de saponinas, extrato metanólico e aquoso isolados de *Schefflera leucantha*, em dose única de 5000mg/kg, não verificando após um tempo maior, 14 dias da administração, alteração no peso do fígado, baço e rins. O aumento do fígado, verificado após 24 horas da administração do extrato, pode ser decorrente do metabolismo de primeira passagem que pode ocorrer logo após a administração de substâncias por via oral e ainda que maiores quantidades de substâncias presentes no extrato serão metabolizadas quando da administração do mesmo em doses mais elevadas, como a dose de 400 mg/kg, promovendo um maior efeito a nível de células hepáticas. No entanto os níveis normais de AST e ALT indicam que o EACAS na dose de 400 mg/kg, não causou disfunção hepática, nem após 7 dias e nem após 24 horas, uma vez que efeitos tóxicos no fígado podem ser identificados pelos elevados níveis de transaminases (SHANKER *et al.*, 2002) e os níveis normais dessas enzimas descartam a presença de uma lesão hepática aguda (RODRIGUES, 1998).

O EACAS administrado por via oral apresentou uma maior margem de segurança pois a administração por via oral apresenta-se menos tóxica do que a sua administração por via i.p, uma vez que por via oral pode ocorrer uma pobre absorção da substância ou ainda esta ser detoxificada através da passagem pelo fígado, enquanto que por via i.p. ocorre a absorção sistêmica e desta forma os efeitos tóxicos mostram-se mais intensos e mais precoces (LOOMIS e HAYES, 1996).

Estudos com relação aos sintomas nos animais inoculados com EACAS não foram relatados, porém o mecanismo de ação das acetogeninas pode estar relacionado a alguns dos sintomas observados, uma vez que estas inibem o complexo I da CR mitocondrial, impedindo o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons e a produção de ATP para as células. A ausência de ATP causa apoptose, e não havendo o suprimento energético para as células não haverá o funcionamento das mesmas, acarretando em parada respiratória e cardíaca.

Resultados obtidos por REBECCA *et al.* (2001) demonstraram que o extrato de *Stryphnodendron adstrigens* interferiu com a fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas, mecanismo semelhante ao das acetogeninas. No entanto em estudos posteriores com esta planta não verificou-se alteração comportamental nos animais inoculados por via oral na dose única de 2000 mg/kg, porém mudanças gerais de comportamento foram observadas após administração do extrato em doses de 800 e 1600 mg/kg durante 30 dias (REBECCA *et al.*, 2002). Dessa forma estudos complementares devem ser realizados para tentar esclarecer a ação de inibidores da cadeia respiratória em animais de laboratório.

CONCLUSÕES

O EACAS mostrou um bom percentual (acima de 90%) de inibição de eclosão de ovos em concentrações acima de 5mg mL^{-1} . As acetogeninas isoladas do EACAS apresentaram estruturas químicas não relatadas na literatura e possuem atividade ovicida sobre *H. contortus*. O extrato apresentou, além das acetogeninas, uma ampla variedade de substâncias, como foi demonstrado pela análise fitoquímica do mesmo. Efeitos tóxicos aparentes não foram vistos após a administração do EACAS por via intraperitoneal e oral, em doses abaixo de 0,75 e 200 mg/kg.

PERSPECTIVAS

A partir deste trabalho surgem novas perspectivas da utilização de extratos de *A. squamosa*, principalmente do EACAS sobre ovos do nematóide *H. contortus*. Pesquisas futuras podem ser desenvolvidas no intuito de esclarecer o mecanismo ovicida das acetogeninas, bem como pesquisar a atividade ovicida de outros compostos presentes no EACAS. Estudos complementares de toxicidade são ainda necessários para consolidar a utilização da planta *A. squamosa* na medicina veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRÍCOLA .Fruta do Conde precisa de solo drenado.[on line].www.rural.news, 1999.

ALAWA, C.B.I.; ADAMU, A.M.; GEFU, J.O.; AJANUSI, O.J.; ABDU, P.A.; CHIEZEY, N.P.;ALAWA, J.N.; BOWMAN, D.D. In vitro screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**,v.113.p.73-81, 2003.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p.209-217, 2002.

ALLALI, F. Q.; LIU, X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins : Recent Progress. **Journal of Natural Product**, v.62, p. 504-540, 1999.

ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinais Brasileiras**.Hemus Editora, São Paulo, p.341.1993.

AMDUR, M.O; DOULL, J.; KLAASSEN, C.D. **Toxicology: The Basic Science of Poisons**.4^aed. McGraw-Hill. New York. 1991.

AMORIM, A.; BORBA, H.R.; SILVA, W.J. Ação anti-helmíntica de plantas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.68, p. 64-70, 1987.

AMORIM A.; RODRIGUES,M.L.A.; BORBA, H.R.,Influência de extratos vegetais *in vitro* na viabilidade de larvas de nematóides gastrointestinais de bovinos.**Revista Brasileira de Farmácia**,v. 77, p. 47-48, 1996.

AROSEMENA, N.A.E.; BEVILAQUA, C.M.L.; MELO, A.C.F.L.; GIRÃO, M.D. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. **Revue Médecine Vétérinaire**,v.150, p. 873-876, 1999.

- ASSIS, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, L.S.; COSTA, C.T.C.; SOUZA, J.A.L. Ovicidal and Larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 43-39, 2003.
- ASUZU, L.U.; NJOKU, C.J. The anthelmintic effect of *Alstonia boonei* bark and *Nauclea latifolia* leaf aqueous extracts on *Trichostrongylus* infective larvae. **Fitoterapia**, v.62, p. 220-222, 1996.
- BALBACH, A.; BOARIM, DANIEL, S.F. **As frutas na Medicina Natural**. 1^a ed. Missionária. Itaquaquecetuba, São Paulo. 1993.
- BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C.; Avaliação da Toxicidade In: **Toxicologia**. 2^a ed. Manole. São Paulo, 1987.
- BATISTA, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; MORAIS, S. M. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* de *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* sobre *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal**, v. 9, p. 67-73, 1999.
- CAPARRO-LEFEBVRE, D; ELBAZ, A. Possible relation of typical parksonism in the French West Indies with consupion of tropical plants: a case-control study. **Lancet**, v. 345, p.281-286, 1999.
- CHANG, F.R; et al. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. **Phytochemistry**, v.51, p. 883-889, 1999.
- CHAO-MING, Li; NING-HUA, T.; QING, M.; HUI-LAN, Z.; XIAO-JIANG, H.; YU, W.; JUN, Z. Cyclopeptide from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 521-523, 1997.
- CHARLES, T. P. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitos de ovinos deslanados no semi-árido pernambucano. **Ciência Rural**, v.24, p. 437-442, 1995.
- COLES, G.C., BAUER, F.H.M., BORGSTEEDE, S., GREERTS, S., KLEI, M.A., AND TAYLOR, WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

- (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p.35-44, 1992.
- DAMASCENO, D.C.; VOLPATO, G.T.; SARTORI, T.C.; RODRIGUES, P.F.; PERIN E.A.; CALDERON, I.M. RUDGE, M.V. Effects of *Annona Squamosa* extract on early pregnancy in rats. **Phytomedicine**, v. 9, p. 667-672, 2002.
- DURET, P.; HOCQMULLER, R.; CAVÉ, A. Bulladecin and Atemotetrolin, two bis-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona atemoya* seeds. **Phytochemistry**, v. 48, p. 499-506, 1998
- DURET, P; HOCQUEMILLER, R.; GANTIER J-C.; FIGADÈRE, B. Semisynthesis and citotoxicity of amino acetogenins and derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p.1821-1826, 1999.
- ELOF, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p.1-8, 1998.
- FUJIMOTO, Y.; C.MURASAKI; K. KAKINUMA; T.EGUCHI; N. IKEKAWA; M.FURUYA; K. HIRAYAMA; T.IKEKAWA; M. SAHAI; Y.K. GUPTA; A.B. RAY. Squamostatin-A: Unprecedented bis-tetrahydrofuran acetonenin from *Annona squamosa*. **Tetrahedron Letters**, v.31, p.535-538, 1990.
- GALLARDO, T. ; ARAGÓN, R.; TORMO, J.R.; BLÁSQUEZ, A.; ZAFRA-POLO, M.C.; CORTES, D. *et al.* Acetogenins from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry**, v. 47, p.811-816, 1998.
- GIRÃO, E.S.MEDEIROS, L.P.; GIRÃO, R.N. Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrointestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí. **Ciência Rural**, v. 22, p. 197-202, 1992.
- GLEYE, C.; RAYNAUD S.; HOCQUEMILLER, R. LAURENS, A.; FOURNEAU C.; SERANI, L.; LAPRÉVOTE; ROBLOT, F.; LEBOEUF, M.; FOURNET, A.; ARIAS, A. R.; FIGADÉRE

- B.;CAVÉ A. Muricadienin, Muridienins and Chatenaytrienins, the early precursors of Annonaceous Acetogenins. **Phytochemistry**, v.47, p.749-754, 1998.
- GLEYE, C.; RAYNAUD, S.; FOURNEAU, C.; LAUREAS, A.; LAPRÉVODE, O.; SERANI, L.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Cohibins C and D, two important metabolites in the biogenesis os acetogenins from *Annona muricata* and *Annona nutans*. **Journal Natural Products**, v. 63, p. 1192-1196, 2000.
- GUADAÑO, A. et al. Inseticidal and Mutagenic Evaluation od Two Annonaceous Acetogenins. **Journal of Natural Products**, v.63, p. 773-776, 2000.
- GUPTA, M. MAZUMDER, U.K. DAS S. Effect of alkaloidal extract from *Clerodendron colebrookianum* on hematological parameters and hepatorenal functions in mice. **Indian Journal Experience Biology**, v. 32, p. 189-191, 1994.
- HAMMOND, J. A., FIELDING, D., AND BISHOP, S. C. 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, v. 21, p.213-228, 1997.
- HENNON, S.P. Les Résistances aux anthelminthiques: synthèse bibliographique des connaissances actuelles. (THESE Docteur veterinaire). Diplôme d'Etat. Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, 1993.
- HERD, P. R. Equine parasite control keeping up with evolution. **Veterinary Medicine**, v. 90, p. 447-480, 1995.
- HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; RODRIGUES, J.A.; HAUN, M.; NUNES, D.S.; BRITO, A.R.M.S. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 229-234, 2000.
- HOOP, D.C. et al. Squamotacin: an Annonaceous acetogenin with cytotoxic seletivity for the human prostate tumor cell lline (PC-3).**Journal Natural Products**,v.59, p .97-99, 1996.

- HOOP, D.C.; ALALI, F.Q.; GU, Z.; McLAUGHLIN, J.L. Three new bioactive bis-adjacent THF-ring acetogenins from the bark of *Annona squamosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 569-575, 1998.
- HUBERT J., AND KERBOEUF, D. A new method for culture of larve used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongilosis: comparison with fecal cultures. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p. 63-71, 1984.
- HUKKERI, VI.; KALVANI, G.A.; HATPAKI, B.C.; MANVI, F.V. In vitro anthelmintic activity of aqueous extract of fruit rind of *Punica granatum*. **Fitoterapia**, vol. LXIV, nº1, 1993.
- JARAMILLO, M.C.; ARANGO, G.J.; GONZALEZ, M.C.; ROBLEDO, VELEZ, I.D. Citotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, 71: 183-186, 2000.
- JOYNER G. The sugar apple. IFAS Plam Beach County Cooperative Extension Service [on line].
- KETSIS, J.K.; A. Taylor; D.D. Bowman; D.L. Brown; L.D. Warnick; H.N. Erb. *Chenopodium ambrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. **Small Ruminant Research**, v. 44, 193-200, 2002.
- LAINETTI, R.; BRITO, N. R. S. **A cura pelas ervas de plantas medicinais brasileiras**. Editora Tecnoprint Ltda., Rio de Janeiro, 169, 1979.
- LARINI, L. Avaliação Toxicológica In: **Toxicologia**. 2ª ed. 1993.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed. Sarvier: São Paulo, 1995.
- LOOMIS, T.A.; HAYES, A.W. **Loomis's Essentials of Toxicology**. 4ª ed. San Diego. 1996.
- LONDERSHAUSEN, M. L. *et al.* *Annona squamosa*. Biochemistry. [on line]. Molecular mode of action of Annonins. **Pesticide Science**. v. 33, p. 427-438, 1991.

- MARTINS. Plantas Medicinais e Aromáticas.[on line] Disponível [www.http://nutrinet.jfa.zaz.br/medicinais.htm](http://nutrinet.jfa.zaz.br/medicinais.htm), 1992.
- MELO, A. C. F. L.; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C. L. M.; VIEIRA, L.S.; ECHEVARRIA, F.A.M.; MELO, L.M. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanho de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brazil. *Ciência Rural*, 33.n 2. p. 339-344, 2003.
- MENEZES, R. C. A. A. *et al.* Estudos preliminares *in vitro* da atividade ovicida de folhas e sementes de quatro leguminosas sobre *Haemonchus contortus* de caprinos. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.15, p. 121-127, 1992.
- MIYOSHI, H.; OHSHIMA, M.; SHIMADA, H.; AKAGI, T.; IWAMURA, H.; McLAUGHLIN, J.L. Essential Structural Factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1365.p.443-452, 1998.
- MONTEIRO, M.H.D; GOMES-CARNEIRO, M.R.; FELZENSWALB,I.; CHAOUUD,I.; PAUMGARTTEN,F.J.R.A. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **Journal of Ethnopharmacology** 74:149-157, 2001.
- MONZON, R.B; et al. Larvicidal potencial of five Philippine plants against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**,v.24,p.755-659, 1994.
- MORITA, H. et al. Saquamosine A, a Benzoquinazoline Alkaloid from the seedes of *Annona squamosa* .**Journal Natural Products**,v.63,p.1707-1708, 2000.
- MORTON, J. F. Sugar Apple.In: Fruits of warm climates.69-72, 1987.
- MOTOYAMA, T.; YABUNAKA, H.; MYOSHI, H. Essential Structural Factors of Acetogenins, Potent inhibitors of Mitochondrial Complex I. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**.12, 2089-2092, 2002.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica**. Atheneu. 7ªed. São Paulo, 1994.

- NOGUEIRA, C. M.D.; MORAIS, N.M.T.; LOPES, M.F.G. Análises químicas em plantas medicinais . **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77, p.5-6, 1996.
- NONFON, M.; LIEB, F.; MOESCHLER, H.; WENDISCH, D. Four Annonis From *Annona Squamosa*. **Phytochemistry**, v. 29, p.1951-1954, 1990.
- 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**, 96: 55-62, 1995.
- OGA, S. Introdução à toxicologia .Em: **Fundamentos da Toxicologia**. Atheneu. São Paulo 1996.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de Farmacobotânica. 2ªed.Atheneu.São Paulo.1998.
- PADJAMA, V.; THANKAMANY, V.; HISHAM, A. Antibacterial, antifungal and anthelmintic activities of root barks of *Uvaria hookeri* and *Uvaria narum*. **Journal of Ethnopharmacology** 40:181-186, 1993.
- PESSOA, L.M. Atividade anti-helmíntica de *Ocimum gratissimum* Linn e eugenol contra *Haemonchus contortus*. Dissertação de mestrado, 66p.Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2001.
- PESSOA, L.M.; S.M..Moraes; C.M.L. Bevilaqua; J.H.S. Luciano. Anthelmintic activity of essential oil of *Acimun gratissimum* Linn. and Eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, 109.p.59-63, 2002.
- PINHEIRO, R.R; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, 2000.
- PIO CORRÊA, M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, 6 vols. IBDF, Ministério da Agricultura, p.4329, 1984.

- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Anthelmintics Drugs In: **Pharmacology**.3^{ed}. Churchill Livingstone,776-781,1995.
- RASAI, S; GEORGE, A.P.; KANTHARAJAH, A.S. Tissue culture of *Annona* spp.(cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): A review. **Scientia Horticulturae**.62, p.1-14, 1995.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs.**Toxicon**, v.39, 603-613, 2000.
- REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.I.; KELMER-BRACHT, A.M.; PAGADIGORRIA, C.L.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A.; Efeito do extrato bruto liofilizado do barbatimão sobre mitocôndrias de fígado de rato. XVI. **Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental** , Caxambu, p.414.2001.
- REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R.K.N.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.;MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**: 83, 101-104, 2002.
- RODIER, S.; HUERON, Y.L.; RENOUX, B.; DOYON,J.; RENARD, P.; PIÉRRE, A.; GESSON, J-P.; GRÉE, R. Synthesis and Cytotoxic activity of acetogenin analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry letters**. 10, 1373-1375, 2000.
- RODRIGUES, E.R.; PEDRAZZI, A.H.P.; BASTOS, J.K. Acute preclinical toxicity study of *Zanthoxylum naranjillo* extract. **Phytotherapy Research**.12, 512-516, 1998.
- RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of Ethnopharmacology** 89, 91-95, 2003.
- SALUJA, A.K; SATANEI , P.D. Phytodermical study of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, v. 619, p.359-360, 1989.
- SANTOS, A.F. dos; SANT'ANA, A.E.Molluscicidal properties of some species of *Annona*. Phytomedic in: **International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 8, p.115-120, 2001.

- SAXENA, R.C. *et al.* Larvicidal and chemosterilante activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephensi*. **Journal of American Mosquito**, v. 9, p. 84-87, 1993.
- SHANKER, N.K.R.P.; TRIVEDI, V.P.; CHANSURIA, J.P.N.; PANDEY, V.B. An evaluation of toxicity of *Taxus baccata* Linn. (Talispatra) in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**. 79, 69-73, 2002.
- TAKADA, Motoyuki *et al.* Definition of crucial structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1460:302-310, 2000.
- TAYLOR, M.A.; HUNT, K.R.; GOODYEAR, K.L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology** 103, 183-194, 2002.
- TORMO, R.J.; GALLARDO, T.; ARAGÓN, R.; CORTES, D.; ESTORNELL, E. Specific Interaction of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. **Chemico- Biological Interactions**: 122, 171-183, 1999.
- TORMO, R.J.; ESTORNELL, E.; GALLARDO, T.; GONZÁLEZ, C.; CAVÉ A.; GRANELL, S.; CORTES, D.; ZAFRA-POLO, C. γ -Lactone functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Bioorganic & Medicinal Chemistry letters**. 11, 681-684, 2001.
- TURNER, D.M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaxo experience. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, 29-38, 1996.
- VIEIRA, L. S., CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, p. 99-103, 1999 a.
- VIEIRA, L. S., CAVALCANTE, A. C. R; PEREIRA M.F.; DANTAS, L.B.; XIMENES, L.J.F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, North-east Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue Médecine Vétérinaire**, 150,5, 447-452, 1999 b.

- ZAFRA-POLO, M.C.; GONZÁLEZ, M.C.; ESTORNELL, E.; SARBAZ, S.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of Mitochondrial Complex I. **Phytochemistry**, 42:253-271, 1996.
- ZENG, L.; WU, F.-E.; OBERLIES, N.H.; MCLAUGHLIN, L. Five new motethrahydrofuran ring acetogenins from the leaves *Annona muricata*. **Journal Natural Products**. 59:1035-1042, 1996.
- WAECHTER, A.; YALUFF, G.; INCHAUSTI, A.; ARIAS, A.R.; REYNALD, H.; CAVÉ, A.; FOURNET, A. Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Acetogenins Isolated from *Annona glauca*. **Phytotherapy Research**. vol 12, 541-544, 1998.
- WALLER, P. J.; DASH, K. M.; BARGER, I. A.; LE JAMBRE, L. F.; PLANT, J. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. **Veterinary Research**. v.136 p. 411-413, 1995
- WANG, Li-Quan et al. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, p.561-565, 2002.
- WITTHAWASKUL, P.; PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTHIKUL, T.; LERTPRASERTSUKE, N. Acute and subacute toxicities of the saponin mixture isolated from *Schefflera leucantha* Viguier. **Journal of Ethnopharmacology**: 89, 115-121, 2003.
- WU, Y.C. et al. Identification of ent-16 beta, 17 dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosin A and B from *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 635-637, 1996.
- YANG, X.J. et al. Studies on the chemical constituents of *Annona squamosa*. **Acta Pharmaceutica**, v.27, p.185-190, 1992.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrícola .Fruta do Conde precisa de solo drenado.[on line].www.rural.news

ALAWA, C.B.I.; ADAMU, A.M.; GEFU, J.O.; AJANUSI, O.J.; ABDU, P.A.; CHIEZEY, N.P.;ALAWA, J.N.; BOWMAN, D.D. **Veterinary parasitology**,113.p.73-81, 2003.

ALLALI, F. Q.; LIU, X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins : Recent Progress. **Journal of Natural Product**, v.62, p. 504-540, 1999.

ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinais Brasileiras**.Hemus Editora, São Paulo, p.341.1993.

AMORIM A.; RODRIGUES,M.L.A.; BORBA, H.R.,Influência de extratos vegetais in vitro na viabilidade de larvas de nematódeos gastrointestinais de bovinos.**Revista Brasileira de Farmácia**.v. 77., p. 47-48, 1996.

AMORIM, A.; BORBA, H.R.; SILVA, W.J. Ação anti-helmíntica de plantas. **Revista Brasileira de Farmácia**.68, 64-70, 1987.

ASSIS, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, L.S.; COSTA, C.T.C.; SOUZA, J.A.L. Ovicidal and Larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. 117, 43-39, 2003.

AYRES, M.C.C; ALMEIDA, M.A.O. Agentes Antinematódeos IN: Farmacológica Aplicada à Medicina Veterinária.2ª ed. Guanabara koogan.Rio de Janeiro, 1999.

BALBACH, Alfons; BOARIM, DANIEL, S.F. **As frutas na Medicina Natural**. 1ª ed.Missionária.Itaquaquecetuba, São Paulo.1993.

BATISTA, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; MORAIS, S. M. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* de *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* sobre *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal**, v. 9, p. 67-73, 1999.

CAPARRO-LEFEBVRE, D; ELBAZ, A. Possible relation of typical parksonism in the French West Indies with consupion of tropical plants: a case-control study. **Lancet**, v. 345, p.281-286, 1999.

CHANG, F.R; et al. Bioactive acetogenins from the seedes of *Annona atemoya*. **Phytochemistry**, v.51, p. 883-889, 1999.

CHAO-MING, Li et al. Cyclopeptide from the seedes of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 521-523, 1997.

CHARLES, T. P. Disponibilidade de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais parasitos de ovinos deslanados no semi-árido pernambucano. **Ciência Rural**. v.24 p. 437-442, 1995.

COLES, G.C., BAUER, F.H.M., BORGSTEEDE, S., GREERTS, S., KLEI, M.A., AND TAYLOR, WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology** 44, 35-44, 1992.

COLMAN-SAIZABITORIA, T. et al. Annojahin froma *Annona jahni*: A possible precursor of mono-tetrahyfuran acetogenins. **Phytochemistry**, v. 49, p.1609-1616, 1998.

DURET, P.; HOCQMULLER, R.; CAVÉ, A. Bulladecin and Atemotetrolin, two bis-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona atemoya* seeds. **Phytochemistry**, v .48, p. 499-506, 1998

DURET, P; HOCQUEMILLER, R.; GANTIER J-C.; FIGADÈRE, B. Semisynthesis and citotoxicity of amino acetogenins and derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7: 1821-1826, 1999.

ELOF, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**, 60.p. 1-8, 1998.

FUJIMOTO, Y.; C.Murasaki; K. Kakinuma; T.Eguchi; N. Ikekawa; M.Furuya; K. Hirayama; T.Ikekawa; M. Sahai; Y.K. Gupta; A.B. Ray.Squamostatin-A: Unprecedented bis-tetrahydrofuran acetonenin from *Annona squamosa*. **Tetrahedron Letters**, v.31.p.535-538,1990.

GALLARDO, T. Et al. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry**, v. 47, p .811-816, 1998.

GIRÃO, E.S.MEDEIROS, L.P.; GIRÃO, R.N. Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrointestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí.**Ciência Rural**.22: 197-202, 1992.

GITHIORI, J.B.; J. Hoglund; P.T. Waller; R.L. Baker.Anthelmintic activity of preparation derived from *Myrsine afriacana* and *Rapanea melanphloeos* against the nematode parasite *Haemonchus contortus*, of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**,80.p.187-191, 2002

GLEYE, C. et al. Cohibins C and D, two important metabolites in the biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and *Annona nutans*. **Journal Natural Products**,v. 63, p. 1192-1196, 2000.

GUADAÑO, A. et al. Insecticidal and Mutagenic Evaluation of Two Annonaceous Acetogenins. **Journal of Natural products**, v.63, p. 773-776, 2000.

HAMMOND, J. A., FIELDING, D., AND BISHOP, S. C. 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**,v. 21, p.213-228, 1997

HERD, P. R. Equine parasite control keeping up with evolution. **Veterinary Medicine**, v. 90, p. 447-480, 1995.

HOOP, D.C. et al. Squamotacin: an Annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line (PC-3). **Journal Natural Products**, v.59, p.97-99, 1996.

HOOP, D.C.; ALALI, F.Q.; GU, Z.; McLAUGHLIN, J.L. Three new bioactive bis-adjacent THF-ring acetogenins from the bark of *Annona squamosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 569-575, 1998.

HUBERT J., AND KERBOEUF, D. A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongilosis: comparison with fecal cultures. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p.63-71, 1984.

HUKKERI.VI.; KALVANI, G.A.; HATPAKI, B.C.; MANVI, F.V. In vitro anthelmintic activity of aqueous extract of fruit rind of *Punica granatum*. **Fitoterapia**, vol.LXIV, n°1, 1993.

JARAMILLO, M.C.; ARANGO, G.J.; GONZALEZ, M.C.; ROBLEDON, VELEZ, I.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, 71: 183-186, 2000.

JOYNER G. The sugar apple. IFAS Palm Beach County Cooperative Extension Service [on line].

KETSIS, J.K.; A.Taylor; D.D.Bowman; D.L. Brown; L.D.Warnick; H.N.Erb. *Chenopodium ambrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. **Small Ruminant Research**, v.44, 193-200, 2002

LAINETTI, R.; BRITO, N. R. S. **A cura pelas ervas de plantas medicinais brasileiras**. Editora Tecnoprint Ltda., Rio de Janeiro, 169, 1979.

LONDERSHAUSEN, M. L. *et al.* *Annona squamosa*. Biochemistry.[on line].Molecular mode of action of Annonins.**Pesticide Science**.v. 33,p.427-438,1991.

MARTIN, R.J. Modes of Action of Anthelmintic Drugs.**The Veterinary journal**. 154,11-34, 1997.

MARTINS. Plantas Medicinais e Aromáticas.[on line] Disponível www.http/nutrinet.jfa.zaz.br/medicinais.htm, 1992.

MENEZES, R. C. A. A. *et al.* Estudos preliminares *in vitro* da atividade ovicida de folhas de sementes de quatro leguminosas sobre *Haemonchus contortus* de caprinos. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.15, p. 121-127, 1992.

MONTEIRO,M.H.D; GOMES-CARNEIRO, M.R.; FELZENSWALB,I.; CHAOUDE,I.; PAUMGARTTEN,F.J.R.A. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*.Journal of ethonpharmacolgy 74:149-157,2001.

MONZON, R.B; et al. Larvicidal potencial of five Philippine plants against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**,v.24,p.755-659,1994.

MORITA, H. et al. Saquamosine A, a Benzoquinazoline Alkaloid from the seedes of *Annona squamosa* .**Journal Natural Products**,v.63,p.1707-1708,2000.

NOGUEIRA,C. M.D.; MORAIS, N.M.T.; LOPES, M.F.G. Análises químicas em plantas medicinais . **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77, p.5-6, 1996.

NONFON, Maria et al. FOUR ANNONIS FROM ANNONAS SQUAMOSA.**Phytochemistry**,v. 29,p.1951-1954, 1990.

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**, 96: 55-62, 1995.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de farmacobotânica. 2ªed.Atheneu.São Paulo.1997.

PADMAJA,V.; THANKAMANY, V.; HISHAM,A. Antibacterial, antifungal and anthelmintic activities of root barks of *Uvaria hookeri* and *Uvaria narum*. Journal of ethnopharmacology 40:181-186,1993.

PESSOA, L.M.; S.M..Moraes; C.M.L. Bevilaqua; J.H.S. Luciano. Anthelmintic activity of essential oil of *Acimun gratissimum* Linn. and Eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**,109.p.59-63,2002.

PESSOA, L.M. Atividade anti-helmíntica de *Ocimum gratissimum* Linn e eugenol contra *Haemonchus contortus*. Dissertação de mestrado, 66p.Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2001.

PINHEIRO, R.R; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, 2000.

PIO CORRÊA, M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, 6 vols. IBDF, Ministério da agricultura, p.4329,1984.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Anthelmintics Drugs In: **Pharmacology**.3ªed. Churchill Livingstone,776-781,1995.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs.**Toxicon**, v.39, 603-613, 2000.

REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R.K.N.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**: 83, 101-104, 2002.

SALUJA, A.K; SATANEI, P.D. Phytodermical study of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, v. 619, p.359-360, 1989.

SANTOS, A.F. dos; SANT'ANA, A.E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. Phytomedic in: **International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 8, p.115-120, 2001.

SAXENA, R.C. *et al.* Larvicidal and chemosterilant activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephensi*. **Journal of American Mosquito**, v. 9, p. 84-87, 1993.

TAKADA, Motoyuki *et al.* Definition of crucial structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1460:302-310, 2000.

TORMO, R.J.; ESTORNELL, E.; GALLARDO, T.; GONZÁLEZ, C.; CAVÉ A.; GRANELL, S.; CORTES, D.; ZAFRA-POLO, C. γ -Lactone functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Bioorganic & Medicinal Chemistry letters**. 11, 681-684, 2001.

TURNER, D.M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaco experience. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, 29-38, 1996.

VIEIRA, L. S., CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, p. 99-103, 1999.

ZAFRA-POLO, M.C.; GONZÁLEZ, M.C.; ESTORNELL, E.; SARBAZ, S.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of Mitochondrial Complex I. *Phytochemistry*, 42:253-271, 1996.

ZENG, L.;WU, F-E.OBERLIES, N.H.; MCLAUGHLIN, L. Five new motethrahydrofuran ring acetogenins from the leaves *Annona muricata*.*Journal Natural Products*. 59:1035-1042,1996.

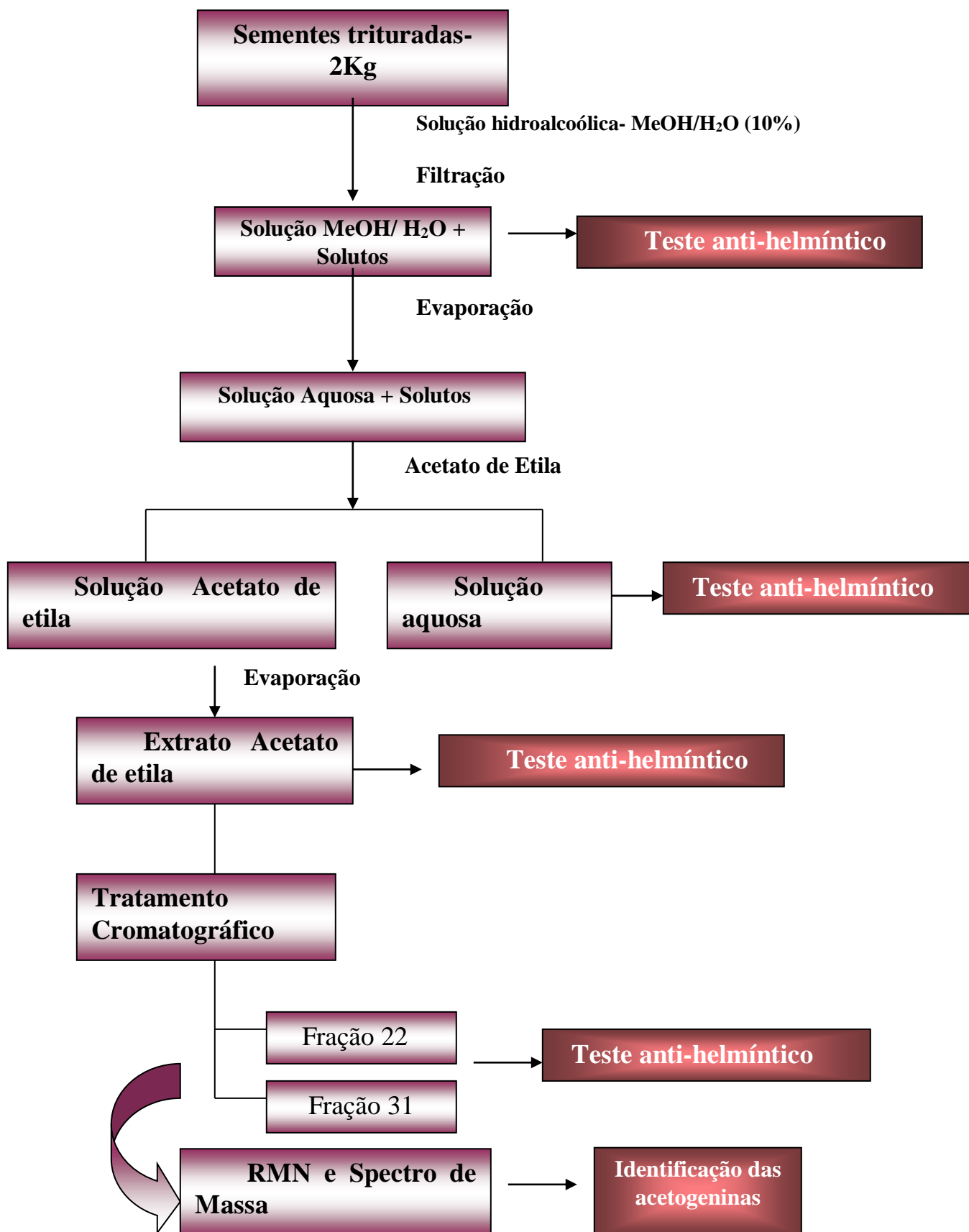
WALLER, P. J.; DASH, K. M.; BARGER, I. A.; LE JAMBRE, L. F.; PLANT, J. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep:learning from the Australian experience. **Vet. Rec.** v.136 p. 411-413, 1995

WANG, Li-Quan et al. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10,p.561-565,2002.

WU, Y.C. et al. Identification of ent-16 beta,17 dihydroxykauran-19-oic acid as na anti-HIV principle and isolation of the new diterpenóides annosquamosin A and B from *Annona squamosa*.**Jounal of Natural Products**, v. 59, p. 635-637,1996.

YANG, X.J. et al. Studies on the chemical constituents of *Annona squamosa*.**Acta Phamaceutic**,.v.27, p.185-190, 1992.

ANEXO I. FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DE ACETOGENINAS A PARTIR DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DE *ANNONA SQUAMOSA*



ANEXO II**ARTIGO I****Effects of the seed extracts and acetogenins of *Annona squamosa* Linn on the egg hatch test of *Haemonchus contortus***

Artigo submetido à revista: Veterinary Parasitology

Effects of the seed extracts and acetogenins of *Annona squamosa* Linn on the egg hatch test of *Haemonchus contortus*

Marta Maria Caetano de Souza¹, Claudia Marial Leal Bevilaqua¹, Selene Maia de Moraes²; Cícero Temístocles Coutinho Costa¹; Ana Raquel Araújo da Silva²

¹ Laboratório de Doenças Parasitárias-PPGCV/UECE; ²Laboratório de Química em Produtos Naturais/UECE

ABSTRACT

Annona squamosa, popularly known as an anthelmintic plant, was tested against the sheep and goat parasite, *Haemonchus contortus*. Egg hatch inhibition of the methanol:

water (90:10), ethyl acetate and aqueous extracts of *Annona squamosa* were evaluated in vitro. Tests were performed in five concentration as follows: 25, 5, 1, 0.2 e 0.04 mg mL⁻¹. Five replicate of each extract were accomplished with a negative control, the diluent Tween 80 and the positive control, thiabendazole. The ethyl acetate extract showed the best egg hatching inhibition (>90%). This extract was submitted to a silica gel column chromatography and the acetogenins Squamosin and Isoquamosin were isolated. The structures of compounds were identified by spectroscopic analysis. Both acetogenins showed anthelmintic activity and probably are responsible for the activity of the plant.

Key words: anthelmintic, *Haemonchus contortus*, nematode, acetogenins, *Annona squamosa*.

Introduction

In Northeastern Brazil, gastrointestinal parasitism of sheep and goats is one of the more important cause of mortality, causing elevated economic losses (Pinheiro *et al.*, 2000). Among gastrointestinal nematodes, *Haemonchus contortus* is the most frequent and pathogenic, being responsible for the high mortality rate in young animals during the rainy season (Menezes, 1992; Arosemena *et al.*, 1999). Trying to reduce these losses, synthetic anthelmintics are routinely used and sometimes indiscriminately, causing efficacy reduction, leading to an anthelmintic resistance, besides environmental pollution and food residues (Waller *et al.*, 1995; Herd, 1995). To decrease the negative impact of syntetic anthelmintics resistance, the use of phytotherapy is an alternative tool being the target of many researches nowadays. The study of plants from Annonacea family have demonstrated the presence of active substances with parasitocidal effects (Duret, 1998; Gallardo, 1998), however, there are not any study about the efficacy of *A. squamosa* seeds extracts against *H. contortus*. The aim of this work was to evaluate the action of extracts and isolated compounds of *A. squamosa* seeds on egg hatching of *H. contortus*.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials

The seeds of *A. squamosa* were obtained by manual extration from fruits bought in the central market of Fortaleza, Ceará, situated in northeast of Brazil, between April and June, 2001. The plant was identified by botanists of the Prisco Bezerra Herbarium of the Federal University of Ceará, Brazil, where a voucher specimem was deposited with number 31710.

2.2. Preparation of extracts

The preparation of extracts followed the methodology of Nonfon (1990). *A. squamosa* seeds (2kg) were triturated to obtain a powder. The powder was mixed with methanol:water (MeOH/H₂O) solution (90:10) and left in contact for seven days. The seeds with solvent were filtrated and the solvent (metanol:água) was evaporated under vacuum using a rotative evaporator. Methanol was eliminated and the remainder aqueous solution was transfered to a separatory funnel and washed for times (4x30ml) with ethyl acetate. The ethyl acetate solution was dried with anhydrous sodium sulfate. The ethyl acetate extract was obtained after solvent evaporation.

2.3. Cromatography of ethyl acetate extract of *A. squamosa* and isolation of acetogenins.

The ethyl acetate extract (EtOAc) was submitted to a silica gel column chromatography (0,063-0,200mm), being eluted with CHCl₃, EtOAc and MeOH in mixtures of increasing polarity, obtaining 64 fractions. All fractions were analysed by thin layer chromatography (TLC). The fraction 22 (eluted with 30:70; CHCl₃: EtOAc) and 31 (eluted with 100% EtOAc), showed high degree of purity by TLC and were analysed by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy using a 500 MHz Bruker instrument and mass spectrometry. The fractions 22 and 31 were used for the egg hatch test.

2.4. Parasites

Adult female *H. contortus* were obtained, from the abomasum, during necropsy of the sheep. The eggs were collected from female *H. contortus* and kept in sterilized feces for seven days. After this time, 5.000 larvae of third stage were used to infect orally two worm-free sheep, housed in metabolic cage with ration and dried grass.

2.5. In vitro egg hatch test

Recovery of eggs from the feces was performed by the method of Hubert & Kerboeuf (1984). The egg hatch assay was carried out by the method of Coles *et al.*, (1992). To perform this test, a volume of 500 μL , with 250 μL of the eggs solution (about 120 eggs) and 250 μL of extract solution were placed in 5 mL tubes. The concentrations of the extracts tested were 25, 5, 1, 0,2, 0,04 mg mL^{-1} and the negative control was the diluent Tween 80 and the positive control was thiabendazole (0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). After 48 hours of the incubation, a drop of lugol was added in the tubes to stop the eclosion of eggs. All larvae and eggs were counted in a microscope. Five replicates were done for each concentration.

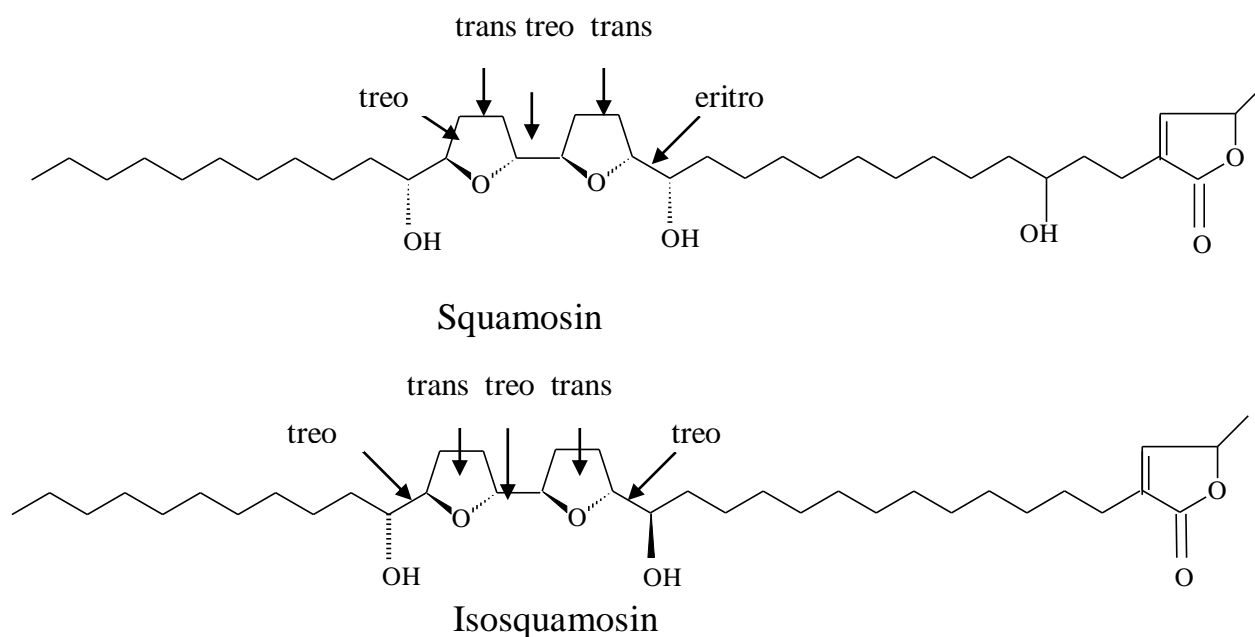
2.6. Statistical analysis

Statistical comparisons of the results from the egg hatch inhibition by the extracts of different concentrations were performed using Kruskal-Wallis test, with significance level of 5% (SAMPALIO, 1998). The CE50 was determined by the regression calculation and the data showed exponential. CE50 from each extract was calculated by the equation which showed the tendency row with minimum determination coefficient of 70% (CAMPELLO, 2003).

3. Results

3.1 Structural determination of compounds

The structures of isolated compounds were determined by ^1H and ^{13}C NMR and mass spectral analysis. Fractions 22 and 31 are polyhydroxylated acetogenins with two dehydrofuran rings which names are Squamosin and Isosquamosin.



3.2 Inhibition egg hatch test of *H. contortus*

The higher inhibition of egg hatching was obtained with the EtOAC extract, in the concentrations of 5 and 25 mg mL⁻¹, which did not demonstrated significant statistical difference with the thiabendazole, in 0.1 μg mL⁻¹. The aqueous extract showed an inhibition percentage, higher than the negative control, Tween 80, in 25 mg mL⁻¹, but in 5 mg mL⁻¹ did not have statistical difference comparing to the negative control. The percentage of egg hatch inhibition of *H. contortus*, with MeOH/H₂O, aqueous and EtOAC extracts are demonstrated in table 1. The EtOAC fractions 22, correspondent a Squamosin and 31, correspondent a Isosquamosin, inhibited the egg hatch more than 90% with 5 e 25 mg mL⁻¹,

similarly to the EtOAC extract. The results obtained with acetogenins are displayed in table 2. The CE50 of the aqueous, methanol: water, ethyl acetate extracts, *Squamosina* and *Isosquamosina* was 10.02 mg mL⁻¹, 0.89 mg mL⁻¹, 0,76 mg mL⁻¹, 0,96 mg mL⁻¹ and 0,94 mg mL⁻¹.

Table 1. Inhibition percentage in the egg hatch test of *H. contortus* with methanol/H₂O, aqueous and EtOAC extracts, of *Annona squamosa*.

Concentration mg mL ⁻¹	Extracts		
	Methanol/ H ₂ O	Aqueous	Ethyl acetate
25	81,58 ^{BCbc}	52,64 ^{Ac}	100,00 ^{Aab}
5	81,95 ^{ABab}	14,28 ^{Bc}	99,03 ^{Aab}
1	53,10 ^{Ca}	13,74 ^{BCb}	39,47 ^{Bab}
0,2	4,81 ^{Dab}	3,02 ^{Db}	8,97 ^{BCa}
0,04	2,80 ^{Da}	6,25 ^{Ca}	5,31 ^{Ca}
Tween 80 (3%)	4,25 ^D	4,25 ^{CD}	4,25 ^C
Thiabendazole (0,1 µg mL ⁻¹)	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A

Capital letters compare means among values columns (different extracts), small letters compare means among in the in the rows (different concentrations), (p< 0.05).

Table 2. Inhibition percentage of egg hatch of *Haemonchus contortus* with *Annona squamosa* acetogenins.

Concentration mg mL ⁻¹	Ethyl acetate	Isosquamosin	Squamosin
25	100,00 ^{Aa}	98,10 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}
5	99,03 ^{Aab}	84,52 ^{Ab}	99,70 ^{Aa}
1	39,47 ^{Ba}	45,44 ^{Ba}	51,60 ^{Ba}
0,2	8,97 ^{BCa}	4,39 ^{Cab}	2,58 ^{Cb}
0,04	5,31 ^{Ca}	3,35 ^{Ca}	3,33 ^{Ca}
Tween 80 (3%)	4,25 ^C	4,25 ^C	4,25 ^C
Thiabendazole (0.1µg mL ⁻¹)	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A

Capital letters compare means among values in the rows (extract and fractions), small letters compare means among in the column (different concentrations), ($p < 0.05$).

4. Discussão

The extracts MeOH/H₂O, EtOAc and both acetogenins had similar results in the inhibition of egg hatching of *H. contortus*. The aqueous extract did not show relevant activity. The hot aqueous extract of the bark of *A. senegalensis* presented low efficacy in the *H. contortus* egg hatch inhibition test (Alawa *et al.*, 2003). Probably these results are due to the low solubility of acetogenins in water.

The anthelmintic effects obtained with ethyl acetate extract are lower than synthetic anthelmintics nevertheless are important when compared with other plant extracts. Assis *et al.*, (2003) reported the inhibition of egg hatching of *H. contortus* with ethyl acetate extract of *Spigellia anthelima* of 20% in 12.5 mg mL⁻¹ and to 5 mg mL⁻¹ concentration the EtOAc extract of *A. squamosa* showed 99% egg hatch inhibition.

PADJAMA *et al.*, (1993) tested the effect of eight acetogenins, isolated from *Uvaria hookeri* e *Uvaria narum*, against *H. contortus* adult specimens observing the negative relationship between the death time in minutes and acetogenins concentration. These acetogenins had chemical structure similar to Squamosin and Isosquamosin.

In conclusion this study confirms the anthelmintic activity of plants of the Annonaceae family, of the *Annona squamosa* and mainly the acetogenins as important natural compounds to be used in *H. contortus* control. Toxicological tests are needed to assure their use.

Acknowledgements

To the agency of the Ceará state government, FUNCAP (PROC 147/00), PRODETAB/MAA () for financing the study, and to PADETEC (Ceará State Department of Technology and Development Park), for analysis of the extracts.

References

- ALAWA, C.B.I.; A.M. Adamu; J.O.Gefu; O.J.Ajanusi; P.A.Abdu; N.P.Chiezey; J.N.Alawa; D.D Bowman. *Veterinary parasitology*, 2003;., 113: 73-81.
- ASSIS, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, L.S.; COSTA, C.T.C.; SOUZA, J.A.L. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigellia anthelmia* Linn extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, 2003; 117:43-49.
- AROSEMENA, N.A.E.; BEVILAQUA, C.M.L.; MELO, A.C.F.L.; GIRÃO, M.D. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. **Revue Médecine Vétérinaire**, 1999; 150: 873-876.
- CAMPELLO; C.C. Proteínas antinutricionais e ou tóxicas de genótipos de soja [*Glycine max merr*] e sua correlação com a performance nutricional de frangos de corte. **Tese de doutorado**-Universidade Federal do Ceará, 2003, 179.
- COLES, G.C., BAUER, F.H.M., BORGSTEEDE, S., GREERTS, S., KLEI, M.A., AND TAYLOR, WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, 1992; 44: 35-44.
- DURET, P.; HOCQMULLER, R.; CAVÉ, Bulladecin and Atemotetro, two bis-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona atemoya* seeds.**Phytochemistry**, 1998;.,48. 499-506.
- GALLARDO, T. *et al.* Acetogenins from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry**, v. 47, p .811-816, 1998.
- HERD, P. R. Equine parasite control keeping up with evolution. **Veterinary Medicine**, 1995;90: 447-480.
- HUBERT J., AND KERBOEUF, D. A new method for culture of larve used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongilosis: comparation with fecal cultures. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, 1984; 48:63-71.
- MENEZES, R. C. A. A. *et al.* Estudos preliminares *in vitro* da atividade ovicida de folhas de sementes de quatro leguminosas sobre *Haemonchus contortus* de caprinos. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 1992;15: 121-127.
- NONFON, Maria et al. Four Annonis From *Annona Squamosa*. **Phytochemistry**,v. 29,p.1951-1954, 1990.
- PADMAJA,V.; THANKAMANY, V.; HISHAM,A. Antibacterial, antifungal and anthelmintic activities of root barks of *Uvaria hookeri* and *Uvaria narum*. **Journal of ethnopharmacology**, 1993; 40:181-186.
- PINHEIRO, R.R; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**,2000:52.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**. 1ª ed. Belo Horizonte. 1998.
- WALLER, P. J.; DASH, K. M.; BARGER, I. A.; LE JAMBRE, L. F.; PLANT, J. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep:learning from the Australian experience. **Veterinary. Reaserch**, 1995;136: 411-413.

ANEXO III

ARTIGO II

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA *ANNONA*
SQUAMOSA EM CAMUNDONGOS

Artigo submetido a revista: Ciência Animal

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA *ANNONA SQUAMOSA* EM CAMUNDONGOS .

Marta Maria Caetano de Souza¹, Ana Karine Melo Leite², Cícero Temístocles Coutinho da Costa¹, Ana Raquel Araújo da Silva³, Claudia Maria Leal Bevilaqua¹, Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro², Selene Maia de Moraes³, Cláudio Cabral⁴.

Pós- Graduação em Ciências Veterinárias / Universidade Estadual do Ceará

RESUMO

Annona squamosa é conhecida na medicina popular por sua ampla variedade de efeitos medicinais. No entanto, pouco se conhece sobre suas propriedades tóxicas. O presente trabalho objetiva avaliar a toxicidade aguda do extrato acetato de etila de *A. squamosa* (EACAS). Foram utilizados camundongos Swiss divididos em grupos (n=10) que receberam o EACAS por via intraperitoneal em doses que variaram de 0,75 a 15 mg kg⁻¹ e por via oral em doses que variaram de 200 a 1000 mg kg⁻¹. O extrato foi administrado em dose única e as **variáveis** comportamentais e fisiológicas de cada animal foram observados diariamente durante 6 dias consecutivos. No 7º dia, o número de sobreviventes foi determinado **calculando-se a DL₅₀**. O EACAS, por via intraperitoneal mostrou-se tóxico nas doses acima de 0,75 mg/kg, apresentando DL₅₀ de 3,34 mg/kg. Na administração por via oral o extrato foi letal em doses acima de 200 mg/kg, apresentando DL₅₀ de 433 mg/kg. Os principais sintomas observados nos animais que receberam o EAC foram dispnéia, espasmos musculares e hipoatividade. Estudos posteriores são necessários para avaliar in vivo a atividade anti-helmíntica e os efeitos tóxicos do EACAS.

Palavras-chave: *Annona squamosa*, **fruta-do-conde**, Toxicidade, camundongos, extrato acetato de etila.

ABSTRACT

Annona squamosa is know in folk medicine for large variety of medicinal effects. However, there are few knowledge about toxics property. Therefore the aim this work was

to evaluate the acute toxicity of *A. squamosa* and to identify the substance present in ethyl acetate extract (EAE). Were utilized mice swiss, in groups (n=10) that received 0,2 mL intraperitoneally and orally, of EAE in different concentrations. The extract was administrated in single dose and the parameters behavioural and physiologic of each animal were looked daily during five consecutive days. In 7^o day, the number of survivors was determined and the toxic effects were obtained as LD₅₀. The EAE by intraperitoneal route showed toxic at doses study, except at dose of 0,75mg/kg, when had LD₅₀ of 3,34 mg/kg. The EAE by oral route, was lethal at tested doses, except at dose 200mg/kg, when had LD₅₀ of 433 mg/kg. The EAE is toxic when administrated by route i.p., in low doses and by oral route is lethal in doses above 200mg/kg. Therefore other studies are needed to evaluate the toxic effects *in vivo* this plant.

Key words: Toxicity, *Annona squamosa*, ethyl acetate extract, mice.

INTRODUÇÃO

Annona squamosa é uma arborícola popularmente conhecida no Brasil como fruta-do-conde, ata ou pinha, pertence a família Annonaceae a qual contém cerca de 100 espécies catalogadas, dentre elas a *Annona cherimoya* (*Annona cherimola* Mill), a híbrida *A. atemoya* (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) e a *Annona muricata* Linn (RASAI, 1995). As annonaceas são amplamente estudadas por possuírem substâncias biologicamente ativas, as acetogeninas (ALLALI et al., 1999) que apresentam uma variedade de efeitos medicinais. Estas vêm sendo extraídas de várias partes da planta incluindo folhas, cascas, raízes e sementes. Estudos recentes tem demonstrado que as acetogeninas encontradas nas sementes de *A. squamosa* exibem atividades citotóxica, imunossupressiva, contra malária (MORITA, 2000) e parasiticida (CHAO-MING,1997). CAETANO (2003) avaliando a ação do extrato acetato de etila obtido de sementes de *A. squamosa* sobre *Haemonchus contortus*, parasito altamente patogênico de ovinos e caprinos, demonstrou inibição de 100% sobre a eclosão de ovos *in vitro*. No entanto, apesar dos estudos realizados por DURET et al. (1999) terem demonstrado considerável efeito anti-tumoral das acetogeninas *in vitro*, testes *in vivo* mostraram elevada toxicidade em camundongos. Embora estes efeitos tóxicos já tenham sido observados, ainda são poucos os relatos encontrados sobre a toxicidade *in vivo* de extratos obtidos dessas plantas, especificamente de *A. squamosa*. Com os promissores resultados obtidos por CAETANO (2003) tornam-se necessário testes *in vivo* com esta espécie de annonacea em camundongos afim de viabilizar o uso em animais de produção. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda do extrato acetato de etila de *A. squamosa* em camundongos e determinar a DL₅₀, que servirá como referência para posteriores estudos em ovinos e caprinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das sementes de A. squamosa

As sementes de *A. squamosa* foram obtidas, por extração manual, a partir dos frutos maduros comercializados no município de Fortaleza, Ceará, situado no nordeste do Brasil, entre os meses de abril e junho de 2001. A exsicata foi identificada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, depositada com Voucher 31710.

Obtenção do extrato acetato de etila de A. squamosa

Dois quilos de sementes de *A. squamosa* foram trituradas até a obtenção de pó. O pó foi misturado a uma solução de metanol a 10%, na qual ficou totalmente submerso por sete dias. Posteriormente este material foi filtrado, obtendo-se assim uma solução **metanol/água**. A seguir, esta solução passou por um processo de evaporação, em um evaporador rotatório, por quatro dias, a uma temperatura de aproximadamente **64°C**, passando posteriormente por lavagens sucessivas com o solvente acetato de etila. Este procedimento foi realizado quatro vezes, utilizando-se um funil de separação, de onde se obteve duas soluções: a solução aquosa e a solução de acetato de etila. À solução de acetato de etila foi acrescida de sulfato de sódio anidro, em quantidades suficientes para retirar o excesso de água. Posteriormente a solução foi filtrada, retirando assim o sulfato de sódio, e em seguida foi levada ao banho-maria, a 100°C, em tempo necessário para obtenção do extrato acetato de etila sob forma pastosa, obtendo-se desta forma, o extrato acetato de etila. A solução aquosa foi levada ao banho-maria, em tempo necessário para posterior obtenção do extrato aquoso sob forma pastosa.

Análise Fitoquímica do extrato acetato de etila de Annona squamosa

O extrato acetato de etila (150mg) foi misturado com 30mL de uma solução hidrofílica (etanol com 30% de água). A solução hidrofílica inicial foi dividida em 7 tubos, aos quais foram adicionados reagentes específicos para detecção de diferentes compostos baseando-se na coloração final da solução. A pesquisa de compostos foi realizada para fenóis, taninos, flavonas e flavonóides, alcalóides e triterpenos (MATTOS, 1997).

Teste de Toxicidade aguda com EACAS

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, de ambos os sexos, entre 6 e 10 semanas de idade, pesando de 25 a 30g, oriundos de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições adequadas de luz e temperatura, recebendo ração **comercial FRI-RIBE®** e água à vontade.

Administrou-se o EACAS por via oral e intraperitoneal (i.p.) através de sonda oro-gástrica em doses de: 200, 300, 400, 500, 750 e 1000 mg kg⁻¹ e por via i.p. em doses de: 0,75, 3, 7, 9 e 15 mg kg⁻¹. Os animais receberam Tween 80 e salina por ambas as vias e os controles bem como os animais tratados receberam o EACAS em dose única e foram observados diariamente por seis dias, avaliando-se as **variáveis** comportamentais, tais como irritabilidade, deambulação, pêlos eriçados, espasmos musculares e hipoatividade, e ainda variáveis fisiológicas, tais como dispnéia e taquicardia. Antes do início do tratamento realizou-se em todos os animais, coletas de sangue pelo **plexo retro-orbital**, para contagem total de leucócitos (CTL) e hematócrito (Ht) e avaliação dos níveis de uréia, creatinina, Asparto amino transferase (AST) e Alanina amino transferase (ALT). Os valores de AST e ALT foram expressos pelo valor médio dos grupos antes e depois do tratamento. Sete dias após a administração do EACAS, os animais sobreviventes foram pesados, submetidos a nova coleta de sangue para verificar os mesmos parâmetros já mencionados e sacrificados, para retirada e pesagem do fígado, baço e rins. O efeito tóxico agudo foi interpretado com base na mortalidade dos animais.

Em um segundo protocolo outros animais foram divididos em grupos (n=10) e pesados, recebendo o EACAS em dose única de 200 e 400 mg kg⁻¹ por via oral e em dose única de 5 e 0,75 mg kg⁻¹ por via i.p. Após 24 horas, o número de animais vivos e mortos foi determinado. Os animais vivos foram pesados, submetidos a coleta de sangue, pelo **plexo retro-orbital**, para fazer a CTL, Ht, níveis de uréia, creatinina, AST e ALT e foram sacrificados para a pesagem de fígado, baço e rins.

3. Análise Estatística

A DL_{50} do teste de toxicidade foi calculada pelo programa EXCEL 2000, a partir da equação que representasse a linha de tendência com coeficiente de determinação mínimo de 70% (CAMPELLO, 2003).

Os valores de Ht e peso dos órgãos foram transformados em arco sen de acordo com a estatística aplicada para valores percentuais (SAMPAIO, 1998). Para o peso dos órgãos calculou-se o peso relativo (g/100g). Para a comparação dos pesos dos animais, Ht, CTL, antes e após tratamento e peso dos órgãos foi utilizado o programa STAT VIEW, teste T Student a um nível de significância de 5%. Os níveis de uréia, creatinina, AST e ALT, **valores que apresentam maior índice de variação**, foram expressos em média \pm erro padrão e as demais variáveis analisadas foram expressos em média \pm desvio padrão.

RESULTADOS

Análise Fitoquímica

A análise fitoquímica do extrato acetato de etila revelou a presença de fenóis, taninos catéquicos, flavonóides, triterpenos pentacíclicos livres e alcalóides.

Teste de Toxicidade aguda

Os animais que receberam EACAS por via intraperitoneal nas doses de 15 e 9mg/kg apresentaram sintomas de dispnéia e espasmos musculares seguidos de morte em menos de 24 horas. Nas demais doses os animais apresentaram dispnéia, no entanto a dose de 0,75mg/kg não provocou alterações comportamentais aparentes e não foi letal. Os animais que receberam o EACAS, por via oral, nas doses acima de 300mg/kg apresentaram também dispnéia seguido de morte. Entretanto o EACAS na concentração de 200mg/kg não foi letal e nem provocou alterações comportamentais aparentes (tabela 1).

O EACAS por via i.p, não alterou o peso dos animais após 7 dias, mas o fez na dose de 5 mg/kg após 24 horas (tabela 2). Não houve diferença significativa no peso dos órgãos dos animais após 24 horas e 7dias. Com relação a CTL e o Ht não houve diferença estatística do controle após 24 horas e nem após 7 dias. Os níveis de AST e ALT, uréia e creatinina, após 24 horas e 7 dias, não diferiram significativamente do controle .

O EACAS por via oral não alterou o peso dos animais (tabela 3). O peso dos órgãos não diferiu significativamente do controle após 7 dias, no entanto o peso do fígado na dose de 400mg/kg, aumentou significativamente após 24 horas (tabela 4 e 5). O EACAS após 7dias, na dose de 750mg/kg, reduziu significativamente o Ht, porém a CTL permaneceu, em todas as doses, dentro dos limites normais (tabela 6). O EAC não alterou o Ht e nem o CTL após 24 horas da administração. As variáveis bioquímicas não diferiram significativamente do controle.

Tabela 1. Toxicidade aguda do extrato acetato de etila de *Annona squamosa*

Via	Dose mg/kg	Mortos/total	Efeitos
Oral	1000	10/10	D,M+,T
	750	5/10	D,M+,T
	500	6/10	D,H
	400	5/10	D,H
	300	2/10	D,H
	200	0/10	S
Intraperitoneal	15	10/10	D, E,M+
	9	9/10	D,M+,T
	7	5/10	D,H
	3	7/10	D,H
	0,75	0/10	S

S-sem sintomas, D-dispnéia, E-espasmos, M+-morte em 30minutos, H-hipoatividade, T-tremor.

Tabela 2. Efeito do extrato acetato de etila de *Annona squamosa* sobre o peso corporal de camundongos, após 24 horas e 7 dias da administração por via intraperitoneal.

Tratamento	Após 24 horas		Após 7 dias	
	Dia 0	24 horas	Dia 0	Dia 7
Salina	24,09 ± 4,23 ^{Aa}	23,76 ± 2,99 ^{Aa}	25,67 ± 3,35 ^{Cc}	26,02 ± 3,48 ^{Ccd}
Tween 80	24,93 ± 1,68 ^{Aa}	24,50 ± 2,72 ^{Aa}	27,84 ± 1,72 ^{Cc}	28,70 ± 1,53 ^{Ccd}
7 mg/kg	—	—	28,18 ± 3,76 ^{Cc}	29,84 ± 4,72 ^{Cd}
5 mg/kg	28,91 ± 2,11 ^{Aa}	33,62 ± 0,39 ^{Bb}	—	—
3 mg/kg	—	—	26,40 ± 1,19 ^{Cc}	24,15 ± 1,45 ^{Cc}
0,75 mg/kg	26,11 ± 2,48 ^{Aa}	27,45 ± 2,64 ^{Aa}	27,31 ± 1,28 ^{Cc}	25,54 ± 2,65 ^{Ccd}

A e B comparam valores na linha do grupo avaliado após 24h, a e b comparam valores na coluna do grupo avaliado após 24h, C e D comparam valores na linha do grupo avaliado após 7 dias, c e d comparam valores na coluna do grupo avaliado após 7 dias, $p < 0,05$; (valores expressos em média ± desvio padrão)

Tabela 3. Efeito do extrato acetato de etila de *Annona squamosa* sobre o peso corporal de camundongos, após 24 horas e 7 dias da administração por via oral.

Tratamento	Após 24h		Após 7 dias	
	T0	24 horas	T0	T7
Salina	25,32 ± 0,70 ^{Aa}	26,38 ± 0,88 ^{Aa}	25,12 ± 0,88 ^{Aa}	27,46 ± 0,29 ^{Aa}
Tween 80	25,44 ± 0,75 ^{Aa}	26,19 ± 0,55 ^{Aa}	26,36 ± 2,16 ^{Aa}	27,90 ± 3,13 ^{Aa}
200 mg/kg	29,88 ± 4,24 ^{Aa}	31,13 ± 5,48 ^{Aa}	30,99 ± 3,01 ^{Aa}	28,89 ± 2,74 ^{Aa}
300 mg/kg	—	—	33,03 ± 2,28 ^{Aa}	31,72 ± 1,25 ^{Aa}
400 mg/kg	27,31 ± 2,05 ^{Aa}	29,55 ± 3,15 ^{Aa}	27,30 ± 2,60 ^{Aa}	29,65 ± 4,02 ^{Aa}
500 mg/kg	—	—	29,67 ± 2,67 ^{Aa}	31,64 ± 2,59 ^{Aa}
750 mg/kg	—	—	24,78 ± 9,10 ^{Aa}	29,46 ± 5,52 ^{Aa}

Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$. (valores expressos em média ± desvio padrão).

Tabela 4. Efeito do extrato acetato de etila de *Annona squamosa* sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos, 7 dias após administração por via oral.

Tratamento	Fígado	Rim D	Rim E	Baço
Salina	4,45 ± 0,86 ^a	0,81 ± 0,07 ^a	0,75 ± 0,09 ^a	0,48 ± 0,5 ^{ab}
Tween 80	5,17 ± 1,03 ^a	0,77 ± 0,65 ^a	0,80 ± 0,09 ^a	0,56 ± 0,26 ^a
200 mg/kg	4,69 ± 0,85 ^a	0,92 ± 0,17 ^a	0,85 ± 0,30 ^a	0,52 ± 0,27 ^{ab}
300 mg/kg	4,93 ± 0,69 ^a	0,63 ± 0,07 ^a	0,64 ± 0,05 ^a	0,31 ± 0,05 ^a
400 mg/kg	5,66 ± 1,23 ^a	0,94 ± 0,33 ^a	0,92 ± 0,28 ^a	0,85 ± 0,37 ^b
500 mg/kg	5,12 ± 0,79 ^a	0,93 ± 0,24 ^a	0,96 ± 0,24 ^a	0,29 ± 0,69 ^a
750 mg/kg	5,00 ± 0,53 ^a	0,86 ± 0,13 ^a	0,87 ± 0,12 ^a	0,51 ± 0,25 ^{ab}

Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$. (valores expressos em média ± desvio padrão).

Tabela 5. Efeito do extrato acetato de etila de *Annona squamosa* sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos, 24 horas após administração por via oral.

Tratamento	Fígado	Rim D	Rim E	Baço
Salina	4,77 ± 0,53 ^a	0,71 ± 0,81 ^a	0,72 ± 0,67 ^a	0,60 ± 0,15 ^b
Tween 80	4,16 ± 0,50 ^a	0,63 ± 0,09 ^a	0,64 ± 0,09 ^a	0,48 ± 0,24 ^{ab}
200 mg/kg	5,10 ± 1,15 ^{ab}	0,68 ± 0,55 ^a	0,67 ± 0,69 ^a	0,36 ± 0,12 ^a
400 mg/kg	6,12 ± 0,94 ^b	0,73 ± 0,13 ^a	0,75 ± 0,15 ^a	0,30 ± 0,76 ^a

Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$. (valores expressos em média ± desvio padrão).

Tabela 6. Variável hematológica de camundongos tratados com extrato acetato de etila de *Annona squamosa*, 7 dias após administração por via oral.

Variáveis	Ht (%)		CTL	
	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia7
Tratamento				
Salina	51,6 ± 2,608 ^{Aab}	47,8 ± 2,95 ^{Aa}	5960 ± 2124 ^{Aa}	5020 ± 882 ^{Aa}
Tween 80	52,8 ± 7,79 ^{Aab}	44,2 ± 6,38 ^{Aa}	5720 ± 2170 ^{Aa}	5490 ± 2081 ^{Aa}
200 mg/kg	45,9 ± 7,82 ^{Aab}	46,2 ± 5,95 ^{Aa}	2959 ± 1908 ^{Aa}	4630 ± 3487 ^{Aa}
300 mg/kg	56,3 ± 6,03^{Aa}	58,3 ± 4,50 ^{Aa}	4083 ± 2012 ^{Aa}	3583 ± 1353 ^{Aa}
400 mg/kg	44,2 ± 5,21 ^{Aab}	44,0 ± 4,58 ^{Aa}	5120 ± 2198 ^{Aa}	6070 ± 2553 ^{Aa}
500 mg/kg	40,3 ± 16,6^{Ab}	44,3 ± 4,04 ^{Aa}	3075 ± 1668 ^{Aa}	2900 ± 813 ^{Aa}
750 mg/kg	46,8 ± 0,45 ^{Aab}	25,0 ± 9,79^{Bb}	2830 ± 840 ^{Aa}	4320 ± 1604 ^{Aa}

Letras minúsculas comparam valores na coluna e letras maiúsculas comparam valores na linha. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$. (valores expressos em média ± desvio padrão)

DISCUSSÃO

O EACAS por via i.p. não alterou significativamente o peso dos animais, mostrando que o mesmo não afetou a ingestão da ração nem a absorção alimentar. O peso dos órgãos não diferiu do controle, demonstrando que o extrato não causou alteração nos mesmos, o que foi comprovado pelos níveis normais de uréia, creatinina, AST e ALT e as enzimas hepáticas, AST e ALT são parâmetros para avaliar a função hepática. A AST está presente em altas concentrações em vários tecidos, como coração, pulmão, rins, baço e outros e a ALT por estar mais restrita ao citossol de hepatócitos é mais sensível para indicar lesão hepatocelular, sendo o grau de aumento dos níveis da ALT correlacionado ao grau de injúria ao órgão.

O extrato após 24 horas causou, na dose de 5mg/kg, aumento significativo no peso dos animais, porém é provável que este efeito não tenha sido causado pela administração do extrato, mas pela diferença do consumo individual de ração, uma vez que não tem relatos de que o EACAS promova aumento do consumo alimentar.

O EACAS não alterou o peso dos órgãos após 7 dias, porém após 24 horas, na dose de 400 mg kg⁻¹, aumentou o peso do fígado. No entanto os níveis normais de AST e ALT indicaram que não houve injúria hepática, uma vez que efeitos tóxicos no fígado podem ser identificados pelos elevados níveis de transaminases (SHANKER et al, 2002) e os níveis normais dessas enzimas descartam a presença de uma lesão hepática aguda (RODRIGUES, 1998).

No que diz respeito à administração por via oral não se tem encontrado relatos da toxicidade de *A. squamosa*, porém verificou-se que por esta via o extrato possui uma maior margem de segurança quando comparado a via i.p. A administração por via oral de uma determinada substância é menos tóxica do que a sua administração por via i.p, uma vez que por via oral pode ocorrer uma pobre absorção da substância ou ainda esta ser detoxificada através da passagem pelo fígado, enquanto que por via i.p. ocorre a absorção sistêmica e desta forma os efeitos tóxicos mostram-se mais intensos e mais precoces (LOOMIS, 1996).

Os efeitos tóxicos observados após a administração do EACAS podem estar relacionados à presença de substâncias tóxicas e dentre elas as acetogeninas. As acetogeninas são substâncias presentes em plantas da família Annonaceae derivadas de ácidos graxos de cadeia longa (HOPP, 1998; WANG, 2002).

A acetogenina Rolliniastatin-1 isolada da *A. atemoya* por DURET *et al.* (1999) foi utilizada para testes de toxicidade aguda em camundongos, mostrando-se letal quando administrada por via intraperitoneal na dose de 5mg kg⁻¹ e em doses acima desta. Os resultados obtidos. no presente trabalho mostraram que o EACAS por via i.p foi letal em baixas doses, estando de acordo com os resultados de DURET *et al* (1999).

Estudos com relação aos sintomas observados em animais inoculados com EACAS não tem sido ainda relatados. Porém o mecanismo de ação das acetogeninas, pode está relacionado a alguns dos sintomas observados, uma vez que estas inibem o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, impedindo o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons e a produção de ATP para as células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLALI, F. Q.; LIU, X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins : Recent Progress. **Journal of Natural Product**, v.62, p. 504-540, 1999.
- CAETANO, M. M. S. Avaliação da atividade ovicida de *Annona squamosa* Linnaeus sobre *Hameonchus contortus* Rudolphi e toxicidade em camundongos. Dissertação de Mestrado, 100 p, Universidade Estadual do Ceará, 2004.
- CAMPELLO; C.C. Proteínas antinutricionais e ou tóxicas de genótipos de soja [*Glycine max merr*] e sua correlação com a performance nutricional de frangos de corte. **Tese de doutorado**-Universidade Federal do Ceará, 2003, 179.
- CHAO-MING, Li et al. Cyclopeptide from the seedes of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 521-523, 1997.
- DURET, P; HOCQUEMILLER, R.; GANTIER J-C.; FIGADÈRE, B. Semisynthesis and citotoxicity of amino acetogenins and derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1821-1826, 1999.
- HOOP, D.C.; ALALI, F.Q.; GU, Z.; McLAUGHLIN, J.L. Three new bioactive bis-adjacente THF-ring acetogenins from the bark of *Annona squamosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 569-575, 1998.
- LOOMIS, T.A.; HAYES, A.W . Loomis's Essentials of Toxicology. 4^aed. San Diego. 1996.
- MATTOS, S.G.A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Edições UFC. 2^aed. Fortaleza-Ceará, 1997.
- MORITA, H.; SATO, Y.; CHAN. K-L.; CHOO, C-Y.; ITOKAWA H.; TAKEYA, K. KOBAYASHI, J. Samoquasine A, a benzoquinazoline alkaloid from the seeds of *Annona squamosa*. **Journal Natural Products**, v.63, p.1707-1708, 2000.
- RASAI, S; GEORGE, A.P.; KANTHARAJAH, A.S. Tissue culture of *Annona* spp.(cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): A review. **Scientia Horticulturae**, v.62, p.1-14, 1995.
- RODRIGUES, E.R.; PEDRAZZI, A.H.P.; BASTOS, J.K. Acute preclinical toxicity study of *Zanthoxylum naranjillo* extract. **Phytotherapy Research**, v.12, p. 512-516, 1998.
- SAMPAIO, I. B. M. Estatística Aplicada a Experimentação Animal. 1^a ed. Belo Horizonte, 1998.
- SHANKER, N.K.R..P.; TRIVEDI, V.P.; CHANSURIA, J.P.N.; PANDEY, V.B. An evaluation of toxicity of *Taxus baccata* Linn. (Talispatra) in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 69-73, 2002.

WANG, Li-Quan *et al.* Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, p.561-565, 2002.