

ESTUDO COMPARATIVO DOS PERFIS FITOQUÍMICOS E CITOTÓXICOS DO EXTRATO ALCOÓLICO DE FOLHAS DE GRAVIOLA (*Annona muricata*) E FRUTA DO CONDE (*Annona squamosa*)

COMPARATIVE STUDY OF THE PHYTOCHEMICAL AND CYTOTOXIC PROFILES OF THE ALCOHOLIC EXTRACT OF SOURSOP (*Annona muricata*) AND CUSTARD APPLE (*Annona squamosa*) LEAVES

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS PERFILES FITOQUÍMICOS Y CITOTÓXICOS DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE GUANÁBANA (*Annona muricata*) Y DEL CONDE (*Annona squamosa*)

Luana Tiemy Takano Tannura*, Ana Carla Sonoda Matsubara*, Rhais Babetto Pastana*, Maria Laura Nascimento Ribeiro*, Amanda Tanaka Iasbeck Gonçalves*, Luana Agostino Pellarin*, Ariane Harumi Yoshikawa**, Melina Mizusaki Iyomasa Pilon***, Lucas Possebon****, Ana Paula Girol*****

Resumo

Introdução: As plantas apresentam potencial medicinal devido aos metabólitos secundários e possuem compostos com alto potencial anti-inflamatório, com possibilidades terapêuticas. Das espécies vegetais de interesse destacamos e comparamos a graviola (*Annona muricata*) e a fruta do conde (*Annona squamosa*). **Objetivo:** Comparar o potencial do extrato alcoólico bruto de folhas da graviola e fruta do conde em ensaios fitoquímicos e citotóxicos. **Método:** Os extratos de folhas de graviola e fruta do conde foram obtidos por percolação, com o uso de 20g de folhas secas e trituradas com 100 ml de álcool de cereais. Na padronização dos extratos foram utilizadas análises de identificação de componentes químicos, os taninos, flavonoides, saponinas e alcaloides, por meio de diferentes reações químicas e os antioxidantes foram analisados pela atividade do DPPH. A citotoxicidade das diferentes concentrações dos extratos também foram analisadas por hemólise e pelo teste da membrana corioalantide (CAM). **Resultados:** As análises fitoquímicas indicaram a presença de alcaloides, taninos, flavonoides e saponinas para ambos os extratos com alta capacidade antioxidante. Os testes de hemólise e CAM mostraram ausência de citotoxicidade na concentração de 2% e 4% para ambos os extratos e elevada citotoxicidade em 10% para o extrato de graviola. **Conclusão:** O extrato alcoólico das folhas da graviola e fruta do conde mostraram importante perfil antioxidante e com compostos anti-inflamatórios com pouca diferença entre os extratos o que estimula estudos futuros e continuidade para exploração anti-inflamatória.

Palavras-chave: Fitoterápicos. Annonas. Extratos brutos.

Abstract

Introduction: Plants have medicinal potential due to secondary metabolites and have compounds with high anti-inflammatory potential, with therapeutic possibilities. Of the plant species of interest we highlight and compare the graviola (*Annona Muricata*) and the fruit of the count (*Annona squamosa*). **Objective:** To compare the potential of crude alcoholic extract of soursop and conde fruit leaves in phytochemical and cytotoxic assays. **Method:** The leaves extracts of soursop and fruit of the count were obtained by percolation, with the use of 20g of dry leaves and crushed with 100 ml of grain alcohol. In the standardization of the extracts were used identification analyzes of chemical components, tannins, flavonoids, saponins and alkaloids, through different chemical reactions and antioxidants were analyzed by the activity of DPPH. The cytotoxicity of the different concentrations of the extracts were also analyzed by hemolysis and by the corioalantide membrane test (CAM). **Results:** Phytochemical analysis indicated the presence of alkaloids, tannins, flavonoids and saponins for both extracts with high antioxidant capacity. The hemolysis and CAM tests showed absence of cytotoxicity at the concentration of 2% and 4% for both extracts and high cytotoxicity in 10% for graviola extract. **Conclusion:** The alcoholic extract of the leaves of soursop and fruit of the count showed important antioxidant profile and with anti-inflammatory compounds with little difference between the extracts which stimulates future studies and continuity for anti-inflammatory exploration.

Keywords: Herbal medicines. Annonas. Extracts.

*Acadêmicos do curso de Medicina do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil.

**Biomédica pelo curso de Biomedicina do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil. Graduanda do curso de Farmácia da UNIFIPA.

***Bióloga e especialista em Biotecnologia pelo Centro Universitário Barão de Mauá. Técnica do Laboratório de Pesquisa Multidisciplinar e Laboratórios de Aulas Práticas do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil.

****Biólogo, mestre pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biociências da UNESP/IBILCE "Júlio de Mesquita Filho" de São José do Rio Preto-SP. Doutorado programa da UNESP/IBILCE. Pós-graduação *Lato sensu* em Biologia Molecular e Genética em Ciências da Saúde pela Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão de Serviços à Comunidade da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAEPE/FAMERP). Docente nas disciplinas de Biologia Celular e Histologia nos cursos de Medicina, Engenharia Agrônoma, Biomedicina e Farmácia do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil.

*****Bióloga, mestre em Morfologia pela UNIFESP, doutora em Genética, área de concentração Biologia Celular e Molecular e pós-doutora em Imunomorfologia pela UNESP de São José do Rio Preto-SP. Docente das disciplinas de Biologia Celular, Histologia e Embriologia do curso de Medicina do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil, e docente da Pós-Graduação em Genética, UNESP de São José do Rio Preto-SP e da Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional, UNIFESP, São Paulo-SP. Pró-Reitora de Pesquisas e Pós-Graduação da UNIFIPA. Contato: anapaula.girol@unifipa.com.br

Resumen

Introducción: Las plantas tienen potencial medicinal debido a los metabolitos secundarios y poseen compuestos con alto potencial antiinflamatorio, además de ser utilizadas en tratamientos terapéuticos. De las especies vegetales de interés, destacamos y comparamos la guanábana (*Annona muricata*) y la fruta del conde (*Annona squamosa*). **Objetivo:** Comparar el potencial del extracto alcohólico crudo de hojas de guanábana y chirimoya en ensayos fitoquímicos y citotóxicos. **Método:** El extracto de hojas de guanábana y fruta del conde se obtuvo por percolación, utilizando 20g de hojas secas y trituradas con 100 ml de alcohol de grano. En la estandarización de los extractos se utilizaron análisis para identificar componentes químicos, taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides, a través de diferentes reacciones químicas y los antioxidantes fueron analizados por la actividad de DPPH. También se analizó la citotoxicidad de diferentes concentraciones de extractos por hemólisis y por la prueba de membrana de corioalantida (CAM). **Resultados:** Los análisis fitoquímicos indicaron la presencia de alcaloides, taninos y flavonoides y saponinas para ambos extractos con alta capacidad antioxidante. Las pruebas de hemólisis y CAM mostraron ausencia de citotoxicidad a una concentración del 4% y alta citotoxicidad a partir del 10% también para ambos extractos. **Conclusión:** El extracto alcohólico de hojas de guanábana y chirimoya mostró importantes perfiles antioxidantes y con compuestos antiinflamatorios, lo que estimula futuros estudios y continuidad para la exploración antiinflamatoria.

Palabras clave: Medicamentos a base de plantas. Annonas. Extractos crudos.

INTRODUÇÃO

Segundo a pesquisa da Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% das populações que vivem nos países em desenvolvimento dependem quase exclusivamente da medicina tradicional para as suas necessidades de atenção primária à saúde¹. Nesse contexto, a exploração dos constituintes químicos das plantas e a triagem farmacológica podem fornecer a base para o desenho de novos medicamentos e possíveis metas para análises científicas². Sendo assim, a triagem de plantas com potencial medicinal, sua eficácia e segurança é de extrema importância.

Um dos gêneros de interesse nacional e internacional é a *Annona*, uma planta medicinal com frutas comestíveis, conhecida no Brasil como fruta do conde, e a graviola. Estas plantas pertencem a Família *Annonaceae* e têm sido usadas como medicamentos tradicionais devido suas capacidades antioxidante, antidiabética, hepatoprotetora e antitumoral³.

As espécies *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* são plantas perenes e frutíferas localizadas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo endêmicas no Brasil, com uma longa história de usos tradicionais⁴⁻⁶. Todas as partes das árvores de *A. muricata* e *A. squamosa* são amplamente utilizadas como medicamentos tradicionais e estudos evidenciaram a atuação do extrato de ambas as plantas com grande potencial antioxidante, anti-inflamatório e também antitumoral, de acordo com os bioativos já identificados por análises fitoquímicas⁵⁻⁷. Os benefícios à saúde promovidos pelas *A. muricata*, e *A. squamosa* são

atribuídos a uma considerável diversidade de fitoquímicos. Esses bioativos incluem compostos a base de fenol, como proantocianidinas, alcaloides e flavonoides⁵⁻⁷.

Os principais componentes bioativos que foram extraídos de várias partes de *A. muricata* e *A. squamosa* são conhecidos como acetogeninas anonáceas. Estes são derivados de ácidos graxos de cadeia longa (C32 ou C34) sintetizados pela via policetílica⁵⁻⁸. Muitos desses derivados são seletivamente tóxicos para células cancerígenas, incluindo linhagens de células cancerígenas multirresistentes⁶.

No entanto, há interesse em aprofundar ainda mais o conhecimento do perfil dos compostos dessas plantas, sendo importante o conjunto das informações sobre suas potencialidades, que permitam sua utilização medicinal de forma segura. Diante deste cenário, o seguinte estudo realizou a comparação fitoquímica dos extratos alcoólicos brutos de *A. squamosa* e *A. muricata*, bem como a avaliação de citotoxicidade como forma de contribuir para o estudo de suas possíveis propriedades farmacológicas.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção e padronização do extrato alcoólico

As folhas de *Annona muricata* e *Annona squamosa* (exsicatas depositadas no herbário IRINA DELANOVA GEMTCHUJNICOV (BOTU) número: 34716, graviola e número: 33512, fruta do conde) foram obtidas do Centro Universitário Padre Albino, de Catanduva-SP, Brasil, em março de 2019. Posteriormente, foram

lavadas e secas à sombra em temperatura ambiente, durante 15 dias, para sua completa dessecação.

Os extratos brutos foram obtidos por percolação com o uso de 20 g das folhas trituradas em 100 ml de álcool de cereais. Os extratos brutos permaneceram em recipientes fechados, sem interferência de luz externa, durante uma semana. Após esse período, foram filtrados pelo gotejamento por esgotamento 3 vezes no balão de filtração e realizadas as análises de padronização, por meio de diferentes reações para as análises de identificação de seus componentes fitoquímicos⁹. Após, os extratos brutos foram levados ao rotavapor para a retirada da fração alcoólica e, então, ressuspensos em água em diferentes concentrações para as análises de citotoxicidade.

Identificação de taninos totais e taninos específicos

A identificação de taninos totais foi realizada por meio das reações com Cloreto Férrico, Acetato de Chumbo e Acetato de Cobre. Para a reação com Cloreto Férrico (FeCl_3), em tubo de ensaio, foi colocado 1 ml da solução extrativa, 5 ml de água destilada e uma gota de Cloreto Férrico a 2%, escorrendo-o pela parede do tubo. Na reação com Acetato Neutro de Chumbo, em tubo de ensaio, foi diluído 1 ml da solução extrativa a uma proporção 1:5, na qual foram adicionadas 2 gotas de solução aquosa de Acetato Neutro de Chumbo a 10%. Finalmente, para a reação com Acetato de Cobre, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa diluída na proporção de 1:5 e 2 gotas de solução de Acetato de Cobre a 5%⁸.

Os taninos específicos foram identificados pelas reações com Acetato de chumbo e Ácido Acético Glacial, Reativo de Wasicky. Para a reação com Acetato de Chumbo e Ácido Acético Glacial, que identifica a presença de taninos gálicos, em tubo de ensaio, foram adicionados 3 ml da solução extrativa e 2 ml de Ácido Acético Glacial a 10% e 3 ml de Acetato de Chumbo a 10%. Enquanto que para a reação com o Reativo de Wasicky, foi utilizado o conteúdo do tubo com a reação com Acetato de Cobre, do qual foi descartado o precipitado da reação anterior por filtração e adicionado 0,5 ml de Polimetilaminobenzaldeído¹⁰.

Identificação de saponinas

As saponinas foram identificadas por meio da reação por agitação. Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 ml da solução extrativa, submetida a agitação por um minuto¹¹.

Identificação de flavonoides

A presença de flavonoides foi pesquisada por meio das reações com Cloreto Férrico e Hidróxido de Sódio. Para a reação com Cloreto Férrico, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa e 5 ml de água destilada, na proporção de 1:5. Em seguida, 1 ml dessa mistura foi descartado e, ao conteúdo restante, foi adicionada, pela parede do tubo, 1 gota de Cloreto Férrico a 1%. Na reação com Hidróxido de Sódio, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa e 5 ml de água destilada, na proporção de 1:5. Em seguida, 1 ml dessa mistura foi descartado e, ao conteúdo restante, foram adicionadas, pela parede do tubo, 2 gotas de NaOH a 5%.

Identificação de alcaloides

Para a identificação de alcaloides, os reagentes de Bourchardat, Mayer e Dragendorff foram preparados previamente de acordo com o preconizado pela Sociedade Brasileira de Farmacognosia¹². Para a reação de Bourchardat, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa, 1 ml de água destilada e 5 gotas do reagente de Bourchardat. No desenvolvimento da reação de Mayer, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa, 1 ml de água destilada e 5 gotas do reagente de Mayer. Para a reação de Dragendorff, em tubo de ensaio, foi adicionado 1 ml da solução extrativa, 1 ml de água destilada e 5 gotas do reagente de Dragendorff.

Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pela capacidade de sequestro de radicais livres com o uso de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Após adição de solução de DPPH a 2,4 mg/100 mL, a amostra foi mantida ao abrigo da luz durante 30 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 520 nm. A atividade antioxidante é expressa como o percentual de

inibição do radical DPPH (AA%) e em termos de CE50 (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% da concentração inicial do DPPH). As determinações foram realizadas em triplicata^{13,14}.

Avaliações de citotoxicidade *in vitro*

A avaliação de citotoxicidade *in vitro*^{15,16} foi realizada com suspensões de 1 ml de hemácias nas quais foram adicionados 1 ml de concentrações crescentes (4%, 6%, 8%, 10%, 15% e 20%) dos extratos diluídos em solução glicosilada. Para o controle negativo foi colocado 1 ml da suspensão de hemácias em tubo de ensaio e adicionado 1 ml da solução glicosilada. Para o controle positivo foi colocado 1 ml da suspensão de hemácias em tubo de ensaio e 1 ml de Triton. A leitura da absorbância em 540 nm foi realizada em espectrofotômetro.

Ensaio da membrana corioalantoide (*Chorioallantoic membrane assay - CAM*) *in vivo*

O ensaio da membrana corioalantoide (*Chorioallantoic membrane assay - CAM*) *in vivo* foi realizado para complementar a avaliação toxicológica dos extratos de graviola e fruta do conde. Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios Multidisciplinares do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), em Catanduva-SP, e conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA), UNIFIPA (07/18). Para a realização dos testes *in vivo*, foram utilizados ovos fertilizados de galinha (*Gallus gallus*), incubados à temperatura de 38°C e umidade relativa de 45% a 65% durante 3 dias¹⁷⁻¹⁹. Os ovos embrionados foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle, em que os ovos permaneceram fechados e sem intervenções e grupos tratados, nos quais foram aplicados na câmara de ar 100 µl dos extratos de graviola e fruta do conde em concentrações de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%. A casca dos ovos foi perfurada na região da câmara de ar para administração do PBS ou do extrato e, após, o orifício foi selado com parafilme. No terceiro dia de incubação, a casca do ovo ao redor da câmara de ar foi removida para avaliação da vascularização na membrana corioalantoide e o desenvolvimento morfológico do embrião.

RESULTADOS

Identificação de compostos fitoquímicos

Identificação de taninos totais (Cloreto Férrico, Acetato de Chumbo, Acetato de Cobre) e taninos específicos (Acetato de chumbo e Ácido Acético Glacial, Reativo de Wasicky)

Na reação com Cloreto Férrico (FeCl₃) a 2%, houve formação de precipitado esverdeado para ambos os extratos. Também pela reação com Acetato de chumbo a 10%, houve formação de precipitado castanho avermelhado, evidenciando a presença de taninos totais. Diferentemente, na reação com Acetato de cobre a 5%, não houve formação de precipitado castanho avermelhado. A ausência de tal precipitado demonstra ausência de taninos para esse reagente (Tabela 1).

Reativos	Fitoquímico	Presença <i>Annona muricata</i> (Graviola)	Presença <i>Annona Squamosa</i> (Fruta do conde)
Cloreto Férrico	Taninos Gerais	+	+
Acetato de Cobre	Taninos Gerais	-	-
Acetato Neutro de Chumbo	Taninos Gerais	+	+
Acetato de chumbo + Ácido Acético Glacial	Taninos gálicos	-	-
Reativo de Wasicky	Taninos catequímicos	-	+
Agitação	Saponinas	+	-
Cloreto Férrico	Flavonoides	-	-
Hidróxido Sódio	Flavonoides	+	-
Reagente Bouchardat	Alcaloides	+	-
Reagente Dragendorff	Alcaloides	+	+
Reagente Mayer	Alcaloides	+	-

Tabela 1 - Fitoquímica para identificação e caracterização do extrato bruto de folhas de graviola e fruta do conde

A presença de taninos gálicos foi confirmada pela formação de precipitado castanho avermelhado apenas na reação para identificação de cumarina, enquanto na reação com o Reativo de Wasicky, não foi possível evidenciar a presença de taninos catequímicos (Tabela 1).

Identificação de saponinas (reação por agitação)

Na reação por agitação do frasco, houve a formação de espuma, evidenciando a presença de saponinas para graviola, contudo a fruta do conde que mostrou ausência desse mesmo composto (Tabela 1).

Identificação de flavonoides (Cloreto Férrico, Hidróxido de Sódio)

A presença de flavonoides foi confirmada pela reação da solução extrativa diluída e o Hidróxido de sódio, com o aparecimento de cor entre verde, amarelo-castanho e violeta, para a comprovação dos compostos. Os flavonoides foram observados no extrato da graviola, mas não no extrato da fruta do conde. Contudo, a reação de shinoda foi negativa para ambos os extratos (Tabela 1).

Identificação de alcaloides (Bouchardat, Mayer, Dragendorff)

A busca por alcaloides foi feita pelos reagentes Bouchardat, Mayer e Dragendorff. Nessas reações foi observada a mudança esperada para a presença de alcaloides para o extrato da graviola, enquanto o extrato da fruta do conde foi positivo apenas para a reação de Dragendorff (Tabela 1).

Capacidade antioxidante

A análise da atividade antioxidante do extrato foi determinada pela capacidade de sequestro de radicais livres com o uso de DPPH. Os estudos demonstraram que o extrato bruto das folhas de graviola apresenta atividade antioxidante de 88,14% enquanto para a fruta do conde foi de 86,65%.

Avaliações de citotoxicidade *in vitro*

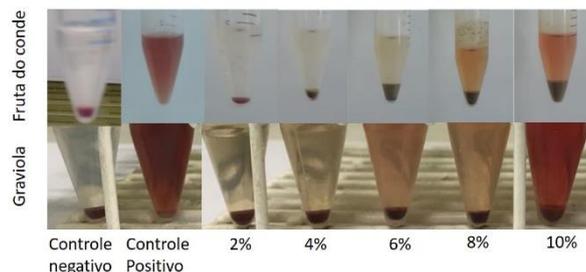
Os estudos de citotoxicidade *in vitro* mostraram baixa citotoxicidade do extrato de graviola na dosagem de 4%, citotoxicidade relativa nas dosagens de 6% e 8% e potencialmente citotóxica na concentração de 10%. O extrato de fruta do conde não mostrou citotoxicidade importante em nenhuma das concentrações (Tabela 2 e Figura 1).

Tabela 2 – Teste de hemólise com análise por espectrofotômetro

Concentração do extrato bruto	Absorbância <i>A. muricata</i> (Graviola)	Absorbância <i>A. squamosa</i> (Fruta do conde)
CN	0,078	0,023
CP	1,508	1,495
2%	0,080	0,012
4%	0,142	0,031
6%	0,294	0,044
8%	0,375	0,047
10%	1,822	0,048

CN - Controle Negativo
CP - Controle Positivo

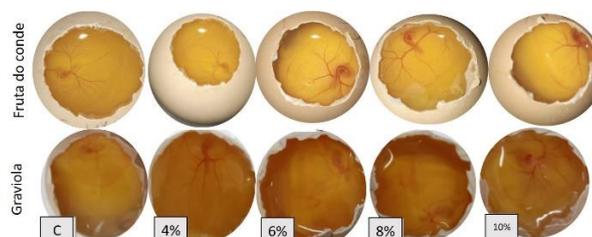
Figura 1 - Análises de citotoxicidade por Hemólise (*in vitro*). Tubos da esquerda para a direita: Controle negativo (PBS), Controle positivo (0.1% Triton), diluições do extrato à 2%, 4%, 6%, 8%, 10%



Avaliações de citotoxicidade *in vivo*

As análises de CAM não mostraram citotoxicidade de ambos extratos em 4%, 6%, 8% com desenvolvimento normal do embrião e ausência de vasoconstrição e coagulação, comparados ao controle. A partir da concentração de 10% há redução da vascularização, hemólise e morte dos embriões (Figura 2).

Figura 2 - Teste de citotoxicidade *in vivo* CAM: os ovos controles com desenvolvimento embrionário normal. Na sequência os ovos que foram injetados, respectivamente, com as seguintes concentrações do extrato bruto, 4%, 6%, 8% e 10%. Não se observam alterações na vascularização da membrana CAM e desenvolvimento até a concentração de 8% em ambos os extratos



DISCUSSÃO

A padronização de extratos de *A. muricata* e *A. squamosa* é importante para o conhecimento dos compostos e o estabelecimento de dosagens seguras. Diante disso, procedemos às análises fitoquímicas qualitativas e avaliação de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* de extratos alcoólicos brutos das folhas de graviola e fruta do conde.

Nossos resultados mostraram a presença de taninos, flavonoides e alcaloides, o que evidencia as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do extrato bruto de ambos extratos, com exceção da saponina que foi observada apenas na *A. muricata*, como já observado em outros estudos²⁰. A capacidade antioxidante elevada da solução extrativa das Annonas foi confirmada pela análise de DPPH, sendo maior para *A. muricata*. Nossas análises corroboram com investigação anterior que avaliou a capacidade antioxidante de extratos de sementes, cascas e polpas da *A. squamosa*²¹ e eliminação de radicais livres em estudos da *A. muricata*²².

Os fitoquímicos presentes nas folhas da *A. muricata* e *A. squamosa* podem encontrar aplicações para a preparação de alimentos, como chás, infusões, suplementação e bebidas para a formulação de suplementos com o intuito de melhorar o funcionamento do organismo e prevenir doenças, principalmente pelos compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides^{3,4,20}. Os glicosídeos, fitoesteróis, proteínas, carboidratos, saponinas, taninos, alcaloides, fenóis, flavonoides, peptídeos e acetogeninas presentes nos extratos de *A. muricata* e *A. squamosa* mostram perfis promissores como agentes antitumorais, antioxidantes, antidiabetogênicos e antiparasitários^{5,7}.

Além dos efeitos quimiopreventivos e quimioterápicos relacionados ao câncer, os extratos de *A. muricata* e seus constituintes, individualmente ou em combinação, mostraram propriedades terapêuticas para doenças inflamatórias e oxidativas crônicas, feridas não infecciosas e infecciosas e doenças microbianas e parasitárias.

Diante da importância de se estabelecer dosagens seguras, na sequência do estudo foram realizadas análises citotóxicas de diferentes

concentrações dos extratos em testes *in vitro* e *in vivo*. Nossos estudos indicaram ausência de citotoxicidade de ambos os extratos nas concentrações de 2% e 4% tanto nos testes de hemólise quanto no ensaio CAM, toxicidade relativa por hemólise nas concentrações de 6% e 8% e alta toxicidade a 10% para *A. muricata* nas análises de hemólise e CAM. Pelo teste CAM, a *A. squamosa* também mostrou toxicidade a 10%. Outra investigação mostrou que o extrato de folhas e cascas da graviola foi capaz de inibir significativamente as propriedades angiogênicas em modelo CAM²³.

Embora a maioria tenha proporcionado benefícios à saúde, alguns dos fitoquímicos derivados da *A. muricata*, como as acetogeninas, demonstraram neurotoxicidade *in vitro* e *in vivo*^{5,6,24}. Além disso, a aplicação de sementes de *A. squamosa* trituradas na lavagem do cabelo para combate a piolhos também mostrou efeitos adversos. Esse hábito causou ceratite tóxica por insulto químico ou mecânico das sementes ao epitélio da córnea⁸. Essas situações enfatizam a importância do desenvolvimento de mais pesquisas para identificar e quantificar a quantidade de fitoquímicos tóxicos, bem como determinar as doses a serem usadas com seres humanos.

CONCLUSÃO

O conjunto dos nossos dados evidenciaram a presença de compostos do metabolismo secundário com atividades anti-inflamatórias e antioxidantes nos extratos de folhas da graviola e fruta do conde. O extrato de fruta do conde foi menos citotóxico, mas ambos os extratos apresentaram citotoxicidade em altas concentrações. Esses resultados mostram perfil fitoquímico satisfatório dos extratos de folhas de *A. muricata* e *A. squamosa* e concentrações seguras, especialmente em concentrações abaixo de 10%, o que estimula a continuidade dos estudos sobre o uso terapêutico desses extratos.

REFERÊNCIAS

1. Pandey N, Barve D. Phytochemical and pharmacological review on *Annona squamosa* Linn. Int J Res Pharm Biomed Sci. 2011; 2:1404-12.
2. Patel JD, Kumar V. *Annona squamosa* L.: phytochemical analysis and antimicrobial screening. J Pharm Res. 2008; 1:34-8.
3. Vyas K, Manda H, Sharma RK, Singhal G. An update review on *Annona Squamosa*. Int J Clin Pharm Th. 2012; 3(2):107-18.

4. Ma C, Chen Y, Chen J, Li X, Chen Y. A review on *Annona squamosa* L.: phytochemicals and biological activities. *Am J Chin Med.* 2017; 45(5):933-64.
5. Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HM, Kadir HA. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(7):15625-58.
6. Rady I, Bloch MB, Chamcheu RN, Banang Mbeumi S, Anwar MR, Mohamed H, et al. Anticancer properties of graviola (*Annona muricata*): a comprehensive mechanistic review. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018:1826170.
7. Kumar M, Changan S, Tomar M, Prajapati U, Saurabh V, Hasan M, et al. Custard apple (*Annona squamosa* L.) leaves: nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting biological activities. *Biomolecules.* 2021; 11(5):614.
8. Qazi AK, Siddiqui JA, Jahan R, Chaudhary S, Walker LA, Sayed Z, et al. Emerging therapeutic potential of graviola and its constituents in cancers. *Carcinogenesis.* 2018; 39(4):522-33.
9. Souza GHB, Mello JCP, Lopes NP, organizadores. Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais. Ouro Preto, MG: Editora UFOP, 2011.
10. Menezes Filho ACP, Castro CFS. Identificação das classes de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de *Campomanesia adamantium*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Kielmeyera lathrophytum* e *Solanum lycocarpum*. *Estação Científica (UNIFAP).* 2019; 9(1):89-101.
11. Souza LAP, Spehar CRE, Santos RLS. determinação do teor de saponina em quinoa. *Pesq Agropecuária Bras.* 2004; 39(4):397-401.
12. Oliveira MAC, Albuquerque MM, Xavier HS, Strattmann RR, Grangeiro Júnior S, Queiroz AT, et al. Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de alcaloides totais como berberina em fitoterápico contendo *Berberis vulgaris* L. *Rev Bras Farmacognosia.* 2006; 16(3):357-64.
13. Rufino R, Silva J.R.L. Cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol.* 2006; 32(3):241-8.
14. Sejas LM, Silbert S, Reis, AO, Sader HS. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *J Bras Patol Med Lab.* 2003; 39(1):27-35.
15. Desoti VC, Maldaner CL, Carletto MS, Heinz AA, Coelho MS, Piatí D, Tiunan TS. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobianas e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. *Arq Ciên Saúde UNIPAR.* 2011; 15(1):3-13.
16. Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(11):1162-76.
17. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive Toxicology.* 2017; 70:97-101.
18. Kundeková B, Máčajová M, Meta M, Čavarga I, Bilčík B. Chorioallantoic membrane models of various avian species: differences and applications. *Biology.* 2021; 10(4):1-24.
19. Gruen M, Laux-Biehlmann A, Zollner TM, Nagel J. Use of dynamic weight bearing as a novel end-point for the assessment of abdominal pain in the LPS-induced peritonitis model in the rat. *J Neurosci Methods.* 2014; 232:118-124.
20. Gavamukulya Y, Abou-Ellella F, Wamunyokoli F, AEI-Shemy H. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pac J Trop Med.* 2014; 7S1:S355-63.
21. Shehata MG, Abu-Serie MM, Abd El-Aziz NM, El-Sohaimy SA. Nutritional, phytochemical, and in vitro anticancer potential of sugar apple (*Annona squamosa*) fruits. *Sci Rep.* 2021; 11(1):6224.
22. Onohuean H, Alagbonsi AI, Usman IM, Iceland Kasozi K, Alexiou A, Badr RH, et al. *Annona muricata* Linn and *Khaya grandifoliola* C.D.C. reduce oxidative stress *in vitro* and Ameliorate *Plasmodium berghei*-induced parasitemia and cytokines in BALB/c Mice. *J Evid Based Integr Med.* 2021; 26:2515690X211036669.
23. Foster K, Oyenihi O, Rademan S, Erhabor J, Matsabisa M, Barker J, et al. Selective cytotoxic and anti-metastatic activity in DU-145 prostate cancer cells induced by *Annona muricata* L. bark extract and phytochemical, annonacin. *BMC Complement Med Ther.* 2020; 20(1):375.
24. Gandhi P, Radhakrishnan N, Khaitan I, Srinivasan M, Prajna VN. Toxic keratitis after application of custard apple seed for head lice infestation. *Cornea.* 2019; 38(8):948-50.

Envio: 20/05/2022

Aceite: 29/09/2022