



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)

KIVIA DOS SANTOS MACHADO

**Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da casca do caule de
Annona squamosa L.**

Recife
2023

KIVIA DOS SANTOS MACHADO

**Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da casca do caule de
Annona squamosa L.**

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PPGCF) da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Recife
2023

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

M149a	Machado, Kivia dos Santos Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da casca do caule de <i>Annona squamosa</i> L. / Kivia dos Santos Machado. – 2023. 62 p. : il. Orientadora: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2023. Inclui referências. 1. DPPH. 2. Fitoterápicos. 3. Levedura. 4. Pinha. I. Amorim, Elba Lúcia Cavalcanti de (orientadora). II. Título. 617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2024 - 002)
-------	--

KIVIA DOS SANTOS MACHADO

**Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da casca do caule de
Annona squamosa L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmácia (PPGCF) da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde (CCS), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: 17/11/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Elba Lucia Cavalcanti de Amorim (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof.^a Dr.^a Rosali Maria Ferreira Da Silva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Tadeu José Da Silva Peixoto Sobrinho (Examinador Externo)
Centro Universitário UniFavip - Wyden

*Dedico este trabalho aos meus pais,
por todo amor e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, pelo amor e apoio que sempre me deram e por estarem presente em todos os momentos difíceis. Amo vocês!

À Professora Elba, que me acolheu e me orientou desde o meu IC, pela paciência, pelos conselhos que foram essenciais em minha trajetória acadêmica e pela confiança em mim depositada.

A todos os integrantes do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT) pelo acolhimento, pelo espírito de equipe e pelo carinho, principalmente a Fernanda, Uyara, Marcelino e Jenifer, que estiveram muito presente e sempre me ajudaram quando necessário.

À professora Danielle Macêdo por pelo acolhimento, ensinamentos que foram essenciais na etapa microbiológica da minha pesquisa, além de ceder com muito carinho o espaço do Laboratório de Análises Microbiológicas (LAM), onde passei bom tempo da minha pesquisa.

Aos queridos amigos que fiz no LAM, Gabriel Nascimento, Gabriel Torres, Marques, Débora, Mary, Anne e Fenícia pela companhia, amizade, ensinados e pela ótima recepção que tive no espaço de vocês!

Aos meus queridos amigos que a graduação de biologia me trouxe, Letícia, Carol, Dan Lucas, Carlinhos e Nina por toda força, carinho, risadas e ajuda em toda minha caminhada.

Aos meus amigos queridos Ana Carla, Deco e Priscila que mesmo de longe, sempre acreditaram e me incentivaram. Obrigada pelas conversas, conselhos e apoio.

Ao meu querido amigo que o ensino médio me deu, Marcos Vinicius, que ao seu modo sempre me deu carinho, apoio e que acompanhou de perto minha paixão pela ciência. Obrigada pelo incentivo sempre.

Ao meu querido Matheus Valença, por todo amor, carinho, paciência e dedicação por tantos anos. Obrigada por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, por me acolher e me acalmar de uma forma muito doce e gentil sempre, por virar madrugadas comigo, sempre me apoiando e me incentivando. Sinto-me extremamente feliz por ter você ao meu lado.

À FACEPE pelo apoio financeiro.

Sinto-me muito feliz por ser uma pessoa que sempre teve muita sorte com as

peessoas com quem cultivo vínculos, esse trabalho foi só mais uma prova disso. Todas as pessoas tiveram, em algum grau, contribuição para que esta dissertação fosse finalizada. Muito obrigada a todos pelo carinho e amor que tornaram essa jornada mais leve.

“Agradecer os amigos que fiz e que mantém a coragem de gostar de mim,
apesar de mim” (Maria Bethânia).

RESUMO

O uso de plantas medicinais é uma prática muito antiga, gerada na esfera da sociedade não-urbana e não-industrial. O uso medicinal das plantas é possível graças aos compostos secundários, substâncias responsáveis pela defesa dos vegetais. Dentre os vegetais utilizados, *Annona squamosa* L., conhecido popularmente como pinha, vem se destacando como alternativa medicinal. O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antioxidante e antifúngica da casca do caule de *A. squamosa* L. As amostras vegetais foram coletadas na região de Altinho-PE, secas em temperatura ambiente, submetidas à moagem e à extração hidroetanólica (70%) através de três métodos extrativos: maceração, ultrassom e micro-ondas. Foi realizada a caracterização fitoquímica dos extratos brutos por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e determinação do conteúdo de fenóis totais, taninos e flavonoides por métodos espectrofotométricos. As atividades antioxidantes dos extratos brutos obtidos foram avaliadas pelo método do DPPH. O extrato obtido por ultrassom foi que apresentou maior teor de fenóis totais com $67,13 \pm 1,76$ mg/gEAT. Em relação aos taninos, o maior teor foi do extrato obtido pelo método de micro-ondas com $29,08 \pm 0,64$ mg/gEAT e para os flavonoides, o maior valor encontrado foi para o extrato obtido por maceração com $371,34 \pm 0,64$ mg/gER. Para os testes com DPPH, o extrato obtido por micro-ondas apresentou a melhor atividade antioxidante, com o valor de CE50 $871 \pm 16,11$ µg/mL, o que ainda representa uma atividade antioxidante incipiente. Para avaliação das concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) foram realizados testes com microdiluição em poços. Foi observado que nos três primeiros poços do método de ultrassom foi verificada a inibição das espécies *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida tropicalis* ATCC 750 e *Candida parapsilosis*, na maceração houve inibição nos três primeiros poços para a espécie *C. parapsilosis* e em micro-ondas houve inibição para *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. parapsilosis*. Portanto, pode-se concluir que os extratos, independente do seu método de extração, apresentaram boa atividade antifúngica. No entanto, outras espécies do gênero *Candida* devem ser avaliadas para compreender o mecanismo de atuação dos compostos ativos, melhor caracterizá-los e promover testes in vivo para viabilização de uso comercial.

Palavras-chave: DPPH; fitoterápicos; levedura; pinha.

ABSTRACT

The cultivation of medicinal plants is an ancient practice, developed in the domain of a nonindustrialized and rural society. Therapeutic use of plants is possible due to the presence of secondary compounds, which account for defense in vegetables. Among the species belonging to this group, *Annona squamosa* L., popularly known as sugar apples or sweetsops, has been emerging as a medicinal alternative. This study aims to evaluate the antioxidant and antifungal activity of extracts of *A. squamosa* L. stem bark. The plant samples were collected in the city of Altinho, in the Brazilian state of Pernambuco, dried at room temperature, milled, and subjected to hydroethanolic extraction (70%) using three different extractive methods: maceration, ultrasound, and microwave. The phytochemical characterization of the crude plant extracts was performed using Thin-Layer Chromatography (TLC), and the determination of the total phenolic, tannin, and flavonoid content was carried out through spectrophotometric methods. The antioxidant activities of the crude extracts were assessed using the DPPH method. The ultrasound-extracted sample exhibited the highest total phenolic content at 67.13 ± 1.76 mg/g GAE. Regarding tannins, the highest content was observed in the microwave-extracted sample with 29.08 ± 0.64 mg/g GAE, and for flavonoids, the highest value was found in the maceration-extracted sample at 371.34 ± 0.64 mg/g RE. For the DPPH tests, the microwave-extracted sample exhibited the best antioxidant activity, with an IC₅₀ value of 871 ± 16.11 µg/mL, still representing an incipient antioxidant activity. For the evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC), microdilution tests in wells were conducted. It was observed that in the first three wells of the ultrasound method, inhibition of the species *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida tropicalis* ATCC 750, and *Candida parapsilosis* was observed. In maceration, inhibition occurred in the first three wells for the species *C. parapsilosis*, and with microwave, inhibition was observed for *C. tropicalis* ATCC 750 and *C. parapsilosis*. Thus, it can be concluded that the extracts, regardless of their extraction method, exhibited good antifungal activity. However, other species of the *Candida* genus should be evaluated to understand the mechanism of action of the active compounds, further characterize them, and conduct *in vivo* tests to facilitate commercial use.

Keywords: DPPH; phytotherapeutics; yeast; sugar-apple.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1	<i>Annona squamosa</i> L.: aspectos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos	15
3.2	Métodos extrativos	18
3.2.1	Maceração	20
3.2.2	Extração assistida por ultrassom	21
3.2.3	Extração assistida por micro-ondas	21
3.3	Compostos fenólicos	22
3.4	Microrganismos de trabalho	26
3.4.1	<i>Candida albicans</i>	28
3.4.2	<i>Candida parapsilosis</i>	29
3.4.3	<i>Candida tropicalis</i>	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Amostras vegetais	30
4.2	Controle de qualidade	30
4.2.1	Determinação do Teor de Umidade	30
4.2.2	Determinação de Cinzas Totais	30
4.2.3	Determinação de Matéria Estranha	31
4.3	Obtenção dos extratos	31
4.4	Rendimento	31
4.5	Triagem fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	32
4.6	Avaliação da atividade antifúngica	33
4.6.1	Teste Quantitativo de Microdiluição em Placa	33
4.6.2	Microrganismos Teste	34
4.6.3	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima(CFM)	34
4.7	Doseamento de Fenóis Totais	34

4.8	Determinação do Conteúdo de Taninos Totais	35
4.9	Doseamento de Flavonoides	35
4.10	Saponinas - Teste Qualitativo de Espuma	36
4.11	Avaliação da atividade antioxidante - Método DPPH	36
4.12	Análise estatística	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Controle de qualidade	38
5.2	Rendimento dos extratos	39
5.3	Perfil fitoquímico	40
5.3.1	Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	40
5.3.2	Determinação de fenóis totais, taninos e flavonoides	41
5.4	Determinação da atividade antioxidante por DPPH	43
5.5	Determinação da atividade antifúngica	44
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

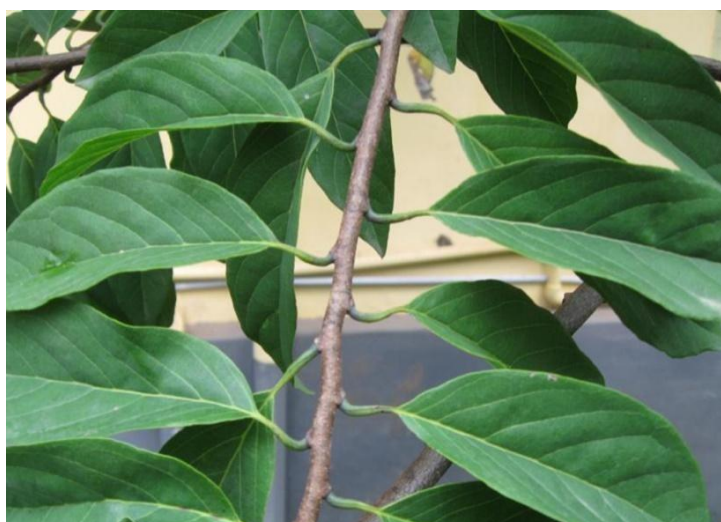
O conhecimento sobre o uso de plantas para fins medicinais teve seu início nas sociedades primitivas, aumentando com o desenvolvimento da agricultura (Heiser Jr., 1993). Este conhecimento tradicional pode ser definido como o saber e também a habilidade, no contexto da comunidade não-urbana e não-industrial, onde em geral são transmitidos de forma oral (Diegues, 2004). Esse saber popular é importante para a ciência, pois revela saberes ancestrais, resultante de observações sistemáticas de fenômenos da natureza (Balick; Cox, 1996). Por esses conhecimentos serem disseminados principalmente pela oralidade, estudos etnobotânicos - responsáveis pelos registros das interações ecológicas, genéticas, evolutivas e culturais com as plantas (Alexiades, 1999) - são essenciais para garantir o seu registro e assegurar que eles não se percam ao longo do tempo (Messias et al., 2015). Esse entendimento é de extrema importância para elaboração de estratégias conservacionistas com relação ao uso desses recursos (Albuquerque; Hanazaki, 2006).

Sobre essas comunidades que fazem o uso mais frequente das plantas medicinais, há ausência ou insuficiência de políticas públicas referentes ao atendimento “das necessidades básicas de saúde das populações periféricas vem levando a uma crescente procura de alternativas economicamente mais viáveis, gerando aumento do consumo de plantas medicinais” (Azevedo; Silva, 2006). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 80% da população mundial já fez uso de plantas para tratar alguma enfermidade ou incômodo, sendo 30% destes casos decorrentes de recomendação médica (Rosa; Béria, 2011). Uma das alternativas muito utilizadas no país, e também interesse central deste trabalho, é *Annona squamosa* L. (Figura 1), pertencente à família Annonaceae Juss e conhecida popularmente como pinha, fruta do conde ou ata.

Trata-se de uma espécie caribenha que só chegou ao Brasil por meio do Conde Mirando, responsável por plantar o primeiro exemplar na Bahia (Brito et al., 2008) e que vem se destacando como alternativa medicinal em vários estados da região Nordeste, como Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco, e também em São Paulo (Donadio, 1997; Araújo; Alves, 1999). O motivo de sua boa adaptação ao clima brasileiro deve-se ao fato de preferir climas quentes, com pouca chuva e com estação seca definida, característicos do bioma Caatinga, por exemplo (Brito et

al., 2008). Ela é uma árvore de pequeno porte, podendo alcançar de 3 a 5 metros de altura, com casca de cor parda e com folhas possuindo entre 6 e 7 cm de comprimento (Joly, 1979). A pinha tem seu fruto bastante comercializado e consumido pela população, além disso, possui grande importância na medicina de povos tradicionais, pois sementes são empregadas no combate à caspa e aos piolhos (Ramos, 1992). São verificados, também, usos como inseticida e veneno para peixes. Destaca-se, no entanto, pelo aproveitamento de todas as suas partes para o tratamento de dor de cabeça, diarreia, falta de apetite, reumatismo, anovulação, anemia e algumas infecções (Vohora; Kumar; Naqvi, 1975; Wong; Khoo, 1993).

Figura 1 – Folhas e caule de *Annona squamosa* L.



Fonte: Indian Medicinal Plants, 2023.

Um exemplo de interesse são as infecções causadas pelo gênero *Candida* spp. Escassas até o começo do século XX, essas enfermidades aumentaram devido ao progresso da medicina e de alguns de seus procedimentos invasivos, que quebram barreiras de proteção natural do corpo e acarretam crescimento do número de colonizações e infecções fúngicas. O uso desenfreado de antibióticos de amplo espectro, nem sempre por recomendação médica, também foi um fator importante. Em última instância, essas infecções geram quadros de complicação renal, como a bola fúngica e abscessos, além de complicações sistêmicas (Oliveira et al., 2001).

Sabendo do potencial farmacêutico de plantas medicinais e das propriedades antimicrobianas de *A. squamosa* L., esta pesquisa tem como objetivo verificar a

atividade antifúngica e antioxidante da casca do seu caule, a fim de ampliar as informações científicas a respeito dessa espécie e, potencialmente, determinar um novo agente antifúngico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar as atividades antifúngica e antioxidante da casca do caule de *Annona squamosa* L.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos das cascas do caule pelos métodos de maceração, ultrassom e micro-ondas;
- Caracterização do aspecto físico-químico do material vegetal através da avaliação de cinzas totais, umidade e material estranho;
- Determinar o conteúdo de fenóis totais e taninos pelo método de Folin-Ciocalteu;
- Determinar o conteúdo total de flavonoides por cloreto de alumínio (AlCl_3);
- Caracterizar e quantificar os componentes presentes nos extratos de *Annona squamosa* L. através da cromatografia de camada delgada (CCD);
- Avaliar a atividade antioxidante da casca do caule pelo sequestro de radicais livres 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH);
- Avaliar a atividade antifúngica do extrato da casca de *Annona squamosa* L. em três espécies de *Candida*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Annona squamosa* L.: aspectos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos

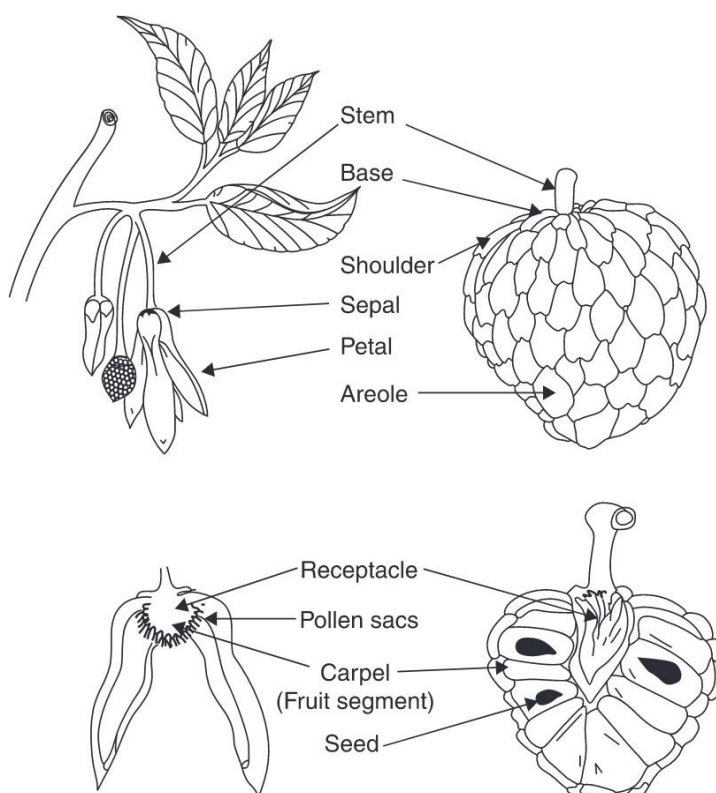
As espécies da família Annonaceae são usadas como medicamento na medicina popular há tempos por populações tradicionais em diferentes regiões tropicais do globo. Suas espécies são usadas para tratar diferentes tipos de enfermidades, incluindo doenças parasitárias e infecciosas, câncer, diabetes, antimicrobianos e até mesmo transtornos mentais (Quílez et al., 2018; Frausin et al., 2014; Moghadantousiet al., 2015; Tsabang et al., 2012). Existem algumas divergências quanto ao número exato de gêneros para a família, com estimativas variando entre 130 até 200 gêneros (Sauquet et al., 2003), embora o número de espécies estimado seja o mesmo, com cerca de 2500 espécies descritas (Mabberley, 1997). As espécies do gênero *Annona* L. podem ser arbustos ou pequenas árvores, com altura variando entre 5 e 11 metros. Esse intervalo de valores é devido a vários aspectos, como o tipo da espécie, a qualidade do solo, períodos de chuva e/ou sol na região, presença ou não de fitopatógenos e o manejo da cultura. Em geral, essas espécies possuem caules acinzentados (Léon, 1987).

Com origem na América Central, mais especificamente na região das Antilhas, *A. squamosa* Linn. é uma das principais representantes do gênero *Annona* L, que reúne mais de 50 espécies diferentes de plantas (Joly, 1979). É uma espécie caribenha que chegou ao Brasil por meio do Conde Mirando, responsável por plantar o primeiro exemplar na Bahia (Brito et al., 2008). Essa espécie teve cultivo iniciado na região da Bahia, com grande destaque em outros estados da região nordeste, como Alagoas, Ceará, Paraíba e Pernambuco. No estado de São Paulo também existe grande cultivo da planta (Donadio, 1996; Araújo et al., 1999). O motivo da sua boa adaptação ao clima brasileiro se deve ao fato de preferir climas quentes, com pouca chuva e estação seca definida (Brito et al., 2008).

A. squamosa L. é conhecida popularmente como pinha, fruta do conde, cherimólia ou ata (Kiill; Costa, 2003). A planta possui muitas flores, sendo considerada uma espécie atrativa para polinizadores, com destaque para aqueles de longa distância (Paulino, 2014). A pinha possui flores pendentes, axilares, isoladas, hermafroditas, com cálice e corola trímeros, carnosos, coloração verde externamente e creme internamente (Kiill; Costa, 2003). O androceu possui mais de

100 estames de filetes curtos e o gineceu, mais de 100 carpelos, ovário súpero e estilete simples (Kiill; Costa, 2003). Seu fruto é ovoide, possui entre 5 e 10 cm de diâmetro, sua superfície é verde escura, mas é coberta por um pó branco no começo de seu desenvolvimento. Quando madura, os carpelos se separam, mostrando então a polpa geralmente branca ou amarela do fruto. Essa separação é bastante característica das espécies de *Annona* L. e identifica que a fruta está pronta para o consumo e/ou comércio (Léon, 1987).

Figura 3 – *Annona squamosa* L.: folhas, flores, fruto e estruturas internas de flor e fruto.



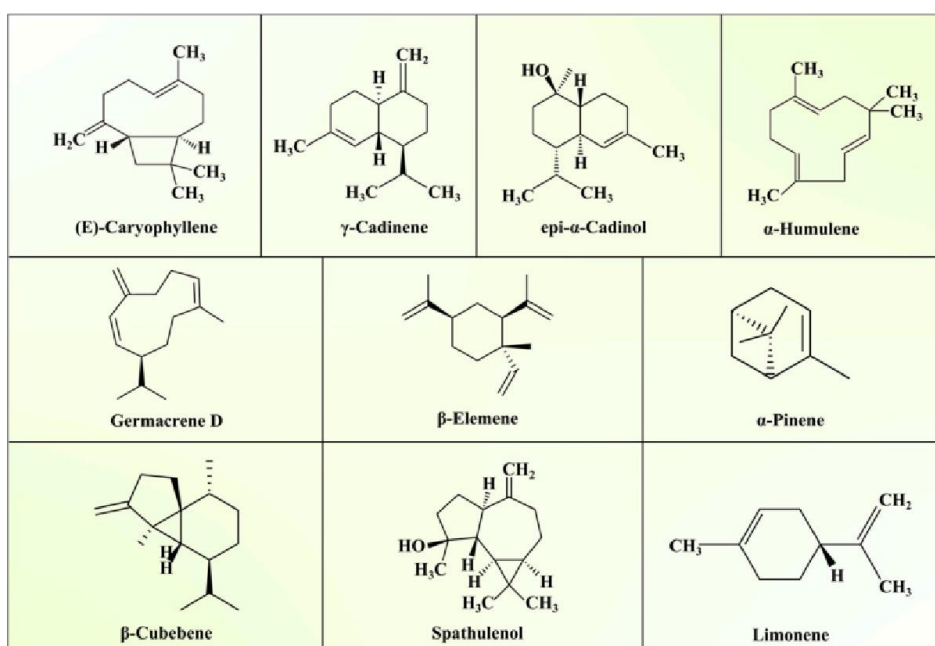
Fonte: Wongs-Aree; Noichinda, 2011 (adaptado).

Quase toda a estrutura de *Annona squamosa* L. é empregada na medicina popular. Sua análise fitoquímica em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Safira et al., 2022) já mostrou que essa espécie possui substâncias como saponinas, alcaloides, flavonoides, fenóis e glicosídeos, que já são amplamente estudados e conhecidos por seus potenciais antimicrobiano, anticancerígeno e antiviral (Hosseiniabadi, 2021). Seu óleo essencial é composto em sua grande maioria de terpenos, monoterpênicos e sesquiterpenos. Os terpenos são hidrocarbonetos cíclicos ou acíclicos (Forezi et al., 2021).

Essas substâncias foram identificadas, em seu óleo essencial, por

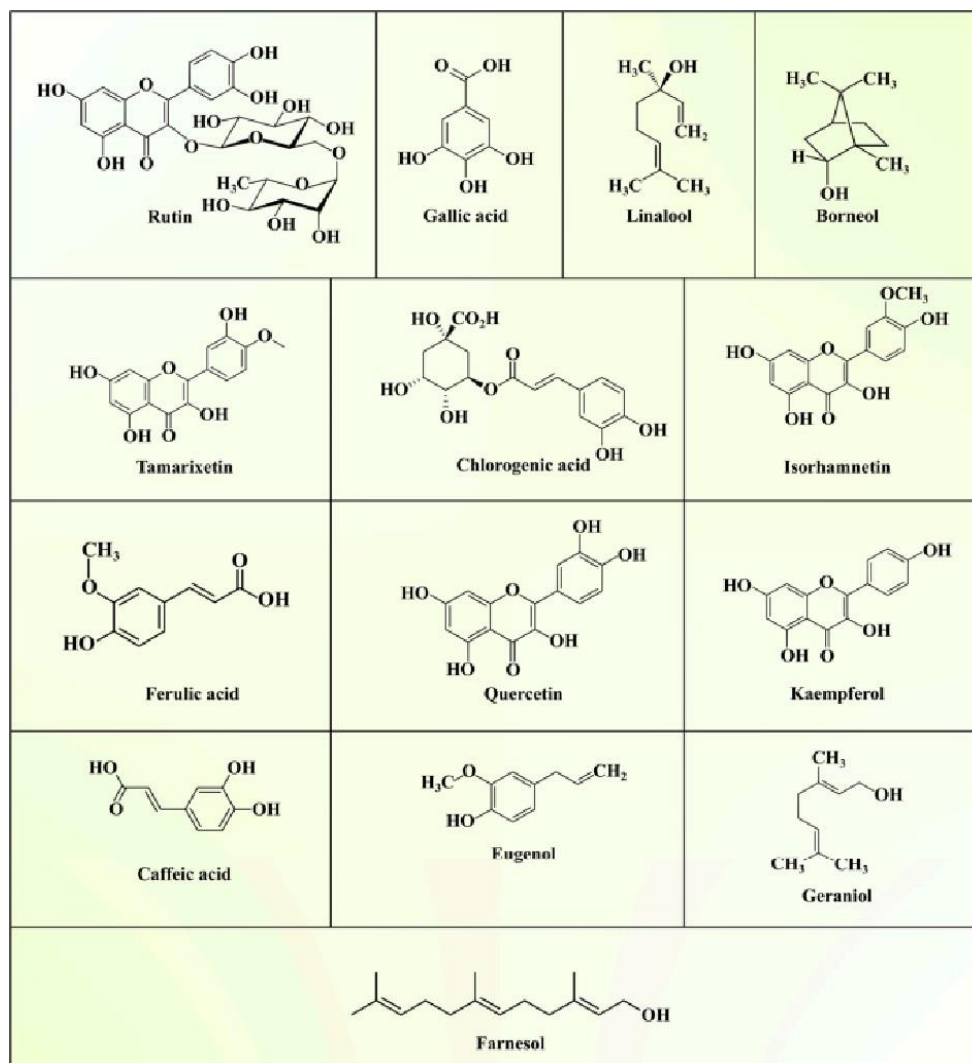
cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS). Porém, a quantidade de cada composto pode variar dependendo do país onde a planta está localizada. No Brasil, (E)-cariofileno (27,4%) e germacreno D (17,1%) foram os principais constituintes relatados, enquanto carvona (24,9%), diacetil (9,3%) e linalol (7,7%) foram os principais constituintes relatados nas plantas encontradas no Egito (Meira et al., 2015; Verma et al., 2016). Na Figura 4 é possível visualizar algumas estruturas dos componentes químicos do óleo essencial de *Annona squamosa* L.

Figura 4 – Estrutura de componentes do óleo essencial de *Annona squamosa* Linn.



Fonte: Kumar et al., 2021.

Em relação ao conteúdo do extrato de *Annona squamosa* L., pode-se afirmar também que o tipo de solvente utilizado para extração de soluto gera diferenças nas quantidades de compostos encontrados. Porém, em geral, são encontrados compostos como acetogeninas, alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, glicosídeos, sesquiterpenos, antocianinas, esteroides, diterpenos, terpenóides, quinonas, aminoácidos e ácidos graxos. Destacam-se os compostos fenólicos, flavonoides, alcaloides, saponinas e taninos (Kumar, 2019). Esses compostos comprovadamente podem regular vários processos bioquímicos e fisiológicos, como atividades enzimáticas no corpo humano, trazendo inúmeros benefícios para a população (Luca, 2020; Chen et al., 2016; Choi, Kim., 2013.). Na Figura 5 estão exibidas as estruturas de alguns compostos encontrados em *Annona squamosa* L.

Figura 5 – Alguns compostos fitoquímicos encontrados em *A. squamosa* L.

Fonte: Kumar et al., 2021.

3.2 Métodos extrativos

Extrair significa retirar, da forma mais adequada e seletiva possível, a substância desejada da droga vegetal que está sendo estudada. Para isso, utiliza-se um líquido ou um solvente adequado para que se obtenha a extração mais completa possível (Sonaglio et al., 2015). O resultado dessa extração é denominado de solução extrativa ou extrato.

Extratos podem ser definidos como produtos encontrados de diferentes formas (líquidas/viscosas ou em pó), que podem ser feito de partes secas das plantas ou dos seus frutos (Schulz et al., 2002). Dois fatores são de grande importância para se obter um bom extrato vegetal: as condições em que se é

realizado o processo de extração e a qualidade da matéria prima (Schulz et al., 2002).

O material vegetal utilizado no processo de extração possui normalmente uma estrutura complexa, onde são encontrados células, espaços intercelulares, capilares e poros. Nesse sentido, a extração também é afetada pela estrutura celular da planta e estrutura molecular do soluto, seu tamanho e pelas ligações químicas. As características químicas do material vegetal e do solvente não devem ser ignoradas e é justamente por isso que cada sistema exhibe um comportamento imprevisível (Pinelo et al., 2004).

Para selecionar o melhor método de extração a ser utilizado deve-se atentar à parte do vegetal que está sendo estudada (folha, raiz, caule, flor ou frutos), sendo possível a aplicação de métodos contínuos ou descontínuos, com ou sem agitação e com aplicação ou não de calor. No caso da extração contínua, o mesmo solvente é reutilizado no mesmo recipiente e passa novamente pela fase de extração, enquanto no método descontínuo o solvente é deixado em repouso no recipiente em que se deve realizar a extração apenas por um tempo determinado para, logo em seguida, ser renovado, como é o caso da maceração (Pavia et al., 2015).

Há dois tipos de operação de extração: extração parcial (sem esgotamento do material vegetal), como a maceração e a turbo extração, e operações exaustivas (com esgotamento), como a extração carrossel e a extração com gases supercríticos (Sonaglio et al., 2015). Os líquidos utilizados para realizar a extração são de extrema importância para o sucesso do procedimento. Porém, é sempre importante conhecer as limitações de uso, sobre as quais podemos destacar três aspectos: as propriedades extrativas, a adequação tecnológica e a inocuidade fisiológica (Sonaglio et al., 2015)

As propriedades extrativas se relacionam aos parâmetros de dissolução, ou seja, o quanto o solvente dissolve o extrato a temperatura ambiente (Martin; Bustamante, 1993). A adequação tecnológica, por sua vez, se refere à facilidade da eliminação da solução final, o que depende do ponto de ebulição do solvente utilizado, além das suas toxicidade e periculosidade (Sonaglio et al., 2015). Fatores físicos como a separação de solvente por membrana de ultrafiltração, a osmose, o tamanho molecular e a afinidade pelo material filtrante são determinantes para uso ou abandono da técnica desejada (Sonaglio et al., 2015). A inocuidade fisiológica ou toxicidade é um último fator de extrema importância para viabilizar o manuseio da

técnica de forma segura para os pesquisadores. Caso seja necessário o uso de solventes mais tóxicos, como o metanol, o diclorometano ou o hexano, deve-se determinar as concentrações máximas de uso para que haja dano mínimo ao pesquisador. Além disso, o emprego de clorofórmio não é recomendado em qualquer caso (Sonaglio et al., 2015).

Além dos fatores citados, a proporção droga/solvente é uma condição limitante para o processo, pois interfere diretamente na saturação do líquido utilizado (Peixoto Sobrinho, 2012). Com essas informações, é possível selecionar o melhor método extrativo para a realização do experimento, levando sempre em consideração o custo, os riscos, a estabilidade e a eficiência do processo (Sonaglio et al., 2015).

3.2.1 Maceração

A maceração pode ser definida como uma operação na qual o líquido extrativo e a droga vegetal ficam em recipiente fechado, durante um longo período, de horas ou dias, e em diversas temperaturas, podendo ser a frio ou à temperatura ambiente (Sonaglio et al., 2015). Esse método leva ao desgaste do solvente extrator e não da droga vegetal em si, pois o líquido entra na matéria prima e dissolve o soluto, resultando em um líquido de alta concentração. Esse processo pode ser repetido até a exaustão da droga vegetal ou apenas deixar o solvente por vários dias, ocasionando seu desgaste (Gamse, 2002).

Alguns fatores influenciam no sucesso do método de maceração, a saber: fatores relacionados ao material vegetal (natureza, tamanho da partícula, quantidade, teor de umidade e composição), fatores relacionados ao líquido extrator (quantidade e seletividade) e fatores relacionados ao sistema (temperatura, agitação, pH, quantidade de droga/solvente) (Sonaglio et al., 2015).

Os materiais vegetais mais indicados para serem extraídos por esse método são aqueles que não possuem gomas, resinas e alginatos em sua composição. Em relação ao solvente, indica-se utilizar etanol ou soluções hidroetanólicas, não sendo indicado misturar com água, onde a proporção etanólica seja abaixo de 20% pois há uma maior chance de contaminação microbiana (Sonaglio et al., 2015).

3.2.2 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom utiliza correntes de ondas ultrassônicas de alta frequência (acima de 20 kHz) com o intuito de fragilizar as membranas da célula vegetal, facilitando assim a extração (Huie, 2002). Em um solvente líquido, as ondas criam um ciclo de expansão, que é responsável por gerar uma pressão negativa, causando assim bolhas ou cavitação, o que facilita o processo de extração do material, com modificação da permeabilidade da parede celular (Chemat et al., 2011) (Luque-García; Castro, 2003). A cavitação e as bolhas entram em contato com a matéria vegetal, causando a quebra da membrana celular, o que como consequência aumenta a difusão e exposição das substâncias que estão dentro do material (Vinatoru, 2001 e Flores-Jiménez et al., 2019).

Alguns fatores podem interferir na extração, dentre os principais são a frequência, a temperatura, a pressão e o tempo de sonicação que regulam a ação dos ultrassons, a granulometria, teor de umidade e solvente utilizado (Azmir et al., 2013). A extração pode ser feita em um tempo mais curto, variando geralmente entre 15 e 60 minutos, o que viabiliza a utilização desse método na extração de compostos termossensíveis de alimentos, produtos de saúde, cosméticos e produtos farmacêuticos (Dong et al., 2010).

3.2.3 Extração assistida por micro-ondas

As micro-ondas podem ser definidas como ondas eletromagnéticas, capazes de aquecer sem ter contato direto com a matéria ou objeto, em que ocorre a transformação de energia elétrica em energia térmica (Ferreira et al., 2020). A extração assistida por micro-ondas é possível graças à pressão contínua que aquece o solvente em questão (Huie, 2002). Por causa da radiação emitida pelas micro-ondas, é possível romper a célula vegetal e assim liberar os compostos. Basicamente, o aquecimento por micro-ondas ocorre por migração iônica e rotação dipolar (Chemat; Cravotto, 2013).

A migração iônica é o movimento de íons dissolvidos em solução. Esse movimento é causado pela interação entre as espécies iônicas com o campo elétrico oscilante das micro-ondas (Chemat; Cravotto, 2013). Quando há deslocamento desses íons, ocorre um fluxo de corrente em que há resistência vinda das demais

espécies iônicas (em fluxo oposto), o que gera aumento da temperatura do meio. Já a rotação dipolar pode ser definida como o efeito do campo elétrico oscilante sobre as moléculas com momentos dipolares. Há um alinhamento dessas moléculas na presença de micro-ondas (na frequência de 2450 MHz). Esse processo, juntamente com o retorno e alinhamento das moléculas ao estado inicial, resulta em um rápido aquecimento (Chemat; Cravotto, 2013; Dudley et al., 2015).

Uma das maiores vantagens dessa extração se dá pelo rompimento da célula vegetal e extração em menor tempo que demais métodos, existindo uma maior transferência de calor ao material vegetal, em pouco tempo, em geral, segundos ou minutos (Chemat et al., 2015; Li et al., 2013; Navarrete et al., 2012).

3.3 Compostos fenólicos

As plantas possuem grande importância para a medicina moderna e seu estudo avançou de forma considerável nos últimos anos. Muitas substâncias obtidas a partir de vegetais acabaram sendo descobertas e colocadas para uso em terapias contemporâneas, seja como forma de medicamentos ou em sua forma mais pura através de óleos essenciais (Pereira; Cardoso, 2012).

Esse uso é possível devido à presença de metabólitos secundários, que são compostos orgânicos catalisados por enzimas que ocorrem nos organismos vivos (Marzzoco; Torres, 2007). Esses componentes são essenciais para a defesa da planta (Ojala, 2001), protegendo-a de outras plantas, de insetos, de herbívoros predadores e de microrganismos causadores de infecções (Pinto et al., 2002), sendo, portanto, ligados diretamente com a capacidade de sua adaptação ambiental (Berg; Lubert, 2008). Assim como os metabólitos primários responsáveis por funções estruturais, plásticas e de armazenamento de energia, os equivalentes secundários são produzidos pelas plantas em todo seu ciclo vital (Ojala, 2001). Em relação aos seus equivalentes primários, a estrutura dos metabólitos secundários é complexa, geralmente com baixo peso molecular e ocorrendo em baixas concentrações. Esses compostos já foram considerados produtos de excreção, porém, com o avanço das pesquisas na indústria farmacêutica para a testagem dessas substâncias, sabe-se da sua importância para a adaptação da planta ao meio e do seu valor farmacológico (Simões et al., 2007).

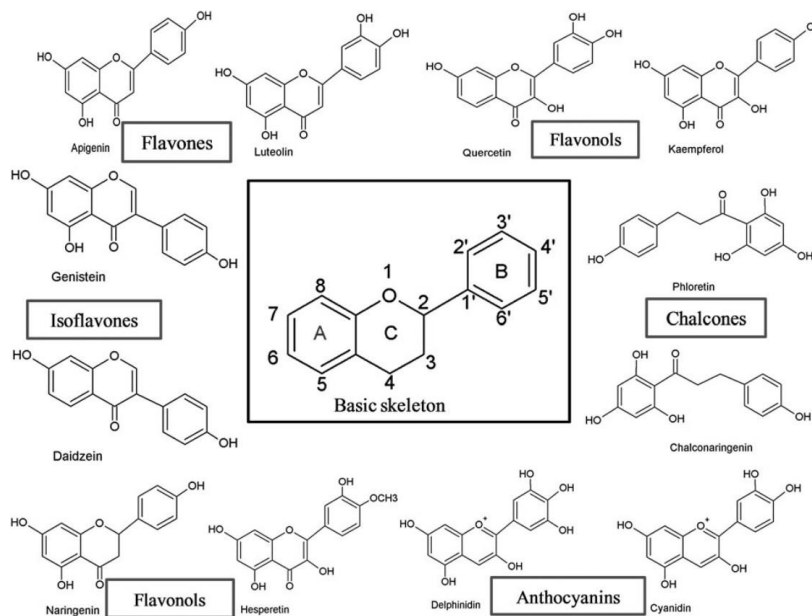
Um importante exemplo de metabólito secundário são os compostos fenólicos, que apresentam uma estrutura química de anéis aromáticos e hidroxilas substituídas, contribuindo para a pigmentação dos vegetais e atuando na fotossíntese (Angelo; Jorge, 2006). Os compostos fenólicos possuem importantes atividades antioxidantes que tanto ajudam na manutenção das plantas quanto são de importância medicinal para a saúde humana (Bettaieb et al., 2011). Os efeitos farmacológicos dos compostos fenólicos estão sendo bastante estudados, dentre eles os benefícios para os sistemas circulatório e gastrointestinal, efeitos antimicrobianos e proteções antitumoral e anti-inflamatória que são atribuídos aos diferentes tipos de fenóis (Alinian et al., 2016).

Segundo Simões et al. (2007), a origem dos metabólitos secundários pode ser resumida, segundo o metabólito da glicose, por dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é o predecessor dos taninos hidrolisáveis, das cumarinas, dos alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e dos fenilpropanoides, todos possuindo em comum um anel aromático em sua estrutura. Por sua vez, o acetato possui como derivados os aminoácidos alifáticos, terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos (Leite, 2021).

Em geral, os compostos fenólicos são quimicamente constituídos de anéis aromáticos ligados a uma ou mais hidroxilas (Klepacka et al., 2011). Há diferentes tipos de compostos fenólicos, sua divisão difere de acordo com a sua estrutura molecular, do número de anéis aromáticos e suas hidroxilas e das ligações com demais grupamentos, sendo os mais abundantes os flavonoides e ácidos fenólicos (Farah; Donangelo, 2006; Niedzwiecki et al., 2016).

A estrutura básica dos flavonoides são dois anéis benzênicos A e B, alguns conectados pela pirona ao anel C (Figura 2). Trata-se de derivados de aminoácidos aromáticos e são encontrados em várias espécies vegetais (comestíveis ou não) geralmente nas formas aglicosilada (aglicona) e glicosilada, esta última sendo a mais frequente (Arnos; Costa; Schmidt, 2019). Uma das propriedades mais notáveis dos flavonoides é a sua capacidade antioxidante em razão de suas propriedades de óxido-redução. Eles são, portanto, capazes de neutralizar e absorver radicais livres, a partir do processo de quelação do oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (Brenna; Pagliarini, 2001; Fennema, 1993; Simão, 1977; Wang; Zheng, 2001).

Figura 2 – Esqueleto químico fundamental dos flavonoides (ao centro) e a estrutura de alguns representantes.



Fonte: Panche; Diwan; Chandra, 2016.

De forma geral, os antioxidantes podem ser definidos como compostos com o poder de retardar ou inibir a oxidação de moléculas, evitando a difusão das reações em cadeia de oxidação (Degáspari; Waszczynskyj, 2004). Grande parte das existentes patologias humanas está diretamente relacionada ao estresse oxidativo: os radicais livres, que são espécies de meia vida curta, podem causar alguns efeitos deletérios, como a oxidação de proteínas (Pandey; Brave, 2011). Nos flavonoides, a atividade antioxidante ocorre pela via dos fenilpropanóides (Hodaei et al., 2018). Neste processo, as enzimas mais importantes são a chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI) e flavona 3-hidrolase (F3H) (Shih et al., 2008; Hodaei et al., 2018).

Há basicamente dois tipos de antioxidantes: os naturais e os sintéticos. Antioxidantes naturais têm sido cada vez mais estudados para substituir os sintéticos, tanto em produtos alimentícios quanto em produtos farmacêuticos, pois o uso dos antioxidantes sintéticos está cada vez mais restrito pelo seu potencial de carcinogênese. Além disso, em razão da associação a diversos outros males como o aumento do peso do fígado e a significativa proliferação do retículo endoplasmático, que está ligada à maior tolerância do organismo a uma determinada substância (Mavi; Kara, 2001; Melo; Guerra, 2002; Simão, 1977; Yildirim; Wang; Zheng, 2001). Alimentos como frutas, vegetais e condimentos possuem compostos fenólicos, tais quais os compostos nitrogenados, carotenóides, ácido ascórbico e tocoferóis. Esses

são fitoquímicos que apresentam grande capacidade antioxidante e que são associadas a baixas incidência e mortalidade de câncer em seres humanos (Birch et al., 2001; Sluis et al., 2001; Tomás-Barberan et al., 2001; Vinson et al., 2001; Wang; Zheng, 2001; Watanabe, 1998; Yildirim; Mavi; Kara, 2002).

O consumo de antioxidantes diariamente na dieta pode promover uma ação protetora contra os processos oxidativos que ocorrem naturalmente no corpo humano. As espécies reativas oxigenadas (ROS, na sigla em inglês), por exemplo, podem ser responsáveis por algumas doenças como o câncer, a aterosclerose, a diabetes, a artrite, a malária e algumas doenças cardíacas. Além disso, as ROS também estão ligadas a processos responsáveis pelo envelhecimento celular (Brenna; Pagliarini, 2001; Yildirim; Mavi; Kara, 2002).

Outro importante composto flavonoide são os taninos. Os taninos possuem massa molecular intermediária a alta, variando de 500 a 3000 Dalton (Sarkar; Howarth, 1976) e são capazes de precipitar ou de se ligar a proteínas solúveis. Os taninos possuem sabor adstringente, o que é resultado da precipitação de proteínas salivares, sendo um fator a ser considerado na qualidade de alguns produtos alimentícios como frutas ou processados (Hummer; Schreier, 2008). Por exemplo, altas quantidades de taninos são encontradas em frutos verdes, conferindo a esses alimentos um sabor desagradável, impedindo que sejam digeridos por predadores antes de estarem maduros suficientes para suas sementes serem germinadas (Alves et al., 2010). Além de sua atividade antioxidante (Feng et al., 2014; Zarin et al., 2016), algumas propriedades atribuídas aos taninos incluem o controle glicêmico (Yang et al., 2015; Lee et al., 2017) e as atividades antitumoral, antimicrobiana (Zarin et al., 2016), antifibrinolítica (Pereira; Silva; Carbonari, 2017) e antiviral para hepatite C (Ajala et al., 2014).

Os taninos podem ser classificados em dois tipos: hidrolisados ou condensados. Ambos os tipos possuem moléculas denominadas poli-hidroxifenóis e/ou seus derivados. Os hidrolisados incluem os galitaninos e os elagitaninos, que são derivados respectivamente do ácido gálico e do ácido elágico (Bobbio; Bobbio, 1989; Fennema, 1993; Melo; Guerra, 2002). Os taninos condensados são formados pela condensação de subunidades flavan-3-ol (catequina e epicatequina, por exemplo), sendo assim possível a formação de redes oligoméricas e/ou poliméricas. As redes oligoméricas são as cadeias de proantocianidinas com grau de polimerização entre 2 e 5, acima disso são chamados de poliméricas (Santiago et

al., 2020; Haslam, 1998).

Um dos grupos importante para o uso medicinal são as fitoalexinas, elas são substâncias de baixo peso molecular que possuem propriedades antimicrobianas e servem para proteger as plantas quando há algum ataque de microorganismos fitopatogênicos (Dey; Harbone, 1997; Souza, 2005). As fitoalexinas aparecem geralmente em altas concentrações em resposta à infecção, desempenhando nos vegetais um papel semelhante ao dos anticorpos nos animais (Pinto et al., 2002). Dentre as fitoalexinas, as cumarinas são um grande destaque, graças às suas atividades biológicas antimicrobiana, anticancerígena e até mesmo antiviral (Doming; López-Brea, 2003).

3.4 Microrganismos de trabalho

O reino Fungi possui cerca de seis milhões de espécies distribuídas por todo o planeta. Várias dessas espécies podem afetar de forma negativa a vida do ser humano, por exemplo, por meio de consumo de cogumelos que possuem toxinas (as micotoxinas) e que podem resultar em graves distúrbios gastrointestinais, levando até mesmo a morte (Firacative, 2020). Acredita-se que entre 70 e 90% das infecções fúngicas sejam causadas pelo gênero *Candida*, sendo a espécie *Candida albicans* a responsável pela maioria dos problemas de saúde (Firacative, 2020; Barbosa et al., 2020). Além desta espécie, outras são de grande importância médica como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, responsáveis por diversas infecções, tais como a candidíase vulvovaginal (CVV), a candidíase oral e a candidemia (Lam, 2018; Silva et al., 2016).

Candida é um fungo dimorfo, pertencente ao filo Ascomycota, que pode habitar diversas partes do corpo humano, dentre elas o trato respiratório, gastrointestinal e urinário de pacientes saudáveis (cerca de 30% deles) durante toda a vida (Netea; Maródi, 2010; Diezmann et al., 2004). Entretanto, se o hospedeiro apresentar baixa imunidade ou perda da resposta imunológica em algum momento da vida, pode levar a manifestação de candidíase (Netea; Maródi, 2010).

O gênero *Candida* é conhecido por causar diversos tipos de enfermidades aos humanos, sendo a CVV a mais conhecida delas, tendo como sintomas o prurido vulvar, ardor, dor ao urinar e corrimento vaginal, geralmente esbranquiçado (Linhares et al., 2019; Anderson; Klink; Cohrssen, 2004). A CVV é considerada a

segunda infecção vaginal mais comum, podendo afetar de 75 até 80% das pessoas com vaginas ao menos uma vez na vida, perdendo apenas para a vaginite bacteriana (Borges et al., 2018; Anderson; Klink; Cohrssen, 2004).

Apesar de terem suas diferenças, não é incomum a confusão entre as vaginites bacterianas e fúngicas, o que leva o paciente a ter diagnósticos errados e seguir com os sintomas após o uso de medicamentos incorretos, o que causa grandes impactos na qualidade de vida desses pacientes, principalmente os imunocomprometidos (Oliveira; Schmidt, 2021; Nishimoto; Sharma; Rogers, 2020; Sobel, 1985). A seguir, vamos destacar algumas espécies de *Candida* atuantes na CVV.

3.4.1 *Candida albicans*

De todas as espécies, *Candida albicans* é a que domina as manifestações candidíase em pacientes pelo mundo. Essa espécie de candida vive nos organismos de mamíferos de forma benigna, porém pode se tornar patogênica se houver alguma alteração no corpo, como a mudança no pH das mucosas, uso de antibióticos, terapia imunossupressora ou alguma resposta do hospedeiro em evento de grande estresse, por exemplo (Whaley et al., 2017; Pfaller; Diekema, 2007).

O aumento das infecções por *Candida albicans* pode ser associada ao uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro, além do uso de tratamento mais moderno como quimioterapia, transplantes de órgãos, que deixam o paciente mais vulnerável a infecções. Esse fungo é um fungo oportunista, então quando há uma baixa na imunidade, uma perda significativa de lactobacillus, por exemplo, há um aumento desse patógeno no organismo. Outro grave problema se refere à falha de diagnósticos da infecção fúngica (Nishimoto; Sharma; Rogers, 2020).

Diferentes tipos de medicamentos são utilizados para o tratamento da candidíase, dentre eles os mais comuns são os polienos, os azólicos, as equinocandinas, os análogos de nucleosídeos e as alilaminas. A eficácia de cada um destes depende do local do corpo a ser tratado e da sensibilidade da espécie de *Candida*, o que demonstra a importância do correto diagnóstico para a eficácia do tratamento (Pfaller et al., 2010; Pfaller; Diekema, 2012; Pfaller et al., 2013; Pappas et al., 2016).

Atualmente, medicamentos convencionais, como é o caso dos azóis, vêm apresentando falhas para o tratamento de algumas infecções, dentre elas as infecções com *C. albicans*, apesar de serem em um número bem reduzido se comparado a outras espécies, apenas 0,4% (Rocha, 2021). Em relação às infecções fúngicas, há uma preocupação aguda, visto que a disseminação de patógenos fúngicos multirresistentes é cada vez mais observada (Lee et al., 2020).

Para *C. albicans*, o fluconazol é o medicamento usualmente mais prescrito, sendo pertencente à classe dos azólicos (Pfaller et al., 2010). Estudos recentes como o de Rocha (2021), porém, têm mostrado certa resistência do fungo ao medicamento. Um dos mecanismos da resistência identificada na espécie está associada a alterações no gene que codifica o direcionamento da enzima para acoplar o medicamento, sendo mutações pontuais no gene *ERG11* (Pristov; Ghannoum, 2019). Essas mutações permitem que haja substituição de aminoácidos, resultando na diminuição da suscetibilidade da espécie ao fluconazol (Whaley et al., 2017).

3.4.2 *Candida parapsilosis*

A espécie *C. parapsilosis* não difere fenotipicamente das demais espécies: possui forma oval, redonda ou cilíndrica, e suas colônias são ditas concêntricas, lisas ou no formato de crateras (Laffey, 2005). Ao contrário de *C. albicans*, *C. parapsilosis* não forma as hifas verdadeiras, apenas pseudo-hifas ou leveduras (Laffey, 2005).

C. parapsilosis é uma das espécies não albicans de grande importância médica, pois é capaz de formar biofilmes em cateter venoso central (CVC) e outros tipos de implantes, ou seja, pacientes imunossuprimidos ou que passaram por algum tipo de procedimento mais invasivo, pois esta espécie tem grande capacidade de aderir superfícies protéticas (Branco, 2023). Além disso, também pode agravar o estado de saúde das crianças que nascem com baixo peso ou desnutridas, pois cresce rapidamente nos casos de nutrição parenteral (Paramythiotou, 2014). Mesmo não apresentando a mesma taxa de mortalidade de *C. albicans*, em várias regiões, como a Ásia, *C. parapsilosis* foi isolada e apresentou resistência aos azóis, dificultando seu tratamento e ocasionando a piora da infecção nos pacientes (Melatiadis et al., 2017; Govender et al., 2016).

3.4.3 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis se trata de uma espécie encontrada com frequência na América Latina, China e Índia (Pfaller et al., 2013). *Candida tropicalis* é um fungo conhecido por infectar principalmente pacientes imunossuprimidos constituindo-se, assim como as demais espécies de *Candida* spp, como um fungo oportunista (Souza et al., 2022).

C. tropicalis é um fungo do tipo dimórfico, onde há a formação de pseudomicélio e que, em condições favoráveis, pode formar hifas verdadeiras, assim como *C. albicans*. Suas colônias possuem cor creme ou cinza, de aspecto macio e cremoso quando cultivadas em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ou no meio Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD). Esse aspecto é semelhante ao das demais espécies de *Candida*, não sendo possível a distinção entre elas através de seu aspecto morfológico (Suzuki; Miyamae; Ishida, 1991; Chai; Denning; Warn, 2010; Turner et al., 2014; Zhang et al., 2016).

Ao contrário das espécies de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, *Candida tropicalis* é normalmente mais sensível ao uso de medicamentos do tipo azol, como o fluconazol, muito comumente usado para seu tratamento. Entretanto, sua resistência tem sido observada na China, Índia e demais países asiáticos, gerando preocupação na comunidade médica (Fan et al., 2017; Tan et al., 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras vegetais

A coleta foi realizada em uma área de Caatinga do estado de Pernambuco, localizada na zona rural de Altinho, município do agreste central Pernambucano, distante 163,1 km do Recife, com uma área de 454,486 km² e clima semiárido quente (Araújo et. al., 2008). A coleta foi realizada em março de 2020.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel até o processo de secagem em temperatura ambiente. Depois da secagem, as amostras foram estabilizadas em uma estufa durante dois dias, a temperatura de $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e pulverizadas em moinho vertical de facas tipo Willye, sendo padronizada em tamises na granulometria de 1 mm (18USA Mesh). A matéria prima padronizada foi extraída com etanol 80% na proporção 1:10 (g/mL).

4.2 Controle de Qualidade

4.2.1 Determinação do Teor de Umidade

Esta etapa foi realizada a partir da metodologia de perda por dessecação definida na Farmacopeia Brasileira 6^a edição (Brasil, 2019). As amostras vegetais foram analisadas em triplicata, pesando 1g, levadas à estufa, em temperatura de 105° C por 30 minutos, e ao dessecador até temperatura ambiente. A operação foi repetida até o peso constante da amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem de água em relação à droga seca ao ar.

4.2.2 Determinação de Cinzas Totais

As cinzas totais também foram determinadas conforme metodologia da Farmacopeia Brasileira 6^a edição (Brasil, 2019). Pesou-se 3g das amostras, que foram colocadas em cadinhos de porcelana. Em seguida, as amostras foram levadas à mufla em gradiente de temperatura até alcançar um máximo de $600 \pm 25^{\circ}\text{C}$. Após esse processo, as amostras foram resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e, assim, tiveram sua porcentagem de cinzas totais calculada. Os teores de

cinzas totais foram expressos em porcentagem (%) em relação à matéria vegetal seca ao ar. O teste também foi realizado em triplicata.

4.2.3 Determinação de Matéria Estranha

O pó vegetal foi pesado e separado por quarteamento, novamente segundo definido pela Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019). A separação ocorreu a olho nu, seguida de uso de lupa. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem.

4.3 Obtenção dos extratos

As amostras, já secas e trituradas, foram submetidas ao processo de maceração, ultrassom e micro-ondas, utilizando como solvente uma solução hidroetanólica 80% e na proporção 1:10 (g/mL). O material vegetal foi submetido a três macerações, com renovação do solvente a cada 48h. Para o método de ultrassom, foi utilizado o equipamento ultrassom Unique® modelo UltraCleaner 1400A, com duração de 60 minutos e aquecimento fixo ($60 \pm 5^\circ\text{C}$). Na extração assistida por micro-ondas, utilizou-se a identidade física que relaciona a quantidade de calor (Q) que aquece o solvente com conhecido calor específico c à sua variação de temperatura ΔT ($Q = mc\Delta T$), onde ΔT se refere à diferença entre a temperatura de ebulição do solvente e a sua temperatura ambiente. Isso permitiu estimar o intervalo de tempo Δt da extração, dado que a potência do equipamento, definida como $P = Q/\Delta t$, é conhecida. Um forno de micro-ondas Panasonic Style® foi, então, operado em 60% da potência durante 1 minuto para as cascas. Os extratos resultantes foram submetidos à evaporação em pressão reduzida, a temperatura de $40 \pm 5^\circ\text{C}$, até total secura.

4.4 Rendimento

O cálculo do rendimento (Re, dado em porcentagem) foi realizado de acordo com Rodrigues et al., 2011, com a relação

$$\text{Re} = \frac{\text{P. Ex. Seco}}{\text{P. D. V. P. M.}} \times 100$$

onde P.Ex. Seco é o peso do extrato seco e P.D.V.P.M. é o peso da droga vegetal pulverizada macerada.

4.5 Triagem fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

O extrato bruto e as frações foram avaliados por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para verificação da presença de várias classes de metabólitos secundários. Para isso, foi utilizada uma cuba cromatográfica de vidro com tampa, onde foram adicionados o sistema eluente, o padrão e o revelador adequados para cada tipo de metabólito.

Tabela 1. Sistema eluente, padrão e revelador para identificação de compostos fenólicos presentes nos extratos.

Metabólitos secundários	Sistema Eluente	Padrão	Revelador
Compostos Fenólicos	Acetato de Etila: Ácido Fórmico: Água (27:1,5: 1,5)	Rutina	NEU
Naftoquinonas	Tolueno: ácido fórmico (20:10)	Lapachol	KOH etanólico 10%
Taninos	Acetato de Etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (20,30: 2,2: 2,2: 5,3)	Ácido gálico	FeCl ₃
Flavonoides	Acetato de Etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (20,30: 2,2: 2,2: 5,3)	Rutina	NEU

Fonte: A autora (2023).

Na preparação, o extrato foi pesado (0,10 g) e foi realizada a solubilização em 1,5 mL de metanol. Para obter uma amostra mais homogênea, o material foi colocado no equipamento Ultrassom (UNIQUE - Modelo Ultra Cleaner 1400A). Placas de sílica em alumínio foram recortadas e o extrato vegetal foi aplicado com auxílio de capilares de vidro. Após a evaporação do metanol, as placas foram inseridas na cuba cromatográfica com o eluente.

Após a eluição dos componentes do extrato, as placas foram retiradas e se aguardou a secagem em temperatura ambiente. Em seguida, a aplicação do revelador foi feita sobre a placa de sílica em temperatura ambiente. Novamente, a amostra é deixada para secagem em temperatura ambiente para, então, ser

realizada a observação dos compostos na luz UV (365 nm).

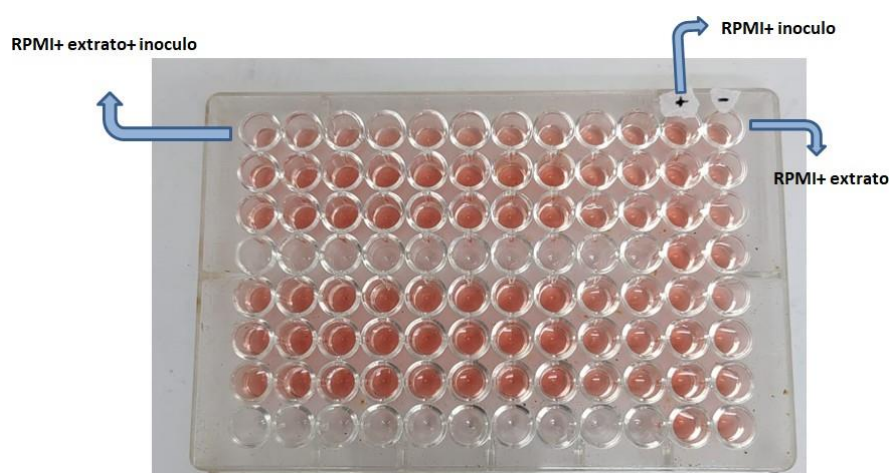
4.6 Avaliação da atividade antifúngica

4.6.1 Teste Quantitativo de Microdiluição em Placa

Para realização deste teste, foi utilizado a padronização BrCAST-EUCAST-Abril 2020 nas placas de microdiluição de 96 poços de fundo chato e com tampa (Figura 6). Inicialmente, foram adicionados 100 μ L de meio Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI) em todos os poços. Após isso, 100 μ L do extrato vegetal, diluído em dimetilsulfóxido a 20% (DMSO), foram adicionados na primeira cavidade e diluições seriadas sucessivas foram realizadas, com concentrações variando de 15000 μ g/mL a 29,3 μ g/mL. Em seguida, 100 μ L da suspensão fúngica foram adicionados a cada orifício da placa.

Para controle de viabilidade dos microrganismos, foram colocados 100 μ L do meio (sem o extrato vegetal ou antifúngico) e as leveduras. Foram também realizados testes com o antifúngico fluconazol, na concentração de 64 μ g/mL. No poço 12 foi colocado o meio de cultura para ser utilizado como controle negativo. Todas as placas foram seladas e incubadas a 37°C por um período de 24 horas.

Figura 6 - Representação da microdiluição em placa para a técnica de CIM.



Fonte: A autora (2023).

4.6.2 Microrganismos Teste

A verificação atividade antifúngica dos extratos de *A. squamosa* Linn. foi realizada frente aos seguintes microrganismos obtidos a partir de American Type Culture Collection (ATCC): *C. albicans* (14053) e *C. tropicali* (750), além da amostra clínica de *C. Parapsilosis* coletadas no hospital das clínicas de Pernambuco. Todos os isolados são provenientes da Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

4.6.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

As leveduras cresceram em meio de cultura Ágar Dextrose Sabouraud a 37°C durante 24 horas. Foi retirado um inóculo das culturas, suspensos em 9,0 mL de água destiladas em Vortex por 15 segundos. A densidade celular foi ajustada por espectrofotômetro com acréscimo da solução salina estéril suficiente para obter a transmitância (0,080-0,13) equivalente de uma solução padrão da escala de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 530 nm. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura com aproximadamente 10⁶ UFC/mL (Souza et al., 2007; Moreira et al., 2010).

Para determinar a concentração fungicida mínima (CFM) foi observada somente a viabilidade fúngica. A partir do teste da CIM, foi adicionado uma haste esterilizada de 1 µL no poço anterior (para confirmar a CIM) e no poço posterior ao CIM, homogeneizada e subcultivada em placa de Petri contendo ASD (Sabouraud Dextrose Ágar). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e a leitura foi realizada observando o crescimento ou supressão das colônias de *Candida* ssp. (Ernst et al., 1999, com modificações). Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.7 Doseamento de Fenóis Totais

Para quantificar os fenóis totais, 200 µL do extrato diluído (1,0 mg/mL) foram transferidos para tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 500 µL da solução do reagente Folin-Ciocalteu, 1 mL da solução de carbonato de sódio e 8,3 mL de água destilada. As amostras permaneceram por 30 minutos no escuro à

temperatura ambiente.

A absorbância da mistura foi medida a 760 nm contra um branco preparado com água destilada. A curva de calibração (alíquotas de 100-500 µL) foi preparada com uma solução padrão de ácido tânico e todos os demais reagentes citados anteriormente, aferindo-se o volume final para 10 mL com água destilada. As concentrações finais de ácido tânico foram 1.0-5.0 µg/mL.

O ensaio foi realizado em triplicata. O teor de fenóis totais foi expresso como miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de extrato (mg EAT/g) (Peixoto et al., 2008).

4.8 Determinação do Conteúdo de Taninos Totais

A determinação do teor de taninos foi realizada segundo método de Folin-Ciocalteu adaptado para a espécie. Foi pesado 1 g de caseína e transferir para erlenmeyer de 50 mL, acrescentando 6 mL da amostra e 12 mL de água destilada. Após 3 (três) horas de reação sob agitação e longe da luz (para precipitação dos taninos com a proteína), a solução foi filtrada em balão volumétrico e completada para o volume de 25 mL com água destilada. Após esse processo, uma alíquota de 1 mL foi retirada e realizada a quantificação pelo método Folin-Ciocalteu. O teor de taninos é calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais. A cor azul produzida pela reação possui uma absorção máxima a 760 nm e é proporcional à taxa de compostos fenólicos. O teor de taninos foi calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais (Amorim et al., 2008).

4.9 Doseamento de Flavonoides

O extrato seco foi diluído em metanol P.A numa concentração de 1mg/mL em balão volumétrico de 25 mL, em triplicata. Para quantificar os flavonoides, uma alíquota de 0,2 mL do extrato diluído foi transferida para tubos de ensaio.

Posteriormente, foi adicionado 0,120 mL de ácido acético glacial, 0,5 mL do reagente cloreto de alumínio (5%, p/v em água destilada) e completado o volume para 10 mL com água destilada em cada tubo. Após a preparação desta solução, agitou-se adequadamente, permanecendo em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente.

Após esse período, a absorbância da mistura foi medida a 420 nm contra um branco preparado com água destilada. O padrão (Rutina) foi preparado em balão volumétrico de 100 mL com metanol e depois reagentes, obtendo-se concentração final de 0,5 mg/mL (Peixoto Sobrinho et al., 2008).

4.10 Saponinas - Teste Qualitativo de Espuma

Para determinar a existência de saponina, foi utilizado a metodologia sugerida por Kloss et al. (2016). Uma alíquota de 2 mL de extrato etanólico foliar foi adicionada com 5 mL de água destilada fervente. A solução foi deixada para esfriar até temperatura de 25 °C e agitou-se vigorosamente por 1 minuto. Logo após foi deixado em repouso por 15 minutos. A presença de saponinas é observada pela formação de espumas persistentes.

4.11 Avaliação da atividade antioxidante - Método DPPH

A atividade sequestradora de radicais livres foi determinada pela capacidade de remoção dos radicais livres do 1,1-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). A representação esquemática da reação está exibida na Figura 7. A atividade sequestradora de radicais foi determinada conforme descrito por Peixoto Sobrinho et al. (2011) com modificações.

A atividade de remoção de radicais livres (AA) será expressa como a porcentagem de inibição utilizando a seguinte relação:

$$AA = [1 - (ABS_{amostra} - ABS_{branco}) / ABS_{cn}] \times 100$$

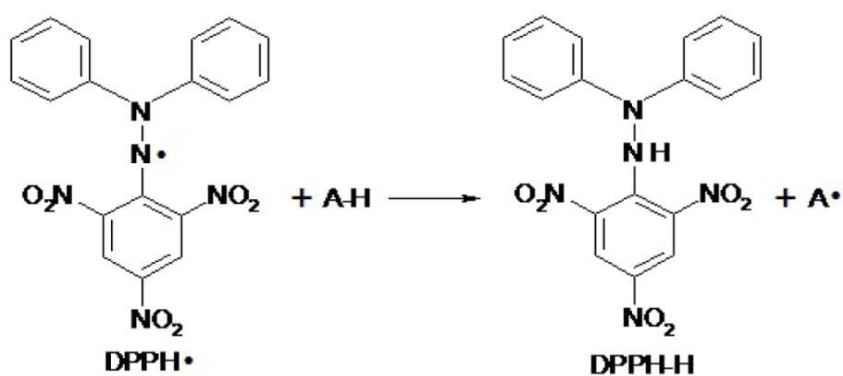
onde AA é a atividade antioxidante, $ABS_{amostra}$ é a absorbância da amostra, ABS_{branco} é a absorbância das concentrações da amostra diluída em metanol e ABS_{cn} é a absorbância do controle negativo.

4.12 Análise estatística

Para os testes de análise estatística foram utilizados o programa de BioEstat

5.0 para a parte fitoquímica do extrato e o programa Graph Prism para avaliar a sua ação antifúngica frente às cepas testadas. Foram utilizados os testes T, teste de normalidade e Análise de Variância com 2 fatores (ANOVA) para interpretação dos dados, considerando $p < 0,05$.

Figura 7 - Reação entre o radical DPPH e um antioxidante através da doação de um átomo de hidrogênio.



Fonte: Oliveira, 2015.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle de qualidade

Para a análise de pureza, foram determinados três parâmetros: umidade, cinzas totais e material estranho, mostrados na Tabela 2. Os resultados são expressos pela média das triplicatas em porcentagem, seguidos do seu desvio padrão.

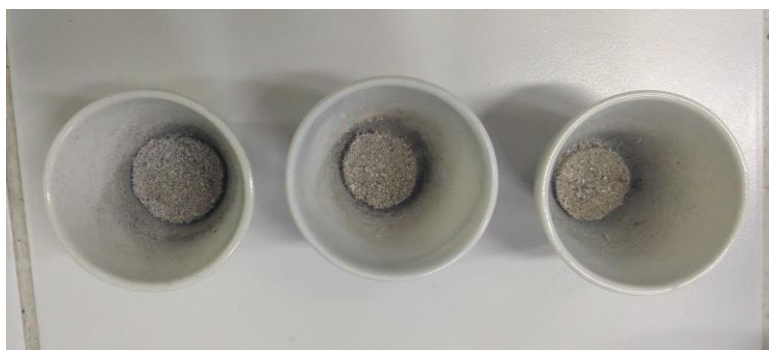
Tabela 2: Teores (%) de água, cinzas totais e material estranho obtidos na amostra vegetal de *A. squamosa* Linn. “CA” indica o critério de aceitação, enquanto “A” indica a situação de “Aprovado”.

Etapas - Controle de Qualidade	Médias $\pm$ DV (%)	CA	Situação
Umidade	0,82% $\pm$ 0,18	<11%	A
Cinzas Totais	4,8% $\pm$ 0,002	<9%	A
Material Estranho	0,5% $\pm$ 0,002	<2%	A

Fonte: A autora (2023).

As médias de umidade e de cinzas totais obtidas foram de 0,82% $\pm$ 0,18 e de 4,80% $\pm$ 0,002, respectivamente, ambos respeitando os parâmetros definidos pela Farmacopeia Brasileira, cujos valores máximos de umidade e cinzas totais são de 11% e 9%, como pode ser observado na Tabela 2 e nas Figuras 8 e 9. Para o material estranho, obtivemos o valor médio de 0,5% $\pm$ 0,002. Esse valor também está de acordo com o máximo de 2% tolerável, conforme consta na Farmacopeia Brasileira. A forma de separação do pó para verificar a matéria estranha pode ser observada na Figura 10.

Figura 8 - Amostras de cinzas totais ao final do processo de incineração do pó.



Fonte: A autora (2023).

Figura 9 - Processo de separação manual de matéria estranha do pó.



Fonte: A autora (2023).

Figura 10 - Teste de umidade do pó realizado na mufla a 600°C, sendo avaliado para diferentes intervalos de tempo.



Fonte: A autora (2023).

5.2 Rendimento dos extratos

Foi observada uma diferença entre os rendimentos dos extratos para cada tipo de método empregado. O cálculo do rendimento foi realizado conforme descrito na Seção 4.4 e seus valores podem ser observados na Tabela 3, sendo perceptíveis as variações no rendimento de cada método e também o método com ultrassom como mais eficiente. Como já mencionado na Seção 3.2, a técnica de ultrassom consiste no uso de frequências para que seja possível a quebra das membranas da célula vegetal e tenha uma melhor extração dos compostos da planta utilizada.

Segundo nossos resultados, esse método foi bastante eficiente para a extração de componentes da casca do caule de *A. squamosa* Linn.

Tabela 3: Rendimento, em porcentagem, dos métodos extrativos adotados.

Método	Espécie vegetal	Rendimento (%)
Maceração	<i>Annona squamosa</i> Linn.	3,96%
Micro-ondas	<i>Annona squamosa</i> Linn.	5,76%
Ultrassom	<i>Annona squamosa</i> Linn.	8,51%

Fonte: A autora (2023).

5.3 Perfil fitoquímico

5.3.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A Tabela 4 mostra os resultados do perfil fitoquímico dos extratos hidroetanólicos de *Annona squamosa* Linn. Todos os métodos extrativos utilizados permitiram identificar a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonoides e naftoquinonas.

Tabela 4: Prospeção fitoquímica realizada pelo método de CCD no extrato de *A. squamosa* Linn. Na tabela, a presença do composto é indicada por “+”.

Método Extrativo	Compostos fenólicos	Taninos	Flavonoides	Naftoquinonas
Maceração	+	+	+	+
Micro-ondas	+	+	+	+
Ultrassom	+	+	+	+

Fonte: A autora (2023).

Os testes de prospecção fitoquímica foram feitos pela técnica de Cromatografia de Camada Delgada (CCD), utilizando sílica-gel como camada adsorvente e um eluente volátil, que interage com a amostra e promove, por efeito de capilaridade, a separação visual dos compostos na placa. Os eluentes foram utilizados de acordo com o composto a ser identificado. A CCD é considerada uma técnica simples, de fácil acesso e execução, além de ter rápida resposta e ser capaz de identificar diferentes classes metabólicas nos extratos vegetais (Costa, 2022).

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos pelo CCD obtidas para os extratos de *Annona squamosa* L, em que as classes metabólicas podem ser identificadas. Identificou-se forte presença de compostos fenólicos, onde foi utilizado o revelador NEU, sendo a presença mais forte do composto fenólico na corrida do meio, onde está localizado o extrato obtido pelo método por ultrassom (UL). Foi possível observar os taninos hidrolisados, com destaque para o extrato obtido pelo método por maceração (MA). Também pode ser vista a presença de flavonoides nos três métodos, com destaque para o extrato adquirido pelo método MA. Houve também a presença de naftoquinonas em vermelho, também com destaque para o extrato adquirido pelo método de MA.

Na literatura, reportou-se a identificação de flavonoides em *A. squamosa* L. (Santos, 2019), porém nas suas folhas. Foi possível a identificação de flavonoides na casca do caule de *A. squamosa* L. em Muflihah (2020), além da presença positiva dos compostos fenólicos e taninos, onde foi utilizado o mesmo eluente e revelador que neste estudo, assim foi possível observar manchas azuladas nas placas de sílica, devido a reação do revelador FeCl_3 e os grupos hidroxilas.

Em Varadharajan (2012) também foi verificado a presença de compostos fenólicos, taninos e flavonoides nas folhas de *a. squamosa*, mostrando que toda a estrutura da planta pode ser aproveitada para o uso medicinal popular e tem grande potencial, se bem explorada, na indústria.

A presença e a quantidade dos metabólicos secundários podem variar em diversidade, a depender do local em que a amostra foi coletada. Os fatores que influenciam o padrão observado incluem sazonalidade, condições climáticas, temperatura, disponibilidade hídrica, altitude, poluição, ataques de microrganismos, nutrientes e qualidade do solo onde a planta está localizada (Gobbo-Neto; Lopes, 2007), com isso é possível entender as diferenças de intensidade de cor entre os estudos que utilizam a técnica. Todos os compostos citados possuem atividade antimicrobiana (Pereira, 2019), sendo ponto de partida para o teste de sua ação antifúngica.

5.3.2 Determinação de fenóis totais, taninos e flavonoides

Os resultados do teor de fenóis totais, taninos e flavonoides nos extratos brutos dos três métodos extrativos podem ser observados na Tabela 5. Os valores

mostrados são referentes às médias das triplicatas junto ao seu desvio padrão, com unidades de mg equivalente de ácido tânico por grama de extrato (mg EAT/g) para fenóis e taninos e mg equivalente de rutinas por grama de extrato (mg ER/g) para os flavonoides.

Tabela 5: Atividade antioxidante e análise fitoquímica do extrato de *Annona squamosa* Linn., com os três métodos extrativos. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey), $p < 0.01$.

Método Extrativo	Fenóis totais (mg EqAT/g)	Taninos (mg EAT/g)	Flavonoides (mg ER/g)	DPPH (CE ₅₀ µg/mL)
Maceração	49,52 ± 0,84 a	22,78 ± 1,68 a	371,34 ± 0,64 a	921,44 ± 11,37
Micro-ondas	45,49 ± 0,25 a	29,08 ± 0,64 b	107,91 ± 3,37 b	871,00 ± 16,11
Ultrassom	67,13 ± 1,76 b	16,95 ± 0,29 c	109,93 ± 0,78 b	1242,23 ± 26,15

Fonte: A autora (2023).

Na literatura se observa diferentes valores para o conteúdo de fenóis totais, taninos e flavonoides de *A. squamosa* (Albergaria; Oliveira; Albuquerque, 2020). É importante ressaltar que grande parte dos resultados obtidos em artigos é proveniente de espécies de países com clima predominantemente seco e árido, o que favorece a biossíntese desses compostos. No estudo de Gowdhami e Ayyasamy (2014), foram encontrados os valores de 13,00 mg/g de fenóis para os extratos metanólicos e 9,28 mg/g de compostos fenolicos nos extratos aquosos das folhas de *A. squamosa*. Os valores encontrados nas cascas do caule deste estudo foram inferiores aos três métodos extrativos cujos resultados estão exibidos na Tabela 5. Esse resultado também corrobora com Albergaria, Oliveira e Albuquerque (2020), que afirmam que a quantidade de compostos nas plantas pode variar de forma significativa, dependendo da parte da planta e do estágio de desenvolvimento da espécie.

Além disso, podemos observar que concentrações inferiores foram encontradas em Al-Nemari et al. (2020) com o uso de água. Para fenóis totais e flavonoides, o estudo obteve 16,9 ± 0,4 mg QE/g (mg por quercetina g) e 98,3 ± 0,4 mg QE/g, respectivamente. Ambos os valores são inferiores aos valores encontrados nos três métodos extrativos mostrados na Tabela 5. Com o uso de metanol, os resultados de Al-Nemari et al. (2020) foram um pouco acima do caso da água em relação aos fenóis totais, apresentando concentração de 282,1 ± 11,2 mg QE/g. Para flavonoides, no entanto, não se pode afirmar o mesmo, sendo possível

observar valores de $1,8 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$.

A diferença de teores observada com relação à literatura pode ser também explicada pela predominância ou ausência de chuvas nas regiões de coleta, como afirmado por Gamble e Burkner (1984). Araújo et al. (2015) mostraram que em climas mais secos o teor dos compostos secundários pode aumentar se comparado a locais com estações mais chuvosas, além de poder atingir também outros compostos secundários existentes na espécie vegetal. A região do município de Altinho, em Pernambuco, onde foram coletadas as amostras, tem predominância de clima seco, com poucas chuvas durante a maior parte do ano, o que pode explicar a quantidade de metabólitos secundários superior da Tabela 5.

5.4 Determinação da atividade antioxidante por DPPH

Existem diferentes técnicas para avaliar a atividade antioxidante de um extrato vegetal. Dentre elas, temos a atividade sequestradora de radical livre DPPH é uma das mais utilizadas em estudos por ser um método rápido, sensível e preciso. Para o material vegetal ser considerado um bom agente antioxidante, é necessário que o valor de CE_{50} (concentração eficaz) seja o menor possível, pois implica que também é menor a concentração necessária da amostra para que 50% da concentração inicial do radical DPPH sejam inibido/consumido (Souza, 2007; Morais-de-Souza et al., 2011).

Os valores obtidos no trabalho estão expressos em médias $\pm$ desvio padrão na quarta coluna da Tabela 5. Os valores obtidos para os extratos pelo método de maceração, micro-ondas e ultrassom foram de $921,44 \pm 11,37 \mu\text{g/mL}$, $871,00 \pm 16,11 \mu\text{g/mL}$ e de $1242,23 \pm 26,15 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em Saravia et al. (2018), por liofilização foram obtidos valores de $1187,04 \pm 12,04 \text{ mg/AG}$, $1211,21 \pm 4,23 \text{ mg/AG}$ e $1517,31 \pm 12,34 \text{ mg/AG}$ para as sementes, casca e polpa de *Annona squamosa* L. Também foram avaliadas por Saravia et al. (2018) as sementes, casca e polpa da fruta de graviola (*Annona muricata*), onde foram obtidos os valores de $1187,04 \pm 12,04 \text{ mg/AG}$, $1211,21 \pm 4,23 \text{ mg/AG}$ e $1931,24 \pm 23,12 \text{ mg/AG}$, respectivamente. A atividade antioxidante abaixo do esperado pode ser resultado do solvente utilizado no estudo. Segundo Nandhakumar e Indumathi (2013), o metanol é mais eficiente do que o etanol para a extração de compostos com atividade antioxidante. Isso é corroborado pelos resultados de Trindade et al. (2020), de forma que o uso de

extratos etanólicos pode ter contribuído com a baixa atividade antioxidante da casca do caule de *A. squamosa* exibida na Tabela 5.

Há também uma relação direta entre os teores de compostos fenólicos e flavonoides com a ação antioxidante dos extratos (Roesler et al., 2007). Como já observado na Tabela 5, destaca-se a alta quantidade de flavonoides encontrados na espécie que abordamos. Para os três métodos de extração utilizados, foram obtidos valores superiores aos encontrados por Nguyen (2020), a saber $82,61 \pm 0,82$ mg QE/g. O valor total de polifenóis (fenóis e taninos) encontrado por Nguyen (2020), no entanto, foi de $242,88 \pm 6,13$ mg GAE/g, indicando atividade antioxidante superior à encontrada nos três métodos para a casca de *A. squamosa* Linn. em nosso estudo. Nesse caso, os autores utilizaram metanol e água destilada como solventes para a extração. Em Shirwaikar e Kumar (2004), por outro lado, foi avaliada a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* Linn. com o método de ABTS (2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), com sequestro de até 99,08%, seguido pelo método de DPPH, com sequestro de 89,77%, ambos utilizando a concentração de extrato de 1000mg/mL, valor muito acima do que foi utilizado em nosso estudo.

A comparação com a literatura mostra, portanto, a sensibilidade dos resultados com o tipo de solvente utilizado para a extração dos compostos e reforça a importância dos polifenóis para caracterização da atividade antioxidante das plantas. É importante pontuar ainda, como faz Araújo et. al (2015) no estudo da casca de *Anadenanthera colubrina*, que existe uma ressalva a respeito da relação entre a ação antioxidante da planta e a presença dos compostos fenólicos. Fatores ambientais podem interferir nas concentrações desses compostos ao longo do ano, de forma que a coleta temporalmente esparsa de amostras pode refletir de maneira limitada o potencial antioxidante do vegetal.

5.5 Determinação da atividade antifúngica

Para avaliar a atividade antifúngica foi utilizada a técnica de microdiluição em placa, descrito no documento de referência do Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST) (Arendrup et al., 2020), para a

avaliação das três espécies de candidas selecionadas: *C. albicans* ATCC¹ 14053, *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. parapsilosis*, nos três tipos diferentes de extração.

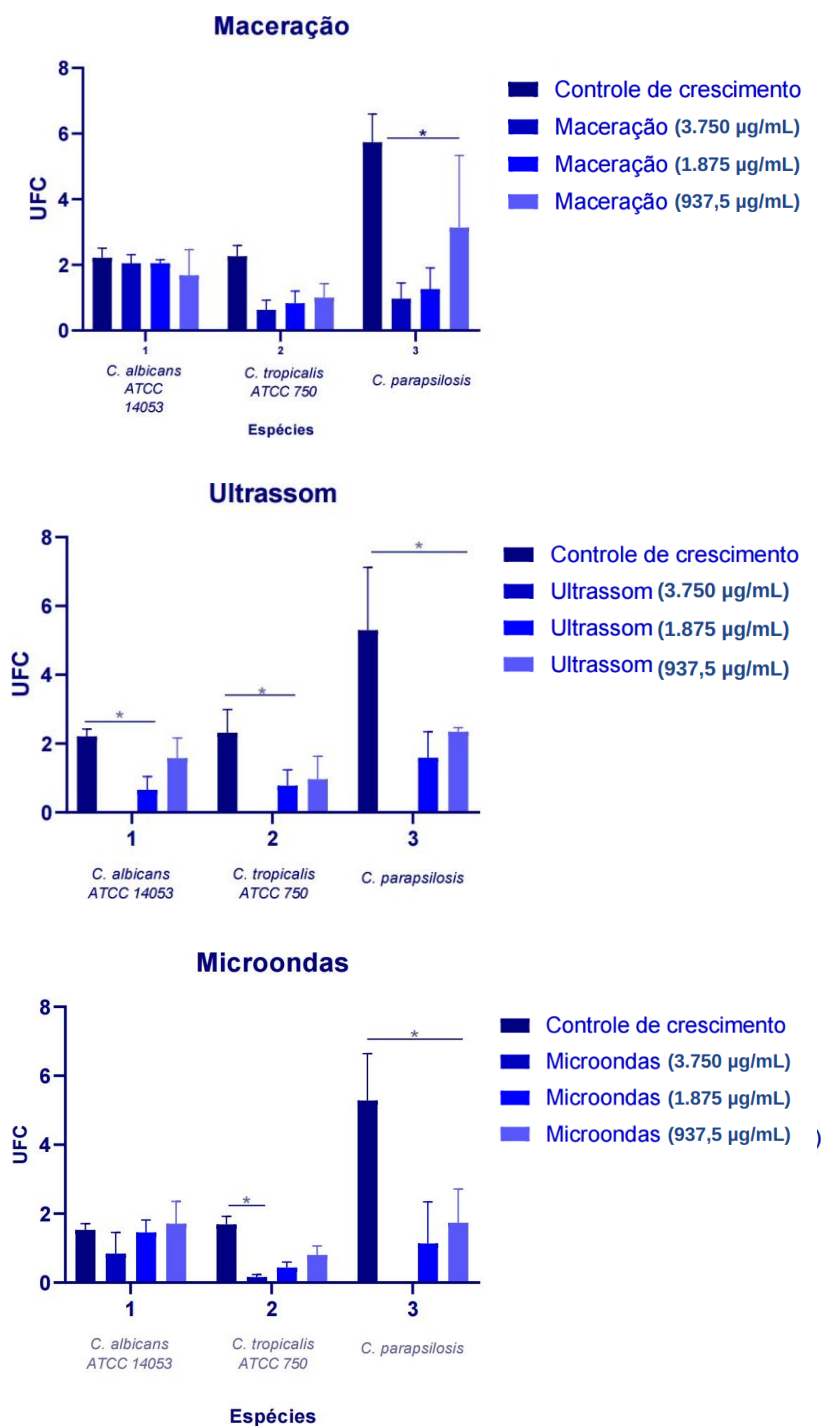
Na Figura 12 podemos observar a análise estatística e a inibição do fungo pelo extrato nas três espécies, sendo a amostra de *C. parapsilosis* inibida pelos extratos obtidos através dos três métodos extrativos. As espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* tiveram os melhores resultados no extrato obtido por microondas e nas três espécies houve uma boa inibição em relação ao controle com o extrato obtido por ultrassom. Foi realizado o teste de ANOVA e concluído que não há diferenças estatísticas nos extratos entre os métodos de extração para a atividade antifúngica.

Segundo Dhanaraj (2020), com o uso das sementes de *A. squamosa* L. na avaliação do potencial microbiológico, incluindo o uso de *C. albicans*, foi observado que a concentração de Proteínas Inativadoras de Ribossomo (RIP) é proporcional à atividade antifúngica. Também foi observado que as saponinas presentes na planta tiveram uma importância maior nos resultados antifúngicos do vegetal. A casca do caule da pinha, parte utilizada nesta dissertação, teve um resultado positivo para a presença de saponinas, o que pode ter contribuído para a ação antifúngica sobre os fungos selecionados. A atividade antimicrobiana é constantemente associada aos compostos secundários, como os fenóis e flavonoides. Para Xie et al. (2015), os flavonoides possuem atividade antifúngica e tem como mecanismo inibir a síntese de ácido nucleicos, o que altera a permeabilidade da membrana e inibe o metabolismo energético dos fungos. Como pode ser observado na Tabela 5, foram encontrados valores elevados de flavonoides nos três tipos de extração, o que pode ter contribuído para a inibição dos fungos do gênero *Candida*.

Outros métodos também são reportados na literatura para a avaliação antifúngica por meio de extratos vegetais. Em Maulana (2023), foram realizados testes com halo de inibição nos extratos aquosos da casca do caule de *A. Squamosa* L. sem, no entanto, ser possível identificar atividade antifúngica. Com o uso da técnica de microdiluição de 96 poços utilizada em nosso estudo, foi possível verificar a atividade antifúngica utilizando o extrato do caule de *A. squamosa* L. Porém, é importante ressaltar a diferença dos solventes utilizados em cada estudo: Maulana (2023) utilizou solvente aquoso e aqui utilizamos o solvente hidroetanólico 80%, que pode ter contribuído para os resultados positivos do nosso trabalho.

¹ ATCC - American Type Culture Collection.

Figura 12 – Avaliação da atividade antifúngica relacionada aos extratos obtidos pelos três métodos.



Fonte: A autora (2023).

A família Annonaceae possui diversas espécies com atividades antifúngicas já relatadas, como é o caso de *Annona cherimola* M., conhecida popularmente como cherimoia, onde se observou uma atividade contra o fungo de interesse agrícola *Fusarium oxysporum* em concentração de 1-16 mg/mL (Méndez-Chávez, 2022). Outra espécie que possui atividade antifúngica comprovada é *Annona muricata* L.,

conhecida popularmente como graviola. Cesar (2021) utilizou seu extrato metanólico de folhas diluído em DMSO e obteve resultados de inibição de crescimento em *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, enquanto o extrato do fruto teve inibição em *C. albicans* e *C. krusei*. Dentre os compostos presentes nessas espécies, podemos destacar alcalóides, saponinas, taninos, terpenóides e antraquinonas nos extratos aquosos e metanólicos (Cesar, 2021). Dentre eles, foi identificada em nossos extratos etanólicos de *A. squamosa* L. a presença de flavonoides, taninos, saponinas e fenóis, alguns dos quais podem ser observados na Tabela 5. O extrato da casca de *A. squamosa* L. também foi diluído em DMSO (20%) para realização dos nossos testes. Todos esses resultados mostram a relevância da família Annonaceae em relação ao seu potencial antifúngico, especialmente pela presença de substâncias com atividades biológicas relevantes como os fenóis, glicosídeos, flavonoides, saponinas e taninos (Simo et al., 2018).

As diferentes espécies de *Candida* se comportam de forma diferente a cada composto, portanto sua resposta e sua adaptação ao hospedeiro também são diferentes nos organismos, assim como seus mecanismos de defesa aos antifúngicos e sua disseminação no hospedeiro (Bitew; Abebaw, 2018; Navarro-Arias et al., 2019; Papon et al., 2013). Assim, pode ser inferido que os microrganismos também apresentem diferentes respostas aos compostos fitoquímicos das plantas, sendo necessário incluir a espécie particular no estudo que objetive extrair informações relacionadas ao gênero (Cesar, 2021).

Segundo Moudgal et al. (2005) a espécie de *C. parapsilosis* já se mostrou resistente a azóis em infecções mais invasivas, quando o paciente estava mais debilitado, como infecções cardiovasculares, assim mostra-se muito importante os resultados positivos com o extrato de pinha em nosso estudo.

Nos três extratos houve ação antifúngica, sendo o extrato obtido pelo método ultrassom obteve uma boa ação antifúngica nas três espécies analisadas, nas seguintes concentrações: 7,5mg/mL; 3,75 mg/mL e 1,87 mg/mL. A espécie de *C. parapsilosis* foi inibida em todos os extratos, assim como *C. tropicalis*, porém *C. albicans* resistente a fluconazol só apresentou inibição no extrato obtido por meio de ultrassom. O extrato pelo método de ultrassom apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais, além de apresentar razoável concentração de flavonoides, como pode ser visto na Tabela 5. Os compostos observados apresentam ação antifúngica já comprovada (Pinto et al., 2002). É importante

ressaltar que nos três métodos extrativos foi quantificado uma grande quantidade de flavonoides.

Segundo Alves et al. (2014), os compostos fenólicos já mostraram ação antifúngica *in vitro* contra espécies de *Candida*, como *C. albicans* e *C. tropicalis*. Essa ação dos compostos fenólicos pode ocorrer através de mecanismos de inativação de sistema enzimáticos do microrganismo envolvido na produção de energia, além de estar ligado a componentes estruturais do fungo (Porte et al., 2001).

6 CONCLUSÃO

Nesta dissertação avaliou-se o potencial antioxidante e antifúngico da casca de uma planta bastante usada para fins medicinais, *Annona squamosa* Linn, popularmente conhecida como pinha. Através da preparação de extratos a partir de sua casca, pretendeu-se identificar e quantificar nas amostras a presença de componentes como fenóis, flavonoides e taninos, que são conhecidos por promoverem ação antioxidante e ação antifúngica. Para este último caso, foi avaliada a eficiência do extrato frente três cepas do gênero *Candida*, que são conhecidas por causar diversas infecções nas mucosas humanas, principalmente a vaginal, que é conhecida pela sua recorrência e por apresentar resistência a medicamentos sintéticos, como o fluconazol.

. Através do método antioxidante por DPPH, indicou-se não haver atividade antioxidante considerável nas amostras para os extratos. No entanto, por meio do teste de microdiluição em poços, a atividade antifúngica dos extratos de *A. squamosa* L. foi satisfatória, especialmente no caso de *C. parapsilosis*. Foi observado comportamento similar entre os três métodos de extração utilizados (maceração, micro-ondas e ultrassom) no que se refere ao rendimento do extrato, em relação ao qual o método assistido por ultrassom apresentou o melhor rendimento. Houve identificação de flavonoides, que são relevantes para ação antifúngica, em níveis compatíveis ou acima aos do reportado na literatura. Esses resultados apoiam o uso medicinal da planta para o tratamento de candidíase, mas ainda é necessário avaliar sua atuação de forma isolada e em conjunto com o medicamento sintético convencional.

Portanto, apesar da incipiente atividade antioxidante detectada para os extratos de *A. squamosa* L., o potencial antifúngico a partir de extratos da sua casca foi evidente, validando o uso popular da planta e reforçando a importância do conhecimento empírico popular como guia para os estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos. Faz-se necessário, no entanto, a realização de novos testes para isolar os compostos secundários e aprofundar o entendimento do mecanismo que baseia sua atividade antifúngica e, dessa forma, permitir o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica segura.

REFERÊNCIAS

- AJALA, O. S.; JUKOV, A.; MA, Chao-Mei. Hepatitis C virus inhibitory hydrolysable tannins from the fruits of *Terminalia chebula*. **Fitoterapia**, v. 99, p. 117-123, 2014.
- ALBERGARIA, E. T.; OLIVEIRA, A. F. M.; ALBUQUERQUE, U. P. The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 12-17, 2020.
- ALBUQUERQUE, U. P. DE; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678–689, 2006.
- ALEXIADES, M. N. **Ethnobotany of the Ese Eja: Plants, health, and change in an Amazonian Society**. 1999. 464 p. Tese (Doutorado em Filosofia) – The City University of New York.
- ALINIAN, S.; RAZMJOO, J.; ZEINALI, H. Flavonoids, anthocynins, phenolics and essential oil produced in cumin (*Cuminum cyminum* L.) accessions under different irrigation regimes. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 49-55, 2016.
- AL-NEMARI, R. et al. GC-MS profiling and assessment of antioxidant, antibacterial, and anticancer properties of extracts of *Annona squamosa* L. leaves. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2020.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- ANDERSON, M. R.; KLINK, K.; COHRSEN A. **Evaluation of vaginal complaints**. **JAMA**, v. 291, p. 1368-79, 2004.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos—Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARAÚJO, J. F.; ALVES, A. A. C. **Instruções técnicas para o cultivo da pinha (*Annona squamosa* L.)**. Salvador: EBDA, 1999.
- ARAÚJO, T. A. de S. et al. Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species? **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 550-556, 2015.
- ARENDRUP, M.C.; MELETIADIS, J.; MOUTON, J. W.; LAGROU, K.; HAMAL, P.; GUINEA, J. Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para leveduras EUCAST – Documento Definitivo E.DEF. 7.3.2, 2020.
- ARNOSO, B. J. M.; COSTA, G. F.; SCHMIDT, B. Bioavailability and classification of phenolic compounds. **Nutrition Brazil**, v. 18, n. 1, p. 39-48, 2019.

AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, M. I. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro. **Acta bot. bras**, v.20, n.1, p.185-194, 2006.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.

BALICK, M. J.; COX, P. A. **Plants, People, and Culture: The Science of Ethnobotany**. Nova Iorque: W H Freeman & Co, 1996.

BARBOSA, A. et al. Candida albicans adaptation on simulated human body fluids under different pH. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 511, 2020.

BENVENUTI, S. et al. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes, and Aronia. **Journal of food science**, v. 69, n.3, p. FCT164-FCT169, 2004.

BERG, A. O. et al. Establishing the cause of genitourinary symptoms in women in a family practice. Comparison of clinical examination and comprehensive microbiology. **JAMA**. v. 251, n.5, p. 620-5. 1984.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.545.

BETTAIEB, I. et al. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of Salvia officinalis L. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33,n. 4, p. 1103-1111, 2011.

BRANCO, J; MIRANDA, I. M.; RODRIGUES, A.G. Candida parapsilosis virulence and antifungal resistance mechanisms: A comprehensive review of key determinants. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 80, 2023.

BRASIL, Coordenação da et al. **Farmacopeia Brasileira: volume 2**. 6ª ed.2019.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução à química de alimentos. In: **Introdução à química de alimentos**. 1989. p. [231]-[231].

BIRCH, A. E. et al. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4502-4507, 2001.

BITEW, A.; ABEBAW, Y. Vulvovaginal candidiasis: species distribution of Candida and their antifungal susceptibility pattern. **BMC women's health**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2018.

BRENNAN, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4841-4844, 2001.

BRITO, H. O. et al. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da Annona squamosa (ATA). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 3, p.

180-184, 2008.

COSTA, U. C. L. **Atividade antioxidante de plantas medicinais utilizadas na prevenção do envelhecimento**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco.

CHAI, L. Y.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews In Microbiology**, London, v. 36, n. 4, p.282-298, 2010.

CHEMAT, F.; CRAVOTTO G. **Microwave assisted extraction for bioactive compounds – Theory and practice**. 1. ed. New York: Springer, 2013, 238 p.

CHEMAT, F. et al. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHEN, Po-Ting et al. Polyhydroxycurcuminoids but not curcumin upregulate neprilysin and can be applied to the prevention of Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29760, 2016.

CHOI, Eun Jeong; KIM, Gun-Hee. O-desmethylangolensin inhibits the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells by inducing apoptosis and promoting cell cycle arrest. **Oncology letters**, v. 6, n. 6, p. 1784-1788, 2013.

ROCHA, W. R. V. da et al. Gênero *Candida*-Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283-e43910414283, 2021.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 1997.

DHANRAJ, S. R.; VENNILA, J. J.; DHANRAJ, M. Pharmacological investigation of ribosome inactivating protein (RIP)-like protein extracted from *Annona squamosa* L. seeds. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 7, p. 2982-2988, 2020.

DIEGUES, A. C. S. **O mito moderno da natureza intocada**. 5. ed. São Paulo: Hucitec; NUPAUB, 2004.

DIEGUES, A. C. A ecologia política das grandes ONGs transnacionais conservacionistas. **São Paulo: Nupaub/Usf**, 2008.

DIEZMANN, S. et al. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: A multigenic analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5624–5635, 2004.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista española de Quimioterapia**, v. 16, n. 4, p. 385-393, 2003.

DONADIO, L. C. **Variedades brasileiras de manga**. UNESP, 2001.

DONG, J. et al. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 1, p. 61-65, 2010.

DUDLEY, G. B.; RICHERT, R.; STIEGMAN, A. E. On the existence of and mechanism for microwave-specific reaction rate enhancement. **Chemical science (Royal Society of Chemistry: 2010)**, v. 6, n. 4, p. 2144–2152, 2015.

ERNST, E. J. M. E.; KLEPSE, M. E.; ERNST, S. A. et al. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease** 33, 75-80, 1999.

FAN, Xin et al. Notable increasing trend in azole non-susceptible *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China (August 2009 to July 2014): molecular epidemiology and clinical azole consumption. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 464, 2017.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian journal of plant physiology**, v. 18, p. 23-36, 2006.

FENG, H. et al. Isolation and purification of condensed tannins from flamboyant tree and their antioxidant and antityrosinase activities. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 173, n. 1, p. 179-192, 2014.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

FERREIRA, D. F. et al. **Processos verdes de extração de produtos naturais de materiais vegetais com ultrassom e micro-ondas**. 2020. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria.

FIRACATIVE, C. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020.

FLORES-JIMÉNEZ, N. T.; ULLOA, J. A.; SILVAS, J. E. U.; RAMÍREZ, J. C. R.; ULLOA, P. R.; ROSALES, P. U. B.; CARRILLO, Y. S.; LEYVA, R. G. Effect of high-intensity ultrasound on the compositional, physicochemical, biochemical, functional and structural properties of canola (*Brassica napus* L.) protein isolate. **Food Research International**, v. 121, p. 947–956, 2019.

FONSECA, S. G. da C. **Farmacotécnica de fitoterápicos**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2005.

FOREZI, L. S. M. et al. **Aqui tem Química: parte IV. Terpenos na Perfumaria**. **Revista Virtual de Química**. v. 14, n.6, p. 1005-1024, 2021.

FRAUSIN, G. et al. Plants of the Annonaceae traditionally used as antimalarials: a review. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 315–337, 2014.

GÁLVEZ, S. L. et al. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International journal of food microbiology**, v. 114, n. 1, p. 124-130, 2007.

GAMBLE, P. E.; BURKE, J. J. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system: I. Alterations in glutathione reductase activity. **Plant Physiology**, v. 76, n. 3, p. 615-621, 1984.

GAMSE, T. **Liquid-liquid extraction and solid-liquid extraction**. Institute of Thermal Process and Environmental Engineering, Graz University of Technology, 2002.

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

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MORA-MONTES, H. M. Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen. **Infection and drug resistance**, v. 13, p. 1673-1689, 2020.

GONÇALVES, A. E. de S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo.

GOVENDER, N. P. et al. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1994-2004, 2016.

GOWDHAMI, M.; SARKAR, B. L.; AYYASAMY, P. M. Screening of phytochemicals and antibacterial activity of *Annona squamosa* extracts. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 3, n. 7, p. 30-39, 2014.

HASLAM, E. **Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action**. 1^a ed., Cambridge: Cambridge University Press, 422 p., 1998.

HEISER JR, C. B. **Ethnobotany and economic botany. Flora of North America, North of Mexico. Volume One: Introduction**. Oxford University Press, New York, p. 199-206, 1993.

HODAEI, M. et al. The effect of water stress on phytochemical accumulation, bioactive compounds and expression of key genes involved in flavonoid biosynthesis in *Chrysanthemum morifolium* L. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 295-304, 2018.

HOSSEINABADI, T. The Medicinal Importance of *Annona squamosa* fruits. **Journal of Exploratory Research in Pharmacology**, v.6, n.1, p1-2, 2021.

HÜMMER, W.; SCHREIER, P. Analysis of proanthocyanidins. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 12, p. 1381-1398, 2008.

HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 1, p. 23-30, 2002.

JAMIU, A. T. et al. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical mycology**, v. 59, n. 1, p. 14-30, 2021.

JESPERSEN, L. et al. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 4-5, p. 441-453, 2005.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 5ª ed. São Paulo: Nacional, p. 913, 1979.

KABERA, J. N.; SEMANA, E.; MUSSA, A. R.; HE, X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377-392, 2014.

KIILL, L. H. P.; COSTA, J. G. da. Biologia floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. **Ciência Rural**, v. 33, p. 851-856, 2003.

KLEPACKA, J.; GUJSKA, E.; MICHALAK, J. Phenolic compounds as cultivar-and variety-distinguishing factors in some plant products. **Plant foods for human nutrition**, v. 66, p. 64-69, 2011.

KLOSS, L. C.; ALBINO, A. M.; SOUZA, R. G. de. et al. Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. (PIPERACEAE). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 3 n. 2, p. 118-128, 2016.

KUMAR, M. et al. Custard apple (*Annona squamosa* L.) leaves: nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting biological activities. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p. 614, 2021.

KUMAR, Y. Evaluation of antidiabetic and antioxidant potential of custard apple (*Annona squamosa*) Leaf extracts: A compositional study. **International Journal of Chemical Studies**, v. 7, p. 889-895, 2019.

LAM, J. M. Opportunistic fungal infection in children and management. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 30, n. 4, p. 514-519, 2018.

LAFHEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1073-1081, 2005.

LEE, D. Y. et al. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Terminalia chebula* Retz and their α -glucosidase inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 137, p. 109-116, 2017.

LEE, Y. et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

LEITE, D. O. D. et al. Chemical profile and evaluation of the antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Annona squamosa* L.(Annonaceae) extracts. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2343, 2021.

LEÓN, J. **Botánica de los cultivos tropicales**. Bib. Orton IICA/CATIE, 1987.

LI, Ying; KUNZ, Werner; CHEMAT, Farid. From Petroleum to Bio-Based Solvents: From Academia to Industry. **Plant Based “Green Chemistry 2.0” Moving from Evolutionary to Revolutionary**, p. 51-87, 2019.

LUCA, S. V. et al. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 4, p. 626-659, 2020.

LUQUE-GARCIA, J. L.; CASTRO, M. D. L. de. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MABBERLEY, D. J. **The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. **Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences**. Lea & Febiger: Philadelphia, 1993.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 736p, 2007.

MEIRA, C. S. et al. Chemical composition of essential oils from *Annona vepretorum* Mart. and *Annona squamosa* L.(Annonaceae) leaves and their antimalarial and trypanocidal activities. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 2, p. 160-168, 2015.

MÉNDEZ-CHÁVEZ, M. et al. Antifungal activity screening of fractions from *Annona cherimola* Mill. leaf extract against *Fusarium oxysporum*. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 6, p. 330, 2022.

MELETIADIS, J. et al. In vitro antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates with the EUCAST methodology, a new method for ECOFF determination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 10.1128/aac. 02372-16, 2017.

MELO, E. de A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira deCiência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MESSIAS, M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG,Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 76–104, 2015.

MOGHADAMTOUSI, S. et al. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *International Journal*

of Molecular Sciences, v. 16, n. 7, p. 15625–15658, 10 jul. 2015.

MORAIS-DE-SOUZA, R. A. et al. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 2, 2011.

MOREIRA, A. C. P. et al. Chemical composition and antifungal activity of Hyptis suaveolens (L.) poit leaves essential oil against Aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 28-33, 2010.

MOUDGAL, V. et al. Multiechinocandin-and multiazole-resistant Candida parapsilosis isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 767-769, 2005.

MUFLIAH, C. H.; HARYOTO, H.; INDRAYUDHA, P. Cytotoxic assay of semipolar fraction of ethanolic extract from sugar apple (Annona Squamosa L.) stem bark on T47D Cells. **Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia**, v. 17, n. 2, p. 148-156, 2020.

NANDHAKUMAR, E.; INDUMATHI, P. In vitro antioxidant activities of methanol and aqueous extract of Annona squamosa (L.) fruit pulp. **Journal of acupuncture and meridian studies**, v. 6, n. 3, p. 142-148, 2013.

NAVARRETE, A.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. A predictive approach in modeling and simulation of heat and mass transfer during microwave heating. Application to SFME of essential oil of Lavandin Super. **Chemical Engineering Science**, v. 68, n.1, p. 192-201, 2012.

NAVARRO-ARIAS, M. J. et al. Differential recognition of Candida tropicalis, Candida guilliermondii, Candida krusei, and Candida auris by human innate immune cells. **Infection and drug resistance**, p. 783-794, 2019.

NETEA, M. G.; MARÓDI, L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of Candida species. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 9, p. 346-353, 2010.

NGUYEN, M. T. et al. Assessment of preliminary phytochemical screening, polyphenol content, flavonoid content, and antioxidant activity of custard apple leaves (Annona squamosa Linn.). In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, 2020. p. 062012.

NIEDZWIECKI, A. et al. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. **Nutrients**, v. 8, n. 9, p. 552, 2016.

NISHIMOTO, A. T.; SHARMA, C.; ROGERS, P. D. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus Candida albicans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 2, p. 257-270, 2020.

OJALA, T. et al. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 73, p. 299-305, 2000

OLIVEIRA, G. L. S. et al. Determination in vitro of the antioxidant capacity of natural

products by the DPPH. method: review study. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, R. D. R. D. E.; MAFFEI, C. M. L.; MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. **Revista da Associação Médica Brasileira** (1992), v. 47, n. 3, p. 231–235, 2001.

PANDEY, N.; BRAVE, D. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Annona squamosa* Linn Bark. **Int J Biomed Pharmaceut Sci**, v. 2, p. 1692-1697, 2011.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 2016.

PAPON, N. et al. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003550, 2013.

PANCHE, A.; DIWAN, A.; CHANDRA, S. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 47, p 1-15, 2016.

PARAMYTHIOTOU, E. et al. Invasive Fungal Infections in the ICU: How to Approach, How to Treat. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1085–1119, 2014.

PAULINO-NETO, H. F. Polinização por besouros. **Biologia da polinização**, p.259-275, 2014.

PAVIA, D. L. et al. **A small scale approach to organic laboratory techniques**. 4^o ed. Boston: Cengage Learning, 2015.

PEREIRA, D. A.; ARAÚJO, M. N. P.; ARRUDA, H. S.; MOLINA, G.; PASTORE, G. M. Phytochemicals and biological activities of mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.): A review. **Food Research International**, v. 126, p. 1-19, 2019.

PEREIRA, A. C.; SILVA, G. Z. da; CARBONARI, M. E. E. **Sustentabilidade, responsabilidade social e meio ambiente**. Saraiva Educação SA, 2017.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. P. et al. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 586-591, 2012.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. P. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, n. 44, v.4, p.683-689. 2008.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. P. et al. Phenolic content and antioxidant capacity of

four *Cnidioscolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 20, 2011.

PFALLER, M. A. et al. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2571-2581, 2013.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D.J. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2846-2856, 2012.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366-1377, 2010.

PFALLER, M. A. et al. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2019. p. S79-S94.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PINELO, M. et al. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 267-273, 2004.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.

QUÍLEZ, A. M. et al. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, p. 244-270, 2018.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 53-60, 2007.

RAMOS, P. H.; Cultura da Graviola (*Annona muricata*, L.), p. 127-57. In: DONÁDIO, L. C. Fruticultura Tropical. Ed. Martins, A. B. G. & VALENTE, I. P. Jaboticabal – SP, 1992.

ROSA, C. da; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da

fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311–318, 2011.

SÁ-FILHO, G. F. de et al. Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e o potencial terapêutico dos metabólitos secundários: uma revisão. **Research, society and development**, v. 10, n. 13, p. e140101321096-e140101321096, 2021.

SAFIRA, A. et al. A Review of an Important Plants: *Annona squamosa* Leaf. **Pharmacognosy journal**, v. 14, n. 2, p. 456–463, 2022.

SANTIAGO, M. C. P. A. et al. (2020). Analysis and characterization of condensed tannins by liquid chromatography. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p.61446-61462, 2020.

SANTOS, L. G. P. Avaliação da toxicidade do extrato de folhas de *Annona squamosa* para *Aedes aegypti*, *Nasutitermes corniger* e *Sitophilus zeamais*. 2019. 51 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas)** - Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

SARAVIA, M. et al. Evaluation of total phenolic compounds and antioxidant activity in amazon fruit. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 649-654, 2018.

SARKAR, S. K.; HOWARTH, R. E. Specificity of the vanillin test for flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 317-320, 1976.

SAUQUET, H. et al. Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based on multiple data sets: implications for character evolution. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 142, n. 2, p. 125-186, 2003.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 386p. São Paulo: Manole, 2002.

SHIH, C. H. et al. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. **Planta**, v. 228, n. 6, p. 1043-1054, 2008.

SHIRWAIKAR, A.; RAJENDRAN, K.; KUMAR, C. D. In vitro antioxidant studies of *Annona squamosa* Linn. leaves. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n. 8, p. 803-807, 2004.

SILVA, M. G. C. et al. Candida species distribution and fluconazole susceptibility of blood isolates at a regional hospital in Passo Fundo, RS, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, p. 158-161, 2015.

SIMÃO, A. M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. 1977. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Universidade de São Paulo.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, 1102p.

SLUIS, V. D. A. A. et al. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3606-3613, 2001.

SOBEL, J. D. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 152, n. 7, p.924-935, 1985.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 289-32, 2015.

SOUZA, E. L. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

SOUZA, J. da S. et al. A incidência de doenças causada por leveduras *Candida albicans*, *glabrata* e *tropicalis*: The incidence of diseases caused by yeast *Candida albicans*, *glabrata* and *tropicalis*. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 11, p. 76325-76338, 2022.

SOUZA, S. M de. Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados. Florianópolis, 2005. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SUZUKI, T.; MIYAMAE, Y.; ISHIDA, I. Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, n. 1, p.161-167, 1991.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. HPLC– DAD– ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4748-4760, 2001.

TRINDADE, M. L. M. da et al. Caracterización química, actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto de pulpa de manzana de azúcar (*Annona squamosa* L.). **Revista Chilena de Nutrición**, v. 47, n. 2, p. 281-285, 2020.

TSABANG, N. et al. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 171–180, jan. 2012.

TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* pathogenic species complex. **ColdSpring Harbor Perspectives in Medicine**, Dublin, v. 4, n. 9, p. 019778, 2014.

VARADHARAJAN, V; JANARTHANAN, U. K; KRISHNAMURTHY, Vi. Physicochemical, phytochemical screening and profiling of secondary metabolites of *Annona squamosa* leaf extract. **World Journal of pharmaceutical research**, v. 1, n. 4, p. 1143-1164, 2012.

VERMA, R. S. et al. Characterization of the leaf essential oil composition of *Annona squamosa* L. from foothills of north India. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 5, n. 270, p. 2167-0412, 2016.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303-313, 2001.

VINSON, J. A. et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5315-5321, 2001.

VOHORA, S.; KUMAR, I.; NAQVI, S. Phytochemical, pharmacological, antibacterial and anti-ovulatory studies on annona squamosa. **Planta medica**, v. 28, n. 05, p. 97-100, 1975.

WANG, S. Y.; ZHENG, W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4977-4982, 2001.

WATANABE, M. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 839-845, 1998.

WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2173, 2017.

WONG, K. C.; KHOO, K. H. Volatile components of Malaysian *Annona* fruits. **Flavour and fragrance journal**, v. 8, n. 1, p. 5-10, 1993.

WONGS-AREE, C.; NOICHINDA, S. Sugar apple (*Annona squamosa* L.) and atemoya (*A. cherimola* Mill. × *A. squamosa* L.). **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**, p. 399-427e, 2011.

XIE, Y. et al. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current medicinal chemistry**, v. 22, n. 1, p. 132-149, 2015.

YANG, K. et al. Hydrolysis enhances bioavailability of proanthocyanidin-derived metabolites and improves β -cell function in glucose intolerant rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 8, p. 850-859, 2015.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

ZARIN, M. A. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, n. 2, p. 65-75, 2016.

ZHANG, Q.; TAO, L.; YUE, H. et al. Regulation of filamentation in the human fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 3, p. 528-545, 2016.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.