

Universidade Federal de Uberlândia

LETÍCIA CAETANO ZAIDEN

**Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*
(Araticum) na proliferação de *T. gondii* em células RAW 264.7**

Uberlândia – MG

2019

LETÍCIA CAETANO ZAIDEN

**Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*
(Araticum) na proliferação de *T. gondii* em células RAW 264.7**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária, Curso de Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC 2, GMV054) e obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: Profa. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves

Uberlândia – MG

2019

LETÍCIA CAETANO Zaiden

**Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*
(Araticum) na proliferação de *T. gondii* em células RAW 264.7**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Uberlândia (MG), pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 16 de dezembro de 2019

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves
Orientadora

Profa. Dra. Letícia de Souza Castro Filice
Membro

Dra. Danielle Reis Napolitano
Membro

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu irmão, por toda força e apoio durante minha graduação e por me ajudarem a chegar até aqui.

Aos meus amigos, em especial à Julia, pelo companheirismo durante os experimentos e durante a escrita deste trabalho, e ao Guilherme, pelo incentivo diário.

À professora Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves pela orientação e oportunidade de realizar este projeto.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Resumo

Annona crassiflora é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro que produz o fruto araticum. Essa planta contém vários compostos bioativos com atividades biológicas, dentre elas farmacológicas, bem descritas na literatura, por exemplo, ações antimicrobianas e antiparasitárias. Assim, neste estudo, foi utilizado o extrato aquoso das folhas de *A. crassiflora* para investigarmos o efeito do extrato aquoso de *Annona crassiflora* (EAAC) na proliferação do parasito *Toxoplasma gondii* em células da linhagem *macrophage – like RAW 264.7*. Inicialmente, possível efeito de citotoxicidade do EAAC foi avaliado pelo ensaio do MTT (tetrazólio de metiltiazol), utilizando células RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações do extrato (0,487 a 1000 µg/mL). Em seguida, avaliamos o efeito do EAAC sobre a proliferação de *T. gondii*, clone 2F1, em células RAW 264.7. Após 18 horas a infecção, as células foram lisadas e os parasitos intracelulares foram quantificados por meio da reação colorimétrica utilizando-se o cromógeno CPRG. A clone 2F1 expressa a enzima β-galactosidase; esta converte o substrato CPRG de coloração amarelo-laranja em galactose e o cromóforo vermelho clorofenol, desenvolvendo-se uma coloração vermelho-escuro no meio. A intensidade de cor corresponde, portanto, à atividade enzimática da β-galactosidase e constitui uma medida indireta para a determinação quantitativa dos parasitos. Os resultados obtidos mostraram que EAAC não foi citotóxico em células RAW 264.7; EAAC não reduziu de modo estatisticamente significativo a proliferação do parasito em células RAW 264.7, embora nas maiores concentrações, 500 e 1000 µg/mL, houve uma tendência a essa redução.

Palavras-chave: *Annona crassiflora*; células RAW 264.7; *Toxoplasma gondii*.

Abstract

Annona crassiflora is a native species of the Brazilian Cerrado that produces the araticum fruit. This plant contains several bioactive compounds with biological activities, including pharmacological, well described in literature, for example, antimicrobial and antiparasitic actions. So, in this study, the aqueous extract from *A. crassiflora* leaves was used to research the effect of *Annona crassiflora* aqueous extract (EAAC) on *Toxoplasma gondii* parasite proliferation in macrophage lineage cells – like RAW 264.7. Initially, the possible cytotoxicity effect of EAAC was assessed by the MTT (methylthiazole tetrazolium) test using RAW 264.7 cells treated with different extract concentrations (0.487 to 1.000 µg / mL). Then we evaluate the effect of EAAC on the *T. gondii* proliferation, clone 2F1, in RAW 264.7 cells. After 18 hours of infection, cells were lysed and intracellular parasites were quantified by colorimetric reaction using the CPRG chromogen. The 2F1 clone expresses the β-galactosidase enzyme; it converts the yellow-orange CPRG substrate to galactose and the red chlorophenol chromophore, developing a dark red color in the medium. The color intensity, therefore, corresponds to the enzymatic activity of β-galactosidase and it is an indirect measure to the quantitative determination of the number of parasites. The obtained results showed that EAAC were not cytotoxic to RAW 264.7 cells; EAAC did not reduced parasite proliferation in RAW 264.7 cells in a statistically significant way, although higher concentrations, 500 and 1000 µg / mL, there was a tendency for this reduction.

Key-words: *Annona crassiflora*; RAW 264.7 cells; *Toxoplasma gondii*.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	Considerações gerais sobre <i>Annona crassiflora</i> , seus compostos.....	11
2.2	Atividades biológicas de <i>Annona crassiflora</i>	12
2.2.1	Ação antibacterina, antifúngica e antiprotozoária.....	12
2.2.2	Ação antidiarreica.....	14
2.2.3	Ação anti-inflamatória.....	15
2.2.4	Ação antimalárica e larvicida.....	16
2.2.5	Ação antineoplásica e antimutagênica.....	17
2.2.6	Ação antinociceptiva.....	19
2.2.7	Ação hepatoprotetora.....	20
2.2.8	Ação inibitória de contração muscular.....	20
2.2.9	Ação moluscocida e nematicida.....	21
2.3	<i>T. gondii</i>	21
3	JUSTIFICATIVA.....	24
4	OBJETIVOS.....	26
4.1	Objetivo geral.....	26
4.2	Objetivos específicos.....	26
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1	Local de execução.....	26
5.2	Material vegetal.....	26
5.3	Obtenção do extrato aquoso.....	27
5.4	Cultura de células da linhagem <i>macrophage-like RAW 264.7</i>	27
5.5	Parasitas.....	28
5.6	Ensaio de citotoxicidade do extrato aquoso de <i>Annona crassiflora</i> em células RAW 264.7.....	29
5.7	Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células RAW 264.7.....	29
5.8	Análise estatística.....	31
6	Resultados.....	31

6.1 Avaliação do efeito do extrato da <i>Annona crassiflora</i> sobre a viabilidade de células RAW 264.7.....	31
6.2 Proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células RAW 264.7.....	34
7 Discussão	40
8 Conclusão.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são espécies vegetais, cultivadas ou não, utilizadas com fins terapêuticos e/ou profiláticos (ANVISA, 2018).

O uso popular de plantas medicinais incentiva pesquisas científicas que buscam, a partir de uso de derivados vegetais dessas espécies, identificar compostos bioativos com potencial ação farmacológica / terapêutica na medicina humana e na medicina veterinária.

Annona crassiflora, é uma árvore encontrada no Cerrado brasileiro, a qual contém compostos naturais bioativos, aos quais foram atribuídos efeitos antiprotozoário (MESQUITA et al., 2005), antimicrobianos (SILVA et al., 2014), anti-inflamatório (MOURA et al., 2019), antifúngico (DE ANDRADE SILVA et al., 2014), larvicida (RODRIGUES et al., 2006), e até mesmo antineoplásico (SILVA et al., 2018). Dentre esses compostos, foram identificados: ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido quínico, ácido ferúlico, xantoxilina e rutina (BAILÃO et al., 2015) e o ácido clorogênico e catequina (ARRUDA et al., 2018).

Embora na literatura atual, constem trabalhos que investigaram efeitos antiprotozoários em derivados vegetais de *A. crassiflora*, ainda há dados disponíveis sobre a potencial ação da referida espécie na infecção pelo parasita *T. gondii*.

O protozoário *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório, sendo considerado zoonótico. Ele infecta animais de sangue quente, incluindo os seres humanos, mas a maioria das espécies animais são hospedeiros intermediários, sendo apenas os gatos domésticos e outros felídeos os hospedeiros definitivos, nos quais ocorre a reprodução sexuada e liberação de milhões de oocistos nas fezes. Esse parasito apresenta como estágios parasitários os oocistos esporulados, taquizoítos e bradizoítos. A infecção com *T. gondii* causa grande impacto na saúde dos seres humanos e de outros animais, causando alterações comportamentais, doenças oftálmicas, pulmonares e reprodutoras, variando a intensidade de acordo com a espécie acometida (DRINIC et al., 2017; SWIERZY et al., 2017).

Atualmente, os medicamentos mais utilizados no tratamento da toxoplasmose são a combinação de pirimetamina e sulfadiazina associada ao ácido fólico, azitromicina, claritromicina, espiramicina, atovaquona, dapsona e cotrimoxazol (trimetoprim-sulfametoxazol). De modo geral, essas drogas são

ativas contra as formas taquizoítas de *T. gondii*, as quais são altamente invasivas e de replicação rápida, mas não atuam sobre bradizoítos, formas de multiplicação lenta, encontradas dentro dos cistos teciduais e cuja formação está associada ao início da infecção crônica. Portanto, os fármacos disponíveis até o presente momento, embora reduzam a proliferação do parasito e os danos teciduais causados por essa infecção, não eliminam o parasito do organismo hospedeiro. Além disto, os esquemas terapêuticos atuais causam numerosos e importantes efeitos adversos. Outro aspecto importante, é o possível surgimento de cepas de *T. gondii* resistentes aos diferentes fármacos disponíveis, principalmente decorrente de esquemas terapêuticos prolongados (MONTAZERI et al., 2018; ANTICZAK et al., 2016).

Derivados vegetais parecem ser promissoras fontes de substâncias ativas contra protozoários, dentre eles, *T. gondii*. Estudos demonstraram que o chá de *Artemisia annua*, contendo artemisinina, possui atividade antiparasitária sobre o *Plasmodium falciparum*, causador da malária (OMAR et al., 2013 *apud* ANTICZAK et al., 2016) e atividade semelhante foi demonstrada em estudos *in vitro* com *T. gondii* (DE OLIVEIRA et al., 2009 *apud* ANTICZAK et al., 2016). Extratos das espécies vegetais *Sophora flavescens* e *Zingiber officinale* também demonstraram alta seletividade contra a cepa RH de *T. gondii* (DE OLIVEIRA et al., 2009 *apud* ANTICZAK et al., 2016).

Diante do exposto acima, são de grande relevância pesquisas que visem investigar novos compostos bioativos contra o parasito *T. gondii*, com a perspectiva de se encontrar novas formas de tratamento para a toxoplasmose humana e em outras espécies de animais. Neste sentido, o extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*, espécie à qual já foram atribuídas atividades antiparasitárias, incluindo, protozoários, pode ser uma fonte de substâncias ativas contra *T. gondii*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre a *Annona crassiflora* e seus compostos

O Cerrado, um tipo de savana presente na América do Sul, é fonte de mais de 10.000 espécies de plantas que contêm produtos naturais para fitoterapia (JÚNIOR, 2005 *apud*. RIBEIRO et al., 2018) dentre elas, *Annona crassiflora*.

Annona crassiflora Mart é uma árvore de 4 a 8 metros de altura que produz uma fruta redonda a oval, conhecida como araticum (VIEIRA, 2006 *apud* BAILÃO et al., 2015).

Foram encontrados vários compostos bioativos em frutos do cerrado brasileiro, incluindo em frutos de *Annona crassiflora*, na qual identificaram moléculas importantes, como ácido ascórbico (Vieira et al., 2006 *apud* Bailão et al., 2015), ácido cafeico (CORREIA et al., 2012 *apud* BAILÃO et al., 2015), ácido quínico (SILVA et al., 2011 *apud* BAILÃO et al., 2015), ácido ferúlico (VONBULOW; CARMONA, 1994 *apud* BAILÃO et al. 2015), xantoxilina (ONO et al., 2007 *apud* BAILÃO et al., 2015) e rutina (COSTA et al., 2010 *apud* BAILÃO et al., 2015).

Na casca do fruto da *A. crassiflora* foram identificados, a partir de seu extrato etanólico, compostos antioxidantes, tais como, ácido clorogênico, (epi) catequina, procianidinas, cafeoil-hexosídeos, quercetina-glicosídeos e kaempferol, e compostos bioativos com atividades de α -amilase, α -glicosidase e inibição das atividades de glicação. As frações acetato de etila e n- butanol, por exemplo, apresentaram, respectivamente, maior capacidade antioxidante e atividades inibitórias contra α -amilase, α -glucosidase e glicação, e menor citotoxicidade, ao se comparar com as outras frações do extrato etanólico bruto. Com esses resultados pode-se observar a presença de compostos com propriedades para bloquear enzimas digestivas de carboidratos e formação de produtos de glicação (JUSTINO et al, 2016).

Foi demonstrada a recuperação de compostos fenólicos e as atividades antioxidantes da casca do araticum utilizando a ultrassonografia de alta intensidade, sendo identificados e quantificados 14 compostos fenólicos nos extratos da casca do araticum. Os compostos encontrados em maior

concentração foram epicatequina, rutina, o ácido clorogênico, a catequina e o ácido ferúlico. Além disso, 142 compostos fitoquímicos foram identificados no mesmo extrato. Foi possível observar que a intensificação do processo de ultrassonografia teve um efeito positivo na recuperação dos compostos fenólicos e nos valores das atividades antioxidantes da casca de araticum (ARRUDA et al., 2018).

Arruda et al. (2018) também determinou a composição fenólica (ligada, livre, esterificada, glicosilada e insolúvel) na polpa, casca e semente da *Annona crassiflora*, tendo a casca apresentando o maior teor fenólico. O teor total de fenólicos (correspondente a soma de glicosilados livres, esterificados e fenólicos de ligação insolúvel) de partes de frutos do araticum seguiu ordem decrescente da casca, polpa e semente. A semente apresentou ácido cafeico, catequina e epicatequina como seus principais compostos fenólicos, e a polpa e a casca do fruto tiveram como principais compostos a catequina e a epicatequina. Esses compostos estavam predominantemente nas formas insolúveis e esterificadas em todas as partes do fruto do araticum. Além disso, as frações fenólicas mostraram atividade de eliminação de radicais DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) ou ABTS, e peróxido.

2.2 Atividades biológicas da *Annona crassiflora*

2.2.1 Ação antibacteriana, antifúngica e antiprotozoária

Foi feita a avaliação *in vitro* de trinta e um extratos de plantas do Cerrado brasileiro, incluindo *Annona crassiflora*, para determinar suas atividades antiprotozoárias contra promastigotas de *Leishmania donovani* e formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados relacionados a *Annona crassiflora* mostraram que seu extrato etanólico foi eficiente contra os dois parasitos, inferindo que ele seja um potencial tratamento antiprotozoário (MESQUITA et al., 2005).

Espécies brasileiras da família Annonaceae, foram avaliadas em relação à atividade antibacteriana, incluindo a *Annona crassiflora*, em que se obtiveram extratos de hexano e extrato etanólico dessa espécie. Os microorganismos utilizados foram *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, não sendo relatadas

atividades antibacterianas pelos extratos de *A. crassiflora*, apenas demonstrou a presença de flavonoides em seus extratos ativos. Dessa forma, podemos observar que não houve muitas informações sobre *Annona crassiflora* (TAKAHASHI et al., 2006).

Em um trabalho em que se realizou a avaliação da fisiologia do crescimento e da produção de lipases do fungo *Lichtheimia ramosa*, foram utilizados como substratos alguns resíduos da cultura do cerrado, como bocaiúva (*Acrocomia aculeata*), pequi (*Caryocar brasiliense*), guavira (*Campomanesia pubescens*), araticum (*Annona crassiflora*) e seriguela (*Spondias purpurea*). Esses resíduos foram triturados, homogeneizados, ajustados para pH 5,0 e umidade de 60%, esterilizados e acondicionados em biorreatores (do tipo bandeja plástica) antes da inoculação com 10% (p / v) de meio de pré-cultura de *L. ramosa*. Os cultivos foram realizados em incubadora bacteriológica a 30 ° C por 40 dias, tendo as amostras coletadas a cada 5 dias para avaliar os teores de fungos e bactérias, composição centesimal e atividade lipásica. A contagem máxima de fungos foi observada entre 25 e 35 dias. *L. ramosa* atingiu a fase estacionária próximos aos 40 dias em todos os substratos. O crescimento protéico foi obtido para todos os meios. A produção de lipase foi observada em todos os meios cultivados, exceto nos resíduos de pequi que apresentaram atividade de lipase decrescente. Os substratos araticum (0,58 U / g) apresentaram a segunda maior produção, podendo então observar a participação da *Annona crassiflora* com resultados positivos relativos ao objetivo do trabalho (DE ANDRADE SILVA et al., 2014).

A atividade antibacteriana do extrato da espécie *Annona crassiflora* também foi avaliada em modelos *in vitro* contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina, através dos métodos de difusão em ágar e microdiluição de caldo. Os extratos hidroalcoólicos de diferentes partes (casca, polpa, caule e folhas) de *Annona crassiflora* inibiram o crescimento dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina em ambos os métodos utilizados, entretanto, sua semente não apresentou atividade antimicrobiana. Dentre os compostos presentes nesses extratos estavam incluídas substâncias alcalóides flavonóides, taninos e saponinas (SILVA JUNIOR et al., 2014).

Em um primeiro relatório sobre isolamento de flavóides de *Annona crassiflora*, foi relatado o isolamento e caracterização inequívoca de glicosídeos

flavonóides, através da ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D, espectrometria de massa com ionização electrospray (ESI-MS), espectroscopia UV / Vis e análise óptica de rotação. Os flavonóides isolados foram: quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6) -O- α -L-arabinosídeo (1), conhecido como peltatosídeo, kaempferol-3-O- β -D-galactopiranosídeo (2), quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (3), quercetina-3-O- β -L-arabinopiranosídeo (4) e a (-) -epicatequina (5), provenientes da porção hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas dessa árvore nativa do Cerrado Brasileiro. No ensaio antimicrobiano, o extrato etanólico foliar, fração hidroalcoólica e (-)-epicatechin (5) expressaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, bem como contra *Candida albicans*. Glicosídeos flavonóides e (-) epicatequina, testada a uma concentração de 20 mg/mL, expressou atividade antioxidante coloração com difenil-2,2'-picrilhidrazil (DPPH) e branqueamento com β caroteno em ensaios de cromatografia em camada fina. Compostos 1, 2, 3, 4 e 5 demonstraram inibição de 63,4%, 57,3%, 68,5%, 60,7% e 52,4%, respectivamente, no ensaio DPPH espectrofotométrico a uma concentração de 500 mg/ml (LAGE et al., 2014).

Estudos realizados por Ribeiro et al. (2018) avaliaram os efeitos antimicrobianos de várias plantas do Cerrado brasileiro contra *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*, através do método de difusão em ágar-disco, realizado com triplicata. Uma das plantas foi *Annona crassiflora*, em que se utilizou seus extratos aquoso e etanólico, tendo o extrato etanólico apresentando antagonismo sobre todas as estirpes de *Staphylococcus* spp.

2.2.2 Ação antidiarreica

Foi feito uma investigação sobre o efeito antidiarreico do extrato aquoso de folhas de *Annona crassiflora* (AEAC) usando como modelo diarreia induzida por óleo de mamona, além de investigar seu efeito na motilidade gastrointestinal e no acúmulo de líquido intestinal induzida pela administração de óleo de mamona (enteropooling). Alguns metabólitos secundários do extrato foram identificados e analisados. Vinte e oito compostos foram identificados no AEAC, incluindo flavonóides, como os glicosilados com hexose, desoxihexose e pentose; alcalóides (não foi possível identificar a estrutura com seus constituintes exatos); alguns flavan-3-ol como catequina e epicatequina;

proantocianidinas (taninos condensados) e duas séries poliméricas constituídas principalmente por unidades de procianidina, tendo a série polimérica A, composta apenas de monômeros de procianidina até sete unidades, e a série polimérica B, que além das procianidinas, teve uma unidade de prodelfinidina. Com os resultados obtidos observou-se que o AEAC diminuiu as fezes diarreicas, porém aumentou a distância percorrida pelo farelo de carvão vegetal no intestino, indicando um efeito procinético do extrato. O AEAC foi capaz de reduzir o *enteropooling* produzido pela administração do óleo de mamona. Com essas avaliações indicou-se que o efeito antidiarreico desse extrato está relacionado com sua capacidade de inibir a secreção intestinal e/ou aumentar a absorção intestinal, e que mesmo diminuindo as fezes diarreicas, não alterou a produção de fezes total (FERRAZ et al., 2017).

2.2.3 Ação anti-inflamatória

Modelos experimentais com ratos tratados com compostos isolados do extrato metanólico de *Annona crassiflora* (3-O- β -glucósido de kaempferol e 3-O- β -diglucósido de kaempferol), administrados por via oral (100 mg/Kg e 300 mg/Kg), evidenciaram redução da resposta inflamatória induzida por carragenina, a qual foi administrada por via intratorácica. Após a eutanásia dos animais, a cavidade torácica foi lavada e o volume de exsudato foi usado para determinar a contagem do número total dos leucócitos, e posteriormente, para realizar a contagem diferencial. Houve inibição significativa do aumento de leucócitos totais, do aumento dos níveis de proteínas e inibição da migração de leucócitos. Além disso, o extrato metanólico mostrou exibir atividade antimutagênica de forma significativa (ROCHA et al., 2016).

Propriedades anti-inflamatórias e profibronogênicas foram identificadas na casca do fruto de *Annona crassiflora*, enriquecida com polifenol, em um estudo feito por Moura et al. (2019). Foi usado o extrato etanólico da casca dos frutos, do qual extraíram frações de acetato de etila e n-butanol, além de identificarem várias biomoléculas antioxidantes, como ácido clorogênico, epicatequina, procianidinas B2 e C1, quercetina-glicosídeo, kaempferol-rutinosídeo, o glucosídeo de kaempferol e o cafeoide-glucosídeo. Através da atividade de neutrófilos e macrófagos, os potenciais anti-inflamatórios e profibronogênicos foram avaliados pela cicatrização de feridas cutâneas,

provocadas experimentalmente em camundongos. Com os resultados, relatou-se que houve eficácia no tratamento das feridas com a fração enriquecida com polifenol da casca da *Annona crassiflora* com cerca de 4 a 7 dias após o início do tratamento, apresentando efeito anti-inflamatório e deposição de fibras de colágeno dos tipos I e III nessas feridas.

Em um estudo, foram analisadas as propriedades analgésicas e anti-inflamatórias das frações hidroalcoólicas (filtradas e precipitadas) das folhas de *Annona crassiflora*, extraíndo alcalóides, flavonóides e terpenóides da mesma, utilizando camundongos machos suíços ou Balb/c para tal análise. As frações filtradas (F1) e precipitadas (F2) foram avaliadas por cromatografia em camada e as precipitadas foram analisadas também por poliamida e celulose, além de realizar a triagem fitoquímica dessas frações, mostrando a presença de alcaloides na fração filtrada, enquanto os flavonoides estavam presentes nas duas frações. A nocicepção foi induzida pela injeção intraplantar de formalina nos animais para observar o tempo de lambida da pata e o reflexo nociceptivo da cauda. Os camundongos Balb/c receberam o tratamento prévio com F1 e F2, após a injeção intratorácica de carragenina, zimosan, lipopolissacarídeo (LPS) e interleucina 8 (IL-8). Os resultados indicaram redução significativa no tempo de lambida da pata em uma segunda fase dos testes, mas não houve redução do teste de latência do reflexo nociceptivo da cauda. O tratamento com F2 inibiu significativamente a neutrofilia induzida por carragenina, LPS ou IL-8, mas houve resultado negativo sobre o zimosan (DA COSTA OLIVEIRA et al., 2018).

2.2.4 Ação antimalárica e larvicida

Foi executado um trabalho com cento e noventa extratos hexânicos e etanólicos de 27 espécies de plantas Cerrado Brasileiro, incluindo *Annona crassiflora*, para testar a atividade larvicida contra larvas de 3ª estágio de *Aedes aegypti* a 500 mcg / ml. Em relação ao extrato etanólico de *Annona crassiflora*, foi observada atividade larvicida a 500 mcg/ml e o extratos (etanólicos) da raiz da casca e raiz da madeira de gerou 20 e 6% de mortalidade em 15,62 g / ml, respectivamente, o que demonstrou sua capacidade eficaz para controle do mosquito *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006).

Omena et. al (2007) realizaram um estudo com um grupo de 51 espécies de plantas medicinais brasileiras (incluindo *Annona crassiflora*) para relatar

atividades larvicidas contra o *Aedes aegypti*. Os resultados mostraram que as plantas do gênero *Annona* podem possuir componentes inseticidas altamente ativos e que as maiores atividades foram observadas nos extratos etanólicos de sementes de *A. glabra*, seguidos de extratos etanólicos de casca de raiz de *Annona crassiflora* e semente de *Annona squamosa*.

Foi analisada a atividade antimalárica in vivo, usando como modelo camundongos infectados com *Plasmodium berghei*, e a toxicidade de diferentes frações de *Annona crassiflora*, como acetogenina, alcaloides e frações ricas em flavonoides foi avaliada. Essas frações de *Annona crassiflora* foram administradas em doses de 12,5 mg / kg / dia, por quatro dias, nos animais. As frações foliares ricas em alcalóides e flavóides foram as que apresentaram melhor atividade antimalárica (PIMENTA et al., 2014).

2.2.5 Ação antineoplásica e antimutagênica

Foi realizada uma avaliação sobre os efeitos mutagênico, antimutagênico e citotóxico de um extrato etanólico foliar de *Annona crassiflora*, utilizando teste de micronúcleos em camundongos. Os camundongos foram tratados com extrato etanólico de araticum (EEA) utilizando 10, 20, 50, 100 e 160 mg/kg para observar a atividade mutagênica do extrato. Também foi avaliada a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) para todas as doses, após 24, 48 e 72 horas o tratamento. Os animais também foram tratados com 10, 20, 50 e 100 mg/kg (-1) de EEA e 4 mg/kg de mitomicina C (MMC) simultaneamente para relatar a atividade antimutagênica, tendo a frequência dos MNPCE avaliada 36 horas depois do tratamento. Já a citotoxicidade, foi testada baseando-se na razão de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCE/NCE). Com os resultados de mutagenicidade, relatou-se que todas as doses de EEA não produziram aumentos significativos de MNPCE, não apresentando variações entres os três tempos de avaliação utilizados, o que demonstra que o extrato não apresentou atividade mutagênica. Em relação à antimutagenicidade, exceto os 10 mg/kg administrados concomitantemente com 4 mg / kg de MMC, todas as doses reduziram significativamente a frequência de MNPCE, o que demonstrou uma atividade antimutagênica fornecida pelo extrato. Quanto a citotoxicidade, foi evidenciada nas doses de 50, 100 e 160 mg/kg, às 24 e 48 horas após a exposição (VILAR et al., 2008).

Dragano et al. (2010) relataram sobre a influência da ingestão da polpa de *Annona crassiflora* na modulação de processos mutagênicos ou antimutagênicos e sua ação no estresse oxidativo em um modelo experimental *in vivo* com camundongos adultos *Mus musculus*. A polpa da fruta foi analisada quimicamente e submetida a procedimentos para preparação das dietas dos animais. Foram quantificados os teores de umidade, proteína, fibra, glicose, sacarose, frutose, minerais (potássio, cálcio, fósforo, magnésio, manganês, zinco, cobre, sódio, selênio), além dos níveis lipídicos e do teor calórico da fruta. Após a alimentação dos camundongos com as dietas da polpa da fruta, observou-se que não houve efeitos mutagênicos ou antimutagênicos sobre as células da medula óssea dos animais, e não gerou nenhuma alteração nos níveis séricos de glicose, triglicerídeos e colesterol. Mas baseando-se no teste de micronúcleo policromático, houve potencialização da ciclofosfamida, a qual não exerceu grande importância na indução de espécies reativas de oxigênio.

Vilar, Ferri e Chen-Chen (2011) realizaram uma pesquisa sobre a genotoxicidade de *Annona crassiflora* utilizando SOS-Indutest para detecção de agentes genotóxicos e o teste de Ames, que identifica compostos mutagênicos. Esse estudo também utilizou o extrato etanólico da planta e cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Entretanto, os resultados da pesquisa não revelaram genotoxicidade direta ou mutagenicidade do extrato.

Para uma investigação sobre *Annona crassiflora*, foi realizado um ensaio da atividade antiproliferativa *in vitro* com linhagens de células tumorais humanas e com extratos metanólicos das sementes da planta. O experimento resultou em uma redução de 50% no crescimento celular em relação as células do controle que não foram tratadas. Avaliaram também a atividade citostática (concentração do fármaco para inibição do crescimento total) e a atividade citotóxica (concentração suficiente para matar 50% das células). *Annona crassiflora* apresentou como principais compostos o ácido cafeico, ácido sinápico e rutina. Por fim, puderam concluir que *Annona crassiflora* exibiu efeitos antiproliferativos relevantes (FORMAGIO et al., 2015).

Em um estudo foi avaliado o efeito antineoplásico do extrato bruto e de derivados da planta *Annona crassiflora* em linhagens celulares de câncer cervical. Para esse objetivo, foi feita uma preparação do extrato de álcool etílico da planta e, posteriormente, foi obtido as partições do extrato bruto, dando

destaque a partição de hexano, em que foi feita a caracterização *in vivo* dessa partição ao inoculá-la em quatro grupos de ovos (grupo 1 - inoculado apenas DMSO / veículo de partição; grupo 2 - inoculado com a partição de hexano; 3 - inoculado com células tumorais SiHa e tratado com DMSO; grupo 4 - inoculado com as células SiHa e tratado com a partição de hexano) e avaliar, em cada um, o perímetro tumoral. Além disso, foram utilizadas sete linhagens de células de câncer cervical de humanos, denominadas -1, HR5, HeLa, SiHa, BU25TK, HR5-CL11 e CaSki, para realizar ensaios da viabilidade das células e de migração de cicatrização de feridas, e estudo de combinação de drogas, em que as análises da sobrevivência, proliferação, vias de sinalização do ciclo celular e morte foram feitas pelo método de Western Blot. Com o resultado das pesquisas, foi relatado que a partição de hexano apresentou efeito citotóxico tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e inicia respostas celulares como danos ao DNA, apoptose via intrínseca e redução da expressão p21 pela via do proteassoma ubiquitina (SILVA et al., 2018).

2.2.6 Ação antinociceptiva

Estudos utilizando o peltatosídeo, um flavonoide (quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6) – O – α - L- arabinósido) derivado das folhas de *Annona crassiflora*, usou um modelo experimental *in vivo*, com camundongos suíços machos com 9 semanas de idade, para relatar atividade antinociceptiva. Os animais foram induzidos a hiperalgesia e o limiar nociceptivo foi medido para cálculos posteriores. Foi observado um efeito positivo da administração do peltatosídeo, tendo antinocicepção após 3 horas da indução intraplantar da hiperalgesia nos animais, quando comparado ao grupo controle e ainda um aumento do limiar nociceptivo 15 minutos após a administração do peltatosídeo com um pico de ação 20 min após a injeção do mesmo (DA COSTA OLIVEIRA et al., 2017).

2.2.7 Ação hepatoprotetora

Justino et al. (2017) investigou sobre as propriedades hepatoprotetoras de uma fração enriquecida com polifenol da casca de *Annona crassiflora* (Ac-Pef). Para a investigação, foi usado o modelo *in vivo* de uma linhagem de ratos Wistar, nos quais foi induzido diabetes pela inanição por 24 horas, seguida de injeção intraperitoneal de estreptozotocina. Ao avaliar os parâmetros

bioquímicos séricos, os ratos diabéticos apresentavam aumento de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FAL) e triglicerídeos. Após a administração de Ac-Pef, ocorreu redução da atividade enzimática da ALT, AST e FAL, porém, GGT e triglicerídeos não foram reduzidos. Além disso, analisaram marcadores de estresse oxidativo, em que a Ac-Pef aumentou a capacidade antioxidante hepática, reduziu a peroxidação lipídica (elevada anteriormente pela diabetes induzida), e também reduziu o conteúdo de proteína carbonil. Como complemento, outras moléculas antioxidantes foram avaliadas, como a catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), que apresentaram redução após a administração de Ac-Pef. Além disso, elevou-se a atividade da glutaciona redutase (GR) e conseqüentemente do conteúdo de glutaciona reduzida (GSH). Os marcadores de estresse nitrosoativo foram avaliados a partir dos teores hepáticos da óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e nitrotirosina (N-Tyr), que também foram reduzidas após o tratamento com Ac-Pef. Com a análise histológica do fígado e a previsão de propriedades farmacocinéticas *in-silico* demonstrou-se a ação hepatoprotetora da Ac-Pef.

2.2.8 Ação inibitória da contração muscular

Foi realizado um ensaio com extratos de sementes secas de *Annona crassiflora* (AR.1) para avaliar sua atividade contra contrações do íleo isolado de cobaia, tendo as respostas contráteis gravadas isotonicamente em um quimógrafo usando uma alavanca auxotônica. O efeito da AR.1 na dose-resposta induzida por agonistas, iduziu um desvio não paralelo, dependente da dose, à direita nas curvas dose-resposta para histamnina, acetilcolina e bradicinina, tendo redução da resposta máxima dos três agonistas. Na irreversibilidade do efeito inibitório de AR.1 nas curvas dose-resposta para histamnina, acetilcolina e bradicinina, não houve reversão mesmo após vários desarmes por mais de sessenta minutos. Já o efeito de AR.1 nas contrações induzidas por cálcio no íleo despolarizado, as curvas de dose-resposta também apresentaram deslocamento da curva para direita, mas a resposta máxima não teve alterações significantes com o AR. Com esses resultados relatou-se o extrato de sementes secas de *Annona crassiflora* apresentou atividades contra contrações musculares (WEINBERG, et al., 1993).

2.2.9 Ação moluscocida e nematicida

Em um estudo realizado por Santos et al. (2001), se evidenciou propriedades moluscocidas de *Annona crassiflora* de seus extratos alcoólicos e etanólicos, tendo a atividade moluscocida testada contra as formas adultas e as massas de ovos de *Biomphalaria glabrata*. Os resultados permitiram concluir uma importante atividade moluscocida por ambos os extratos.

Em estudos com o extrato hidroalcoólico de folhas de *Annona crassiflora* e de suas frações (diclorometano, acetato de etila, metanol e água), houve a realização ensaio de mobilidade contra o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. A análise por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi feita para identificar os metabólitos. Os resultados indicaram que as frações diclorometano e acetato de etila foram as mais ativas entre as frações do extrato, pois geraram uma porcentagem de imobilidade em larvas *C. elegans* bastante elevada. Os compostos metil éster de ácido palmítico, 2-isopropil-5-metilciclohexanol, éster metílico de ácido oleico, éster metílico de ácido esteárico, quercetina e kaempferol também foram identificados nas frações. Desta forma, esse extrato poderia ser usado em formulações para reduzir o uso intensivo de nematicidas sintéticos por apresentar uma atividade nematicida em potencial (MACHADO et al., 2015).

2.3 *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um parasita zoonótico intracelular obrigatório, o qual infecta animais de sangue quente, incluindo os seres humanos (YANG et al., 2017). A maioria das espécies animais são hospedeiros intermediários e não liberam o *T. gondii* no ambiente, mas a infecção levará ao desenvolvimento de cistos teciduais (DABRITZ; CONRAD, 2010). Os felídeos, incluindo os gatos domésticos, são os hospedeiros definitivos, ou seja, nesses animais ocorre a reprodução sexuada e liberam milhões oocistos nas fezes.

T. gondii apresenta três estágios infecciosos: (1) taquizoítas que apresentam rápida proliferação na célula hospedeira, ocorrendo principalmente na fase aguda da doença; (2) bradizoítas que se encontram dentro de cistos teciduais sob replicação lenta (fase crônica) por estresse imposto pela resposta imune do hospedeiro; e (3) esporozoítas liberados a partir de esporocistos

contidos em oocistos eliminados nas fezes de felídeos (hospedeiros definitivos), que correspondem às formas infectantes oriundas da reprodução sexuada do parasito que ocorre no intestino de felídeos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

A infecção por *T. gondii* pode ocorrer após a ingestão de oocistos, o estágio parasitário eliminado em fezes de gatos que contaminam o solo, alimentos ou água, ou pelo consumo de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, ou por transmissão vertical pela passagem transplacentária de taquizoítas de mães infectadas para os fetos, ou por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (GUHA et al., 2017 apud ZHENG et al., 2019; RAMANAN et al., 2019).

Quando oocistos são ingeridos, rompem-se no intestino e liberam os esporozoítos no lúmen intestinal. Os esporozoítos infectam os enterócitos e se diferenciam em taquizoítos, formas do parasito que são altamente proliferativas, móveis e rapidamente disseminadas por todo o organismo, induzindo uma resposta imune aguda (DRINIC et al., 2017). Os taquizoítos são, em parte, eliminados pela resposta pró-inflamatória desenvolvida no hospedeiro, mas alguns deles se diferenciam em uma forma latente denominada bradizoíto (SWIERZY et al., 2017). Os bradizoítos são metabolicamente inativos (geralmente estão na fase G0 do ciclo celular) e formam cistos nos tecidos, os quais podem persistir por toda a vida do hospedeiro, preferencialmente no cérebro e tecido muscular. Em casos de imunossupressão, os bradizoítos latentes podem se transformar em taquizoítos replicativos, desencadeando na manifestação da doença (SWIERZY et al., 2017).

A toxoplasmose é, normalmente, uma doença assintomática. Porém, adquire importância em indivíduos imunocomprometidos ou em gestantes. Nestas, pode ocorrer a transmissão vertical ao feto, resultando em aborto, anormalidades fetais e morte (GUHA et al., 2017 apud ZHENG et al., 2019).

Em medicina veterinária, a toxoplasmose é uma doença de grande importância, podendo gerar impactos econômicos por causar falhas reprodutivas em animais domésticos, principalmente ovinos, caprinos e suínos, espécies de grande valor na produção animal (Abu Samra et al., 2007; Gebremedhin et al., 2015). Em cães e gatos, os sinais clínicos da toxoplasmose, segundo Birchard & Sherding (2003), citado por Negri et al. (2008) é mais comum, mas esses sinais são bem semelhantes em ambas as espécies. Geralmente, são sinais

inespecíficos, como anorexia, depressão, febre intermitente; pode acometer vários órgãos após disseminação extra-intestinal, sendo os mais afetados os pulmões, os olhos, o cérebro, o fígado e a musculatura esquelética (BIRCHARD & SHERDING, 2003).

O tratamento clássico recomendado em casos de toxoplasmose inclui drogas inicialmente usadas como antibacterianos ou no tratamento da malária (ANTICZAK et al., 2016). Esses fármacos incluem pirimetamina, sulfadiazina, azitromicina, claritromicina, espiramicina, atovaquona, dapsona e cotrimoxazol (trimetoprim-sulfametoxazol (ANTICZAK et al., 2016; DUNAY et al., 2018).

As drogas pirimetamina e sulfadiazina possuem efeitos sinérgicos sobre a via de biossíntese do ácido fólico diminuindo-a na célula protozoária. Esta associação produz resultados satisfatórios no controle da replicação de taquizoítos, porém causa toxicidade às células dos mamíferos, sendo esta a razão da adição de ácido fólico ao esquema terapêutico. Outras associações utilizadas são pirimetamina-clindamicina e pirimetamina-antibiótico macrolídeo (claritromicina ou azitromicina). Os antibióticos clindamicina e macrolídeos inibem a síntese proteica no parasito, mas também podem causar efeitos adversos importantes. A associação trimetoprima-sulfametoxazol não é tão eficaz quanto aquelas citadas acima, mas pode evitar encefalite em indivíduos imunocomprometidos e soropositivos, além de apresentar potencial risco de efeitos adversos. Em casos de reações de hipersensibilidade, podem ser usadas as associações dapsona e pirimetamina ou atovaquona. Dapsona, assim como as sulfonamidas, inibe a enzima diidropteroato sintetase na via de síntese do ácido fólico. Atovaquona é um análogo da ubiquinona protozoária e afeta seletivamente as funções do citocromo bc1 no *T. gondii*. Espiramicina é a droga de escolha para gestantes com alto risco de toxoplasmose congênita. Este fármaco pode impedir a transmissão transplacentária do parasito em casos de toxoplasmose aguda adquirida no início da gestação. Contudo, quando a infecção fetal é confirmada, o tratamento com espiramicina é substituído pela combinação pirimetamina – sulfadiazina - ácido fólico. Azitromicina tem sido indicada como fármaco promissor para o tratamento da toxoplasmose congênita, uma vez que apresentou atividade inibitória prolongada sobre a replicação intracelular de taquizoítos e uma menor toxicidade em modelos experimentais em murinos, linhagens celulares e explantes placentários (GILMAN, 1997;

MONTOYA; LIESENFELD, 2004; FRANCO et al., 2011; CASTRO-FILICE et al., 2014).

Compostos derivados de plantas apresentam indícios de serem uma boa alternativa para terapia da toxoplasmose, como relatado no estudo feito por De Oliveira et al. (2009), citado por Antczak et al. (2016), no qual fibroblastos foram tratados com chá da planta *Artemisia annua* e foi observado redução de 75% na penetração de taquizoítos nessas células e diminuição, em até 55%, da replicação intracelular do parasito. Em outra pesquisa feita por Choi et al. (2008), também citado por Antczak et al. (2016), extratos das espécies vegetais *Sophora flavescens* e *Zingiber officinale* demonstraram alta seletividade contra a cepa RH de *T. gondii* e, especificamente, *Z. officinale* foi dez vezes mais potente contra o parasito, comparado a células HeLa. (o valor de CE50 (concentração necessária para produzir metade do efeito máximo) para *T. gondii* foi dez vezes menor do que a EC50 para células *HeLa*).

Soares et al. (2015) investigaram a ação de um extrato proteico e uma fração enriquecida com inibidor de protease de sementes de *Jatropha curcas*, uma planta conhecida por pinhão-mansão, reduziram o número de células *Vero*. *Infectadas com T. gondii* e o número de parasitos intracelulares.

Em outro estudo, o extrato da espécie *Dictamnus dasycarpus* mostrou atividade antitoxoplasma, com maior seletividade contra o parasito, comparada ao fármaco sulfadiazina (HONG et al., 2014).

Diante do exposto, derivados vegetais têm apresentado efeitos promissores no tratamento da toxoplasmose e, portanto, representam potenciais fontes de compostos bioativos contra o parasito *T. gondii*.

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade mundial, em torno de 15% a 20% do total. Entre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas constituem importantes recursos naturais para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (ANVISA, 2016), os quais podem ser utilizados tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária.

Annona crassiflora Mart., 1841, popularmente conhecida como “Araticum”, é um membro da família Annonaceae, encontrada no Cerrado brasileiro (RATTER et al. 1997) e diversos estudos demonstraram nos extratos

das folhas, sementes, casca e polpa das frutas propriedades relacionadas a atividades antimicrobiana e antiparasitária. No entanto, ainda não existem dados na literatura sobre possíveis efeitos de derivados vegetais de *Annona crassiflora* sobre a infecção por *T. gondii*.

A toxoplasmose, causada pelo protozoário *T. gondii*, pode ser assintomática ou apresentar sintomas importantes com impacto sobre a saúde humana e de outros animais. *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório que infecta a maioria das células nucleadas de aves e mamíferos e apresenta ampla distribuição mundial. Este parasito, tipicamente, é de baixa virulência. Entretanto, a infecção adquire importância em dois grupos de alto risco, mulheres gestantes, podendo causar aborto, mortalidade neonatal e anormalidades fetais, e indivíduos imunocomprometidos, podendo ser observadas grave morbidade e elevada taxa de mortalidade. Em Medicina Veterinária, a toxoplasmose também pode manifestar-se em diferentes espécies de animais e gerar problemas reprodutivos (FIALHO et al., 2009). Assim, a toxoplasmose é uma doença de importância em Saúde Pública, pelas alterações que causa nos fetos humanos, e de importância em produção animal pelas perdas por aborto.

Até o presente momento, ainda não existem vacinas para toxoplasmose humana, apenas há uma vacina comercial para ovinos e estudos em outras espécies de animais. O tratamento padrão da toxoplasmose utiliza sulfadiazina e pirimetamina. Entretanto, esses fármacos apresentam vários efeitos adversos e, portanto, a descoberta de novas substâncias com potencial ação antiparasitária contra *T. gondii* e com menos efeitos tóxicos é bastante relevante.

Diante do exposto, considerando as várias propriedades farmacológicas já identificadas para a espécie *A. crassiflora*, o presente estudo justifica-se dado o seu potencial para identificar novos compostos ativos contra o parasito *T. gondii* a partir de uma espécie vegetal nativa do Cerrado brasileiro, corroborando, com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (ANVISA, 2016).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* na proliferação de *T. gondii* em células RAW 264.7.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar a citotoxicidade do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* em células da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7.
- Determinar o efeito do extrato da *Annona crassiflora* na proliferação de *T. gondii* em células RAW 264.7.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de execução

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de pesquisa dos Departamentos de Farmacologia (Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais) e de Biofísica (Laboratório de Biologia Molecular e Celular), do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

5.2 Material vegetal

Para a realização da pesquisa utilizando o extrato aquoso das folhas de *Annona crassiflora*, previamente, uma amostra da referida espécie foi coletada em campo de vegetação espontânea e, em seguida, identificada por biólogo qualificado. Posteriormente, uma exsicata (amostra prensada e dessecada) foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (Número de Registro: HUFU 73.547).



Figura 1. *Annona crassiflora*.

Fonte: <https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/5349120592>

5.3 Obtenção do extrato aquoso

Inicialmente, as folhas foram separadas dos galhos e lavadas em água corrente e, em seguida, em água destilada. Após esse procedimento, as folhas foram colocadas em estufa a 45°C durante 48 horas para secagem. Depois de secas, as folhas foram trituradas em liquidificador. As folhas trituradas foram colocadas em provetas contendo água destilada na proporção de 10% (m/v). A extração foi realizada à temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente, o extrato foi duplamente filtrado, primeiramente em funil contendo algodão e, em seguida, em funil contendo papel de filtro. O extrato obtido foi colocado em tubos falcon de 50 mL e acondicionado à temperatura – 20 °C. Após o congelamento, os extratos foram liofilizados à – 40°C até a total remoção do conteúdo de água. O material obtido foi pesado e acondicionado em freezer à – 20°C até a data da utilização (FERRAZ, et al., 2017).

5.4 Cultura de células da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 e da linhagem HeLa

Macrófagos murinos da linhagem *macrophage-like* RAW 246.7 e células epiteliais do cérvix uterino humano (linhagem HeLa) foram gentilmente cedidas pelos Profs. Fábio de Oliveira, do Laboratórios de Biologia Molecular e Celular, e Bellisa de Freitas Barbosa, do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução,

ambos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e 5% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Campinas, Brasil; inativado a 56°C / 30 min) (meio completo, RPMI-SFB), em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂.

As culturas de células foram mantidas por meio de passagens seriadas a cada dois dias. No momento do repique, o meio de cultura era descartado e as células lavadas com meio RPMI sem SFB. Em seguida, a monocamada celular era removida com *cell scraper*, as células transferidas para tubos falcon de 15 mL e centrifugadas a 400 g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1 mL de meio a 5% de SFB e distribuídas em frascos novos de cultura.

5.5 Parasitos

Os parasitos utilizados foram taquizoítas de *T. gondii*, clone 2F1. O clone 2F1 de *T. gondii* foi obtida por modificação genética da cepa RH para expressar constitutivamente a enzima citoplasmática β-galactosidase e, gentilmente, cedida pelo Dr. Vern Carruthers da *School of Medicine at the University of Michigan* (USA). Os parasitos foram mantidos por passagens seriadas, a intervalos regulares de 72 horas, em células da linhagem HeLa cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e 2% de SFB (RPMI-SFB 2%) em frascos de cultura de 25 cm², a 37°C e 5% de CO₂. Quando a maioria das células infectadas em cultura estava lisada pelo parasito, o meio contendo taquizoítas livres era centrifugado duas vezes, primeiro a 200 g, por 2 minutos à temperatura ambiente, e depois a 500g, por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante era descartado e os parasitos homogeneizados em meio a 2% de SFB e distribuídos em novos frascos com células não infectadas.

5.6 Ensaio de citotoxicidade do extrato aquoso da *Annona crassiflora* em células RAW 264.7

A viabilidade de macrófagos murinos (linhagem *macrophage-like RAW 264.7*) tratados com extrato aquoso de *Annona crassiflora* foi avaliada por ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) (MOSMANN, 1983). Este ensaio permitiu determinar as concentrações do extrato que poderiam ser utilizadas sem diminuir a viabilidade celular, ou seja, sem apresentar efeito citotóxico. Células *RAW 264.7* foram removidas dos frascos de cultura utilizando-se *cell scraper* e foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos, homogeneizadas em meio RPMI a 5% de SFB e ajustadas para a concentração de 1×10^5 células/ml de meio. Posteriormente, as células foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/200 μ L/poço) *overnight*, em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C. Depois desse período, as células foram tratadas com: (1) concentrações crescentes do extrato aquoso de *Annona crassiflora* (0,487 a 1000 μ g/mL); (2) meio RPMI com 5% de SBF (controle negativo para citotoxicidade, ou seja, viabilidade 100%). Após os tratamentos, as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ *overnight*. Posteriormente, os sobrenadantes das culturas foram descartados e as células foram lavadas e pulsadas com 200 μ L/poço de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma Chemical Co.) a 0,5 mg/mL em meio RPMI com 5% de SBF e permaneceram a 37 °C e 5% de CO₂ por quatro horas. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e os cristais de formazan (partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o reagente MTT) foram solubilizados com 100 μ L/poço de álcool propílico puro. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada após 30 minutos, a 570 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem média da viabilidade celular \pm S.E.M. (erro padrão da média) de quatro experimentos independentes realizados em quadruplicata, em relação ao controle 100% de viabilidade.

5.7 Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* em células RAW 264.7

Os taquizoítas de *T. gondii*, clone 2F1, foram coletados a partir da cultura em células HeLa e purificados por centrifugação diferencial, inicialmente, a 200 x g, 2 min, 4 C° e, em seguida, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 500

x g, 5 min, 4 C°. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspenso em meio RPMI suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de SFB. Parasitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer utilizando-se o corante azul de Tripam 4% (v/v).

Células RAW 264.7 viáveis, utilizadas no ensaio de proliferação, também foram previamente contadas em câmara de Neubauer com o corante azul de Tripam. Este corante permite a quantificação microscópica da viabilidade celular. Células viáveis possuem membranas celulares intactas e são impermeáveis ao corante azul de tripam, assim, ao serem examinadas, essas células apresentam citoplasma claro, enquanto células mortas apresentam citoplasma azul (STROBER, 2015).

No ensaio de proliferação, células RAW 264.7 (2×10^4 células/200 μ L/poço) em meio RPMI contendo SFB 5% foram cultivadas em microplaca de cultura de 96 poços a 37 °C e 5% de CO₂. Após 3 horas de incubação para adesão das células na placa, as células foram tratadas com concentrações crescentes do extrato de *Annona crassiflora* (0,487 a 500 μ g/mL), previamente filtrado em membrana 0,22 μ m, e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ *overnight* (18 h). Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram retirados e as células foram infectadas com taquizoítas do clone 2F1 de *T. gondii* na proporção de três parasitos por célula (3:1), ou seja, 6×10^4 parasitos/200 μ L RPMI-SFB 2%/poço e foram novamente mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ *overnight*. Após o período de incubação, as células foram avaliadas quanto à proliferação intracelular de *T. gondii* de acordo com metodologia descrita por Teo e colaboradores (2007). As células foram lavadas seis vezes com PBS contendo 1 mM CaCl₂ e 1 mM MgCl₂ para remover os parasitos livres. Após as lavagens, foram adicionados 100 μ L de tampão de lise (HEPES 100 mM, pH 8,0; MgSO₄ 1 mM; Triton X-100 0,1%; ditiotretol 5 mM) e as células foram mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os lisados foram acrescidos de 160 μ L de tampão de ensaio (tampão fosfato 100 mM, pH 7,3; β -mercaptoetanol 102 mM; MgCl₂ 9 mM) e, subsequentemente, de 40 μ L do substrato CPRG 3 mM (clorofenol red – β – D – galactopiranosídeo; Roche). A microplaca foi, então, incubada por 4 horas à temperatura ambiente, no escuro. Paralelamente, foi construída uma curva padrão por meio de diluições seriadas, em duplicata, de taquizoítas de *T. gondii*, a partir de uma suspensão de parasitos a $1 \times 10^5/50$ μ L/poço. À curva padrão

também foram adicionadas as soluções tampão de lise, tampão de ensaio e o substrato CPRG. Após o período de incubação, a densidade óptica (DO), correspondente à atividade da enzima β -galactosidase, foi mensurada em comprimento de onda (λ) igual a 570 nm em leitor de placas.

Após a lise celular, os parasitos do clone 2F1 de *T. gondii* livres no sobrenadante foram expostos ao reagente CPRG. A enzima β -galactosidase, expressa pelos taquizoítos dessa cepa, converte o substrato CPRG de coloração amarelo-laranja em galactose e o cromóforo vermelho clorofenol, desenvolvendo-se uma coloração vermelho-escuro no meio. A intensidade de cor corresponde, portanto, à atividade enzimática da β -galactosidase e constitui uma medida indireta para a determinação quantitativa do número de parasitos em cada condição experimental.

Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como o número médio \pm S.E.M. de taquizoítos de *T. gondii*, em cada condição experimental, em relação à curva padrão.

5.8 Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os dados foram expressos como a média \pm S.E.M (erro padrão da média). Diferenças entre células tratadas e controle foram analisadas por testes não paramétricos, Kurskal-Wallis ou Mann *Whitney*, quando apropriado, após verificação que as variáveis não seguiam distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Todos os resultados foram considerados significantes para um nível de $p < 0,05$.

6 Resultados

6.1 Avaliação do efeito do extrato da *Annona crassiflora* sobre a viabilidade de células RAW 264.7

Os resultados obtidos nos ensaios para avaliação da viabilidade de células RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso das folhas de *Annona crassiflora* estão representados na **figura 2**.

De acordo com os dados apresentados, nas condições experimentais utilizadas, o extrato aquoso das folhas da *A. crassiflora*, em todas as concentrações utilizadas, não apresentou efeito citotóxico em células RAW 264.7 ($p > 0,05$). Além disto, os dados obtidos sugerem uma tendência à proliferação celular, mas este efeito não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$).

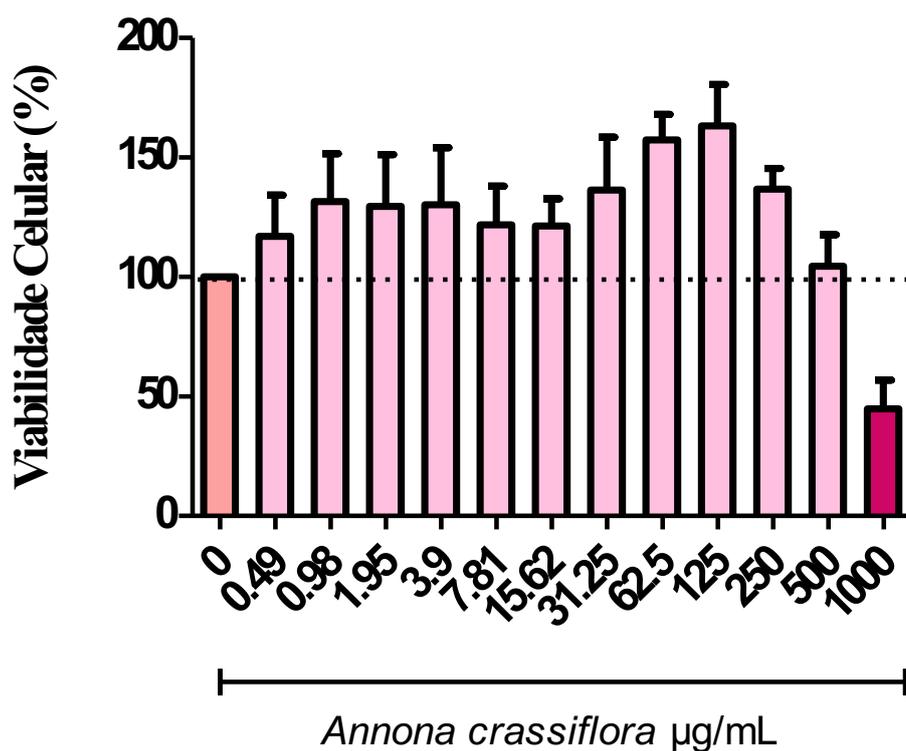


Figura 2. Viabilidade de células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso das folhas de *Annona crassiflora*. Células macrophage-like RAW 264.7 (2×10^4 células/200 μ L/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações (0,49 a 1000 μ g/mL) do extrato aquoso de *Annona crassiflora*. Células não tratadas com o extrato (concentração = 0 μ g/mL) constituíram o grupo controle (100% de viabilidade). A viabilidade celular foi analisada pelo método de conversão de MTT (tetrazólio de metiltiazol). Os dados estão expressos como média \pm S.E.M. de quatro experimentos independentes, realizados em quadruplicata. As comparações entre as médias nos grupos de células RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações do extrato e o grupo controle foram analisadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

6.2 Proliferação intracelular de *T. gondii* em células RAW 264.7

O efeito do extrato aquoso da *Annona crassiflora* na proliferação de *T. gondii* em células RAW 264.7 está representado na **figura 3**. Nas condições experimentais utilizadas, o tratamento das células RAW 264.7 com o extrato da *Annona crassiflora* não reduziu a proliferação intracelular de *T. gondii*, desde que não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de parasitos nas células controle (células RAW 264.7 tratadas somente com meio RPMI) e tratadas. Contudo, os resultados obtidos sugerem que existe uma tendência à diminuição na proliferação do parasito quando as células foram tratadas com as maiores concentrações do extrato (500 e 1.000 µg/mL).

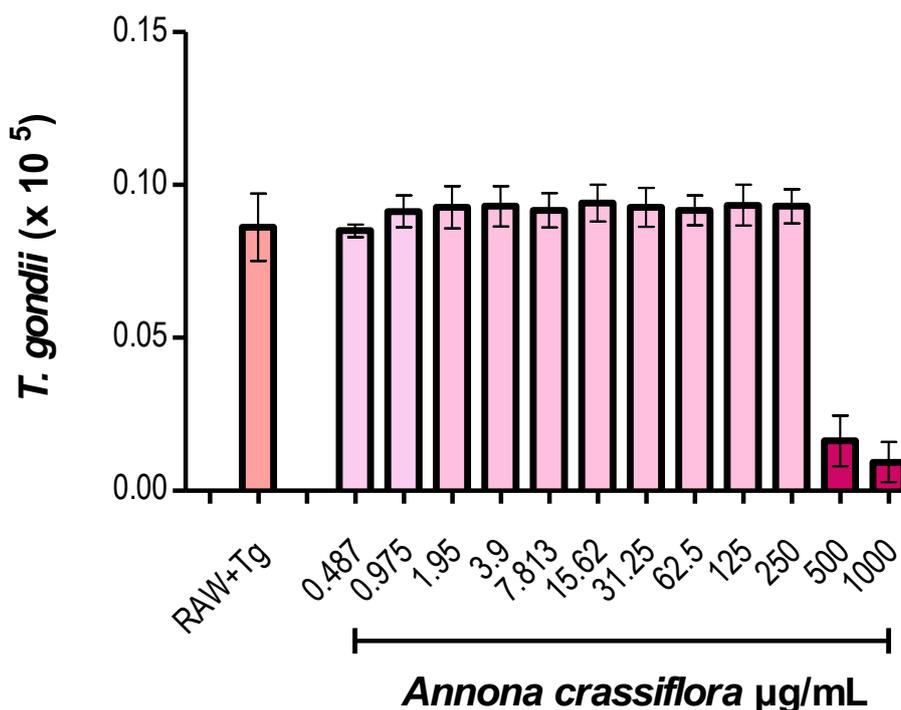


Figura 3. Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* na proliferação de *T. gondii* em células RAW 264.7. Células RAW 264.7 (2×10^4 células/200µL/poço) foram tratadas com concentrações crescentes do extrato aquoso de *Annona crassiflora* (0,487 a 1000 µg/mL) e mantidas *overnight* (18 h) a 37 °C e 5% de CO₂. Como controle, células RAW 264.7 foram tratadas apenas com meio RPMI a 5% de SFB. Em seguida, as células foram infectadas com taquizoítas da cepa 2F1 de *T. gondii* na proporção 3:1 (parasitos:célula) e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ *overnight*. Após o período de incubação, as células foram lavadas e lisadas com tampão específico. A quantificação de parasitos, em cada condição experimental, foi determinada por reação colorimétrica, utilizando-se o cromógeno CPRG (clorofenol vermelho β-D-galactopiranosídeo), comparando-se os dados obtidos a uma curva-padrão. A leitura da densidade óptica foi realizada em $\lambda = 570$ nm. Os resultados estão expressos como média \pm S.E.M dos dados obtidos em um experimento realizado em triplicata. As comparações entre células tratadas com as diferentes concentrações do extrato e o grupo controle foram analisadas utilizando-se o teste de Kurskal-Wallis ($p > 0,05$).

Em seguida, comparamos a proliferação de *T. gondii* em linhagens celulares diferentes, células RAW 264.7 e HeLa. As células RAW 264.7 (*macrophage-like* RAW 264.7) constituem um modelo experimental para estudo que avaliam as funções fenotípicas e funcionais de macrófagos e, portanto, são fagócitos, enquanto as células HeLa não apresentam esta função, exceto em condições específicas (TACIAK, et al., 2018; SHEPARD, 2014; JONES et al., 1981).

Os resultados obtidos (**Figura 4**) mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na proliferação do parasito entre as duas linhagens celulares ($p > 0,05$).

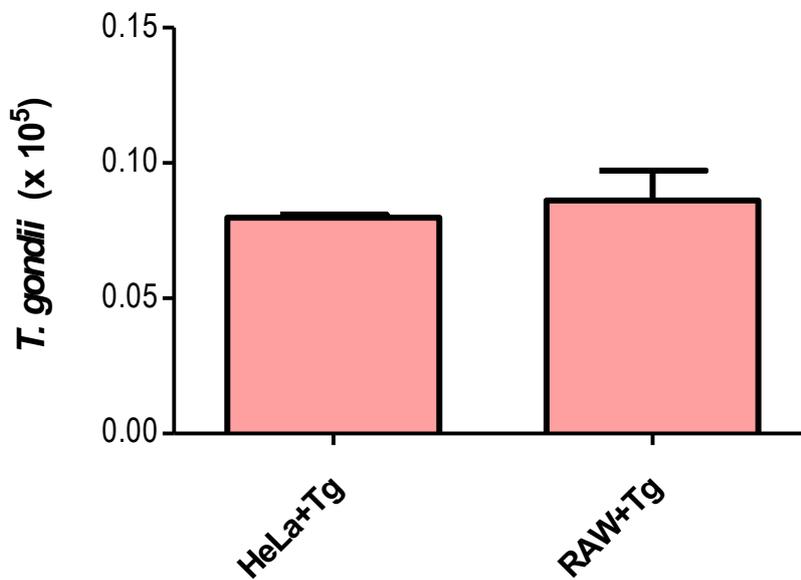


Figura 4. Proliferação de *T. gondii* em linhagens de células RAW 264.7 e HeLa. Células RAW 264.7 e HeLa (2×10^4 células/200 μ L/poço) foram cultivadas em microplacas de 96 poços por 3 h para adesão das células na placa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram infectadas com taquizoítas da cepa 2F1 de *T. gondii* na proporção 3:1 (parasitos:célula) e mantidas *overnight* (18 h) a 37 °C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram lavadas e lisadas com tampão específico. A quantificação de parasitos foi determinada por reação colorimétrica, utilizando-se o cromógeno CPRG (clorofenol vermelho β -D-galactopiranosídeo), comparando-se os dados obtidos a uma curva-padrão. A leitura da densidade óptica foi realizada em $\lambda = 570$ nm. Os resultados estão expressos como média \pm S.E.M dos dados obtidos em um experimento realizado em sextuplicata. As comparações entre o número de taquizoítas de *T. gondii* entre as duas linhagens foram analisadas utilizando-se o teste de *Mann Whitney* ($p > 0,05$).

A **figura 5** representa uma microplaca utilizada para os ensaios de proliferação e ilustra a coloração desenvolvida na reação colorimétrica entre a enzima β -galactosidase, expressa em taquizoítas da cepa 2F1, e o substrato cromógeno CPRG.

Os parasitos da cepa 2F1 de *Toxoplasma gondii* expressam constitutivamente a enzima citoplasmática β -galactosidase. Esta enzima catalisa a hidrólise de β -galactosídeos, incluindo lactose e o galactosídeo análogo clorofenol red- β -D-galactopiranosídeo (CPRG), de coloração amarelo-laranja, convertendo-o em galactose e no cromóforo vermelho clorofenol. Isto resulta em uma coloração vermelho-escuro, cuja absorbância é determinada a 570 nm. A D.O mensurada, correspondente à intensidade de cor desenvolvida, é uma medida indireta do número de parasitos. Quanto mais intensa a coloração em vermelho, maior a quantidade de parasitos.

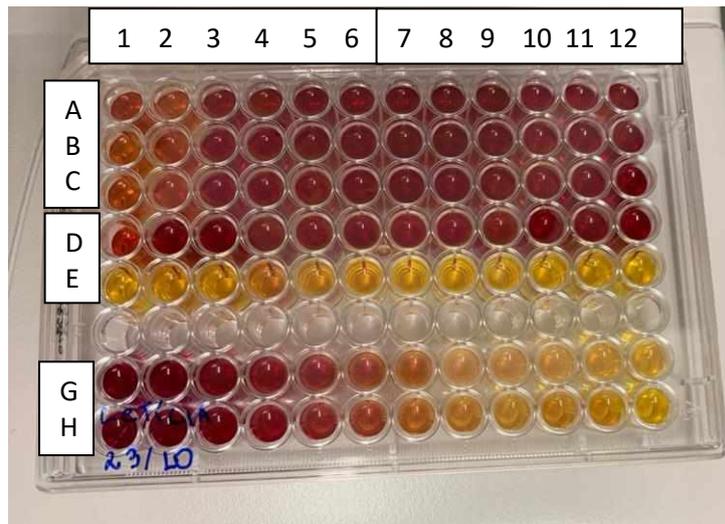


Figura 5. Microplaca ilustrativa da reação colorimétrica do ensaio de proliferação de *T. gondii* em células RAW 264.7. Colunas 1 a 12, linhas A, B, C: células RAW 264.7 (2×10^4 células/200 μ L/poço) + extrato *Annona crassiflora* (1000 a 0,487 μ g/mL) + *T. gondii* (6×10^5 parasitos/poço). Colunas 1 a 6, linha D: células RAW 264.7 + *T. gondii*. Colunas 7 a 11, linha D: células HeLa + *T. gondii*. Colunas 1 a 6 e 7 a 11, linha E: células RAW 264.7 e HeLa, respectivamente, não infectadas em meio RPMI 5%. Colunas 1 a 12, linhas G e H: curva-padrão, em duplicata, de taquizoítos em quantidades decrescentes/poço, a partir de uma suspensão de parasitos a $1 \times 10^5/50$ μ L/poço. A intensidade de cor desenvolvida é diretamente proporcional ao número de taquizoítos/poço.

7 Discussão

Neste estudo, para que fosse possível analisar a proliferação intracelular de *T. gondii* em células *RAW 264.7* previamente tratadas com o extrato aquoso de *Annona crassiflora*, verificou-se previamente o efeito do extrato, em diferentes concentrações, sobre a viabilidade dessas células. Para isso, usamos o ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol), o qual demonstrou que não houve citotoxicidade, em todas as concentrações testadas, e, embora, foi observada uma tendência à indução de proliferação celular, este efeito não foi estatisticamente significativo.

O ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) é amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular de vários tipos celulares, como no estudo de Cacciola et al. (2019), no qual foram utilizados extratos aquosos de casca de castanha para tratar seis linhagens celulares tumorais (DU 145, PC-3, LNCaP, MDA-MB-231, MCF-7 e HepG2) e uma linhagem celular epitelial da próstata normal (PNT2), e assim realizou-se a avaliação da viabilidade celular por meio desse ensaio de MTT.

Segundo Ribeiro et al. (2004), o MTT é um sal de tetrazolium que ao ser reduzido por enzimas desidrogenases, forma cristais de formazam solúveis em etanol, tendo sua forma oxidada com coloração amarela e a forma reduzida com coloração púrpura.

Liu et al. (2016) também fizeram um estudo com uma planta do gênero *Annona* sp., a *Annona muricata*, utilizando um extrato etanólico dessa planta para avaliar seus efeitos apoptóticos sobre células cancerígenas HepG2 do fígado. Para realizar a avaliação da viabilidade celular, também foi utilizado o ensaio de MTT.

A toxoplasmose, segundo Loo et al. (2017), atinge um grande número de animais de sangue quente, e estima-se que haja infecção, cronicamente, em até um terço da população humana do mundo. Porém, atualmente, existem poucas terapias eficazes contra a toxoplasmose, tais como a combinação dos medicamentos sulfadiazina e pirimetamina (DAVID; TIM, 2001 apud LOO et al., 2017), que causam efeitos colaterais hematológicos; outro tratamento é a combinação de trimetoprim e sulfametoxazol (cotrimoxazol), mas pode ocorrer passagem pela barreira placentária, sendo desencorajado para mulheres grávidas (MASTERS et al., 2003). Assim, evidenciamos a importância de buscar

novos tratamentos contra essa doença.

Uma alternativa de tratamento seria o uso de fitoterápicos, como é o caso da artemisinina, um produto extraído da planta *Artemisia annua*, e seus derivados, que segundo estudos realizados por Loo et al. (2017), revelaram-se uma forma de tratamento anti-protozoário de custo relativamente baixo e de baixa toxicidade, sendo promissores medicamentos contra protozoários, incluindo contra *T. gondii*, tanto de forma isolada ou, até mesmo, em combinação com os atuais anti-protozoários. Esse fato indica a possibilidade de outras plantas serem usadas para a infecção por *T. gondii*.

Além disso, como um mesmo produto da planta *Artemisia annua* é capaz de atuar contra vários protozoários, leva a possibilidade do tratamento com *Annona crassiflora*, se bem sucedido contra o *T. gondii*, ser eficaz contra outros protozoários que causam doenças importantes, como o *Neospora caninum*. Esse parasito é um protozoário apicomplexano, estritamente relacionado ao *T. gondii* (DUBEY et al., 1988 apud NARDONI et al., 2019), sendo de grande impacto na veterinária, pois, de acordo com Kobayashi et al. (2001), citado por Nardoni et al. (2019), ele é responsável por causar doença neuromuscular em cães e é considerado um importante agente abortivo em ruminantes.

Em estudos realizados por Mesquita e seus colaboradores (2005), avaliaram *in vitro* trinta e um extratos de plantas, consideradas medicinais, do Cerrado brasileiro, incluindo *Annona crassiflora*, para determinar suas atividades antiprotozoária contra promastigotas de *Leishmania donovani* e formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados relacionados a *Annona crassiflora* mostraram que extratos etanólicos de casca de raiz de *Annona crassiflora*, de acordo com os valores IC50 (média das inibições de um composto (50% de inibição), forneceram uma das maiores atividades contra as formas promastigotas de *L. donovani*, e sua atividade contra as formas amastigotas de *T. cruzi* indicou valores de IC50 variando de 5 a 10 µg / ml para os extratos etanólicos de madeira da raiz e de casca da raiz de *Annona crassiflora*. Também foram realizados ensaios preliminares de citotoxicidade sobre os animais, avaliando células L6, as quais mostraram que o extrato hexânico da casca de raiz de *Annona crassiflora* é fracamente citotóxica, dessa forma, pode-se considerar que os extratos de *Annona crassiflora* são eficientes contra os dois parasitas, como os medicamentos antiprotozoários comumente utilizados para esses

protozozoários. Nesse sentido, sugere-se uma possível relação do tipo de extrato utilizado, e o ensaio antiprotozoário realizado, com os efeitos farmacológicos obtidos por ele, pois nesse modelo experimental, os resultados observados com o extrato etanólico de *Annona crassiflora* inferem um potencial efeito antiprotozoário sobre *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi*, diferente do que foi relatado com extrato aquoso da mesma espécie vegetal contra o *T. gondii*, no presente estudo.

Há a possibilidade de que diferentes partes de *Annona crassiflora* gere diferentes efeitos sobre um mesmo parasito, como foi relatado no estudo feito por Pimenta et al. (2014), em que se avaliou a ação antimalárica de diferentes frações de *Annona crassiflora*, como acetogenina, alcaloides e frações ricas em flavonóides, utilizando modelo *in vivo* com camundongos infectados com *Plasmodium berghei* e, posteriormente, a toxicidade foi avaliada por ensaio de salmoura. Essas frações de *Annona crassiflora* foram administradas em doses de 12,5 mg / kg / dia, por quatro dias, nos animais. Foi relatado que as frações de madeira não apresentaram atividade antimalárica significativa e produziu alta toxicidade aos animais, enquanto as frações foliares demonstraram um tempo médio de sobrevivência (MST) dos camundongos infectados, maior do que os animais controle não tratados, indicando uma melhor eficácia e menor toxicidade do que as frações de madeira. As frações foliares, ricas em flavonóides, foram melhores na redução da parasitemia e indicam ser menos tóxicas que as frações ricas com acetogenina. Em relação a uma fração foliar em que alcalóides foram detectados, houve um aumento de MST dos animais tratados, além de reduzir a parasitemia. Assim, evidenciaram que as frações foliares ricas em alcalóides e flavóides apresentaram melhor ação antimalárica. Podemos considerar que a fração da planta utilizada no presente estudo não gerou o efeito esperado sobre o *T. gondii*, mas que se outra fração fosse usada, os efeitos poderiam ser diferentes.

Ao considerar os resultados obtidos neste estudo, a ausência de efeito antimicobrobiano pelo extrato da *Annona crassiflora*, foi observado em um trabalho feito por Takahachi et al. (2006), cujo objetivo foi avaliar atividade antibacteriana de espécies brasileiras da família Annonaceae, tais como *Xylopi frutescens*, *Xylopi aromatica*, *Xylopi amazônica*, *Xylopi benthamii*, *Annona ambotay*, *Annona crassiflora*, *Annona muricata* e *Annona Cherimólia*. Foram

colhidas de *Annona crassiflora* as sementes e as folhas para a preparação do extrato, sendo obtidos extratos de hexano de suas folhas e extrato etanólico de suas sementes. Os microorganismos utilizados foram *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de difusão em ágar. No total foram obtidos dezesseis extratos das plantas selecionadas, tais como extrato hexânico das folhas de *Annona crassiflora* (18,7% peso seco; TM3) e extrato etanólico das folhas de *Annona crassiflora* (41,0% em peso; TM12), os quais não apresentaram atividades antibacterianas, apenas mostrou no rastreio fitoquímico a presença de flavonóides em seus extratos ativos.

Em contrapartida, estudos realizados por Ribeiro et al. (2018), em que se avaliou os efeitos antimicrobianos de várias plantas do Cerrado brasileiro contra *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*, através do método de difusão em ágar-disco, realizado com triplicata, teve *Annona crassiflora* como parte da avaliação, utilizando os extratos aquoso e etanólico. O extrato etanólico com os taninos de *Annona crassiflora* apresentou antagonismo sobre todas as estirpes de *Staphylococcus* spp., o qual gerou grandes zonas de inibição. Além disso, em outro estudo realizado por Silva e seus colaboradores (2014), a atividade antibacteriana dos extratos das espécies *Bidens pilosa* e *Annona classiflora* foram avaliadas em modelos *in vitro* contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina, por meio dos métodos de difusão em ágar e microdiluição de caldo, tendo os extratos hidroalcoólicos de diferentes partes (casca, polpa, caule e folhas) de *Annona crassiflora* inibindo o crescimento dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina em ambos os métodos utilizados. Dessa forma, podemos observar a possível ação antimicrobiana do extrato de *Annona crassiflora*.

8 Conclusões

- ✓ O extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* não apresentou citotoxicidade em células RAW 264.7.
- ✓ O extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* não reduziu de modo estatisticamente significativo a proliferação de *T. gondii* em células RAW 264.7; contudo, nas maiores doses (500 e 1.000 µg/mL), o extrato mostrou tendência a reduzir a proliferação do parasito.

Referências

ANVISA. Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição, 2018.

ANVISA. POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, 2016.

ANTCZAK, M.; DZITKO, K.; DŁUGOŃSKA, H. Human toxoplasmosis–Searching for novel chemotherapeutics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 677-684, 2016.

ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; DE MORAIS, D. R.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food chemistry**, v. 245, p. 738-749, 2018.

ARRUDA, H. S.; SILVA, E. K.; PEREIRA, G. A.; ANGOLINI, C. F. F.; EBERLIN, M. N.; MEIRELES, M. A. A.; PASTORE, G. M. Effects of high-intensity ultrasound process parameters on the phenolic compounds recovery from araticum peel. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 50, p. 82-95, 2019.

BAILÃO, E. F. L. C.; DEVILLA, I. A.; DA CONCEIÇÃO, E. C.; BORGES, L. L. Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 23760-23783, 2015.

BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; FERRO, E. A.; NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SILVA, N. M. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both *in vitro* and *in vivo* experimental models. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 44-52, 2012.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G.; Manual Saunder: Clínica de Pequenos Animais. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2003.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **POLÍTICA E PROGRAMA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. Brasília – DF, 2016.

CACCIOLA, N.A.; SQUILLACI, G.; D'A POLITO, M.; PETILLO, O.; VERALDI, F.; LA CARA, F.; PELUSO, G.; MARGARUCCI, S.; MORANA, A. *Castanea sativa* Mill. Shells Aqueous Extract Exhibits Anticancer Properties Inducing Cytotoxic and Pro-Apoptotic Effects. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 3401, 2019.

CALIXTO, J. B; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A. R. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v. 2, p. 261-279, 2001.

CASTRO-FILICE, L. S; BARBOSA, B. F; ANGELONI, M. B; SILVA, N. M; GOMES, A. O; ALVES, C. M; SILVA, D. A; MARTINS-FILHO, O. A; SANTOS, M. C; MINEO, J. R; FERRO, E. A. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii*

infection in human villous explants. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, p. 12:132, 2014.

DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and Toxoplasma: implications for public health. **Zoonoses and public health**, v. 57, n. 1, p. 34-52, 2010.

DA COSTA OLIVEIRA, C.; DE CARVALHO VELOSO, C.; FERREIRA, R. C. M.; LAGE, G. A.; PIMENTA, L. P. S.; DUARTE, I. D. G.; ROMERO T.R.; DE CASTRO PEREZ, A. Peltatoside isolated from *Annona crassiflora* induces peripheral antinociception by activation of the cannabinoid system. **Planta medica**, v. 83, n. 03/04, p. 261-267, 2017.

DA COSTA OLIVEIRA, C.; DE MATOS, N. A.; DE CARVALHO VELOSO, C.; LAGE, G. A.; PIMENTA, L. P. S.; DUARTE, I. D. G.; DE CASTRO PEREZ, A. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the leaves of *Annona crassiflora* Mart. in mice. **Inflammopharmacology**, p. 1-12, 2018.

DA SILVA; E. A., DE MELO, D. L.; DAVIDE, A. C.; DE BODE, N.; ABREU, G. B.; FARIA, J. M.; HILHORST, H. W. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of botany**, v. 99, n. 5, p. 823-830, 2007.

DA SILVA, J. J.; CERDEIRA, C. D.; CHAVASCO, J. M.; CINTRA, A. B. P.; SILVA, C. B. P. D.; MENDONÇA, A. N. D.; CHAVASCO J. K. In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linne and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 4, p. 333-340, 2014.

DAVID, H.; TIM, G. Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide, Cambridge University Press Cambridge University Press. **Antitoxoplasma chemotherapy**. 2001:319–359

DE ANDRADE SILVA, C. A.; LACERDA M. P. F.; LEITE, R. S. R.; Fonseca, G. G. Physiology of *Lichtheimia ramosa* obtained by solid-state bioprocess using fruit wastes as substrate. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 4, p. 727-734, 2014.

DE MOURA, F.B.R.; JUSTINO A.B.; FERREIRA B.A.; ESPÍNDOLA F.S.; ARAÚJO F.A.; TOMIOSSO T.C. Pro-Fibrogenic and Anti-Inflammatory Potential of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* in Skin Repair. **Planta medica**, v. 85, n. 07, p. 570-577, 2019.

DE OLIVEIRA, T.; ROSTKOWSKA, C.; BÉLA, S. R.; FERRO, E. A.; MAGALHÃES, P. M.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models in vitro and in vivo. **Experimental parasitology**, v. 122, n. 3, p. 233-241, 2009.

DRAGANO, N. R. V.; DE VENANCIO, V. P.; DE ARAÚLO PAULA, F. B.; DELLA LUCIA, F.; DE OLIVEIRA FONSECA, M. J.; AZEVEDO, L. Influence of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of

mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. **Plant foods for human nutrition**, v. 65, n. 4, p. 319-325, 2010.

DRINIĆ, M.; WAGNER, A.; SARATE, P.; ZWICKER, C.; KORB, E.; LOUPAL, G.; SCHABUSSOVA, I. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-extract acts as a potent immunomodulator against allergic sensitization and airway inflammation. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15211, 2017.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUNAY, I.; GAJUREL, K.; DHAKAL, R.; LIESENFELD, O.; MONTOYA, J. G. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. e00057-17, 2018.

FERRAZ, C.A.; SILVA, D. B.; PRADO, L. C. D. S.; CANABRAVA, H. A. N.; BISPO-DA-SILVA, L. B. Antidiarrhoeic effect and dereplication of the aqueous extract of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Natural product research**, p. 1-5, 2017.

FERRAZ, C.; SILVA, D.; PRADO, L.; CANABRAVA, H.; BISPO DA SILVA, L. Antidiarrhoeic effect and dereplication of the aqueous extract of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Natural product research**, v. 33, n. 4, p. 563-567, 2017.

FIALHO C.; TEIXEIRA M.; DE ARAÚJO F. Toxoplasmose animal no Brasil, **Acta Scientiae Veterinariae**. V. 37, n. 1, p. 1-23, 2009.

FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. C.; VOLOBUFF, C. R. F.; SILVA, M. S.; MATOS, A. I.; CARDOSO, C. A. L.; CARVALHO, J. E. *In vitro* biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308-315, 2015.

FRANCO, P. S; GOMES, A. O; BARBOSA, B. F; ANGELONI, M. B; SILVA, N. M; TEIXEIRA-CARVALHO, A; MARTINS-FILHO, O. A; SILVA, D. A; MINEO, J. R; FERRO, E. A. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, v. 32, n. 11, p. 838-844, 2011.

GEBREMEDHIN, E.; KEBETA, M.; ASAYE, M.; ASHENAFI, H.; DI MARCO, V.; VITALE, M. First report on seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Central Ethiopia. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 59, 2015.

GILMAN, A. O. As bases farmacológicas da terapêutica .8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

GUHA, R.; MILEY, L.; ASPIRI M.; DHAMIJA, R. Congenital toxoplasmosis. **Pediatr Neurol**. 2017;70:81–2.

HONG, S.; LEE, H.; LEE, Y.; CHUNG, Y.; KIM, O. Anti-toxoplasmosis effect of

Dictamnus dasycarpus extract against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biomedical Research (JBR)**, v. 15, n. 1, p. 7-11, 2014.

JONES, G. W.; RICHARDSON, L. A.; UHLMAN, D. The invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. **Microbiology**, v. 127, n. 2, p. 351-360, 1981.

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; PEIXOTO, L. G.; VILELA, D. D.; CAIXETA, D. C.; DE SOUZA, A. V., ESPINDOLA, F. S. Hepatoprotective properties of a polyphenol-enriched fraction from *Annona crassiflora* Mart. fruit peel against diabetes-induced oxidative and nitrosative stress. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 22, p. 4428-4438, 2017.

JUSTINO, A.B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic chemistry**, v. 69, p. 167-182, 2016.

KOBAYASHI, Y.; YAMADA, M.; OMATA, Y.; KOYAMA, T.; SAITO, A.; MATSUDA, T.; OKUYAMA, K.; FUJIMOTO, S.; FURUOKA, H.; MATSUI, T. *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. **J. Parasitol.** 2001, 87, 434-436.

LAGE, G.A.; MEDEIROS, F. D. S.; FURTADO, W. D. L., TAKAHASHI, J. A.; FILHO, J. D. D. S.; PIMENTA, L. P. S. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Natural product research**, v. 28, n. 11, p. 808-811, 2014.

LIU, NA; YANG, H. L.; WANG, P.; LU, Y. C.; YANG, Y. J.; WANG, L.; LEE, S. C. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. **Journal of ethnopharmacology**, v. 189, p. 210-217, 2016.

LOO, C.; LAM, N.; YU, D.; SU, X.; LU, F. Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. **Pharmacological research**, v. 117, p. 192-217, 2017.

MACHADO, A. R. T.; FERREIRA, S. R.; DA SILVA MEDEIROS, F.; FUJIWARA, R. T.; DE SOUSA FILHO, J. D.; PIMENTA, L. P. S.. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 113, 2015.

MASTERS, P.A.; O'BRYAN T.A.; ZURLO, J.; MILLER D.Q.; JOSHI, N. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, n. 4, p. 402-410, 2003.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; FOURNET, A.; PAULA, J. E. D.; GRELLIER, P.; ESPÍNDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MONTAZERI, M.; MEHRZADI, S.; SHARIF, M.; SARVI, S.; TANZIFI, A., AGHAYAN, S. A.; DARYANI, A. Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2018.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NARDONI, S.; POLI, A.; VARVARO, I.; ROCCHIGIANI, G.; CECCHERELLI, R.; MANCIANTI, F. Detection of *Neospora Caninum* DNA in Wild Birds from Italy. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 202, 2019.

NEGRI D.; CIRILO M.; SALVARANE R.; NEVES M. 2008. Toxoplasmose em cães e gatos. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. Garça, SP: FAEF 1,1-7.

OMAR, G.; MOUHAMADOU, D.; BINETA, D.; AIDA, B.; SADIKH, B.; MARE, D.; AMBROISE, A.; NDIAYE, A.; THÉRÉSE, D.; PIERRE, L.; SOULEYMANE, M.; OUSMANE, S. Tea *Artemisia annua* inhibits *Plasmodium falciparum* isolates collected in Pikine, Senegal. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 7, n. 7, p. 107-112, 2013.

OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; DE PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; DE LIMA, M. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v 98, n. 13, p. 2549-2556, 2007.

PIMENTA, L. P. S.; GARCIA, G. M.; GONÇALVES, S. G. D. V.; DIONÍSIO, B. L.; BRAGA, É. M.; MOSQUEIRA, V. C. F. In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Natural product research**, v. 28, n. 16, p. 1254-1259, 2014.

RAMANAN, P.; SCHERGER, S.; BENAMU, E.; BAJROVIC, V.; JACKSON, W.; HAGE, C.; HAKKI, M.; BADDLEY, J.; ABIDI, M. Toxoplasmosis in non-cardiac solid organ transplant recipients: A Case Series and Review of Literature. **Transplant Infectious Disease**, 2019.

RATTER, J; RIBEIRO J; BRIDGEWATWER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Ann Bot**, v. 80: p. 223–230, 1997.

RIBEIRO, I. C. D. O.; MARIANO, E. G. A.; CARELI, R. T.; MORAIS-COSTA, F.; DE SANT'ANNA, F. M.; PINTO, M. S.; DUARTE, E. R. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 32, 2018.

RIBEIRO, M. O.; GOMES, M. D. S.; SENNA, S. G.; ROSSETTI, M. L. R.; FONSECA, L. D. S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas

de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. 4, 2004.

RODRIGUES, A. M. S.; DE PAULA, J. E.; DÉGALLIER, N.; MOLEZ, J. F.; ESPÍNDOLA, L. S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

ROCHA, R.S.; KASSUYA, C. A. L.; FORMAGIO, A. S. N.; MAURO, M. D. O.; ANDRADE-SILVA, M.; MONREAL, A. C. D.; OLIVEIRA, R. J. Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 1, p. 35-47, 2016.

SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 115-120, 2001.

SAMRAA, N.; MCCRINDLE, C.; PENZHORN, B.; CENCI-GOGA, B. Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 78, n. 3, p. 116-120, 2007.

SHEPARD, C. C. Phagocytosis by HeLa cells and their susceptibility to infection by human tubercle bacilli. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 90, n. 2, p. 392-396, 1955.

SILVA JUNIOR J.; CERDEIRA, C. D.; CHAVASCO, J. M.; CINTRA, A. B. P.; SILVA, C. B. P. D.; MENDONÇA, A. N. D.; CHAVASCO, J. K. *In vitro* screening antibacterial activity of *bidens pilosa* linné and *Annona crassiflora* mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (orsa) from aerial environment at the dental clinic. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v 56, n 4, pg 333 – 340, aug. 2014.

SILVA JÚNIOR M.C.S. 100 Árvores do Cerrado: guia de campo. Brasília: **Rede de Sementes do Cerrado**, p. 278, 2005.

SILVA, V.A.; ALVES, A. L. V.; ROSA, M. N.; SILVA, L. R., MELENDEZ, M. E.; CURY, F. P.; OLIVEIRA, B. G. Hexane partition from *Annona crassiflora* Mart. promotes cytotoxicity and apoptosis on human cervical cancer cell lines. **Investigational new drugs**, p. 1-14, 2018.

SOARES, A.; CARVALHO, L.; MELO, E.; COSTA, H.; VASCONCELOS, I.; OLIVEIRA, J. A protein extract and a cysteine protease inhibitor enriched fraction from *Jatropha curcas* seed cake have in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. **Experimental parasitology**, v. 153, p. 111-117, 2015.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**.111:A3.B.1-A3.B.3., 2015.

SWIERZY, I.; HANDEL, U.; KAEVER, A.; JAREK, M.; SCHARFE, M.; SCHLUTER, D.; LUDER, C. Divergent co-transcriptomes of different host cells infected with *Toxoplasma gondii* reveal cell type-specific host-parasite interactions. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 7229, 2017.

TACIAK, B.; BIALASEK, M.; BRANIEWSKA, A.; SAS, Z.; SAWICKA, P.; KIRAGA, T.; KROL, M. Avaliação da estabilidade fenotípica e funcional da linha celular RAW 264.7 através de passagens seriais. *PloS one*, v. 13, n. 6, p. e0198943, 2018.

TAKAHASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P.; BOAVENTURA M. A. D.; SILVA, L. G. E. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. **Natural Product Research**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2006.

TEO, C. F.; ZHOU, X. W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V. B. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51; p. 679-88, 2007.

VIEIRA, R.F.; COSTA, T.S.A.; SILVA, D.B.; FERREIRA, F.R.; SANO, S.M. Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, Brazil, 2006.

VILAR, J. B.; FERREIRA, F. L.; FERRI, P. H.; GUILLO, L. A.; CHEN CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141-147, 2008.

VILAR, J. B.; FERRI, P. H.; CHEN-CHEN, L. Investigação de genotoxicidade de araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) usando SOS-Inductest e teste de Ames. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 71, n. 1, p. 197-202, 2011.

WEINBERG, M. D. L. D.; PIRES, V.; WEINBERG, J.; DE OLIVEIRA, A. B. Inhibition of drug-induced contractions of guinea-pig ileum by *Annona crassiflora* seed extract. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 70-72, 1993.

YANG, N.; WANG, D.; XING, M.; LI, C.; LI, J.; WU, A.; CHEN, Q. Seroepidemiology and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* Infection among the Newly Enrolled Undergraduates and Postgraduate Students in China. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2092, 2017.

ZHENG, Y.; ZHANG, X.; HERNANDEZ, J.; MAHMMOD, Y.; HUANG, W.; LI, G.; WANG, Y.; ZHOU, X.; LI, X.; YUAN Z. Transcriptomic analysis of reproductive damage in the epididymis of male Kunming mice induced by chronic infection of *Toxoplasma gondii* PRU strain. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 529, 2019.