



Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinérgica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L. (araticum panã)

Antonio Adailson de Sousa Silva¹; Joana de Barros Alexandre¹; Larissa Guerra Vieira¹; Suliane Praciano Rodrigues¹; Maria José Cajazeiras Falcão¹; Selene Maia de Moraes^{1*}

¹Universidade Estadual do Ceará, (UECE), Centro de Ciências e Tecnologia, Curso de Química, Fortaleza, CE, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar as principais classes de compostos químicos presentes em *Annona glabra* L. (Araticum panã), e avaliar o seu potencial biológico analisando suas atividades antioxidante, antiacetilcolinesterase e leishmanicida. Para tanto, a entrecasca e sementes foram submetidas à extração em aparelho de Soxhlet com os solventes orgânicos hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se os respectivos extratos. Com os extratos foram realizados testes de prospecção fitoquímica, determinação da atividade antioxidante pelo método de inibição do radical livre DPPH e inibição da acetilcolinesterase em ensaio de cromatografia em camada delgada. Os testes de atividade leishmanicida *in vitro* em formas promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* foram realizados em placa de 96 poços em aparelho ELISA. Os extratos foram testados a 100 µg/mL. Os testes fitoquímicos revelaram a presença de esteroides, triterpenos, alcaloides, compostos fenólicos e saponinas. Todos os extratos apresentaram inibição da acetilcolinesterase e os extratos hexânicos de ambas partes mostraram maior percentual de inibição de *L. infantum chagasi*. Nestes extratos, compostos apolares como esteroides e triterpenos podem contribuir para a atividade leishmanicida. Os extratos de melhor atividade antioxidante foram o acetato de etila e metanólico da entrecasca e metanólico das sementes que correspondem aos que contêm compostos fenólicos. Conclui-se que *A. glabra* constitui uma fonte potencial de agentes leishmanicida com possível mecanismo de ação pela inibição da enzima acetilcolinesterase das membranas da *L. infantum chagasi*, causador da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: *Leishmania infantum chagasi*. *Annona glabra* L. Atividade leishmanicida.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum chagasi*. A LV é endêmica em 98 países ao redor do mundo. Nas Américas, o Brasil é o país com o maior número de casos de leishmanioses (WHO, 2010). A doença é propagada entre mamíferos, dos quais o homem não é um elo obrigatório e sim eventual, podendo este contrair a doença se entrar nesse elo (Brasil, 2006). No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris*) é o reservatório envolvido na manutenção do ciclo zoonótico. O diagnóstico clínico da LV Canina (LVC) é precário e complexo, pois os sinais da doença são variáveis e inespecíficos, comuns a outras enfermidades que acometem o cão. A imunossupressão causada por *Leishmania* spp. pode gerar infecções oportunistas, dificultando do mesmo modo o diagnóstico da LVC (Gallego, 2004).

No Brasil, há tratamento disponível apenas para humanos. Os medicamentos de primeira escolha são fármacos à base de antimônio pentavalente (Sb⁵⁺). No Brasil, o fármaco de primeira escolha para o tratamento da LV é o Sb⁵⁺ N-metil glucamina (Glucantime®). Outro Sb⁵⁺ muito empregado em outros países é o estibogluconato sódico (Pentostan®) (Brasil, 2006). A taxa de cura total com Sb⁵⁺ é maior que 90% (WHO, 2010), porém, seus mecanismos de ação ainda estão sendo desvendados (Frézard et al., 2009).

Um provável mecanismo de ação para os fármacos leishmanicidas poderia ser uma alteração nos níveis de colina, um precursor necessário para a formação de fosfatidilcolina, o fosfolípido mais abundante na membrana e no citoplasma da *Leishmania* spp. (Zufferey & Mamoun, 2002).

Frézard et al. (2005) propõe um mecanismo de ação para os antimoniais, mostrando que a glutatona, principal enzima antioxidante do organismo funcionaria reduzindo o Sb⁵⁺ a Sb³⁺. De acordo com esta proposta, o Sb⁵⁺ funcionaria como um pró-fármaco sendo reduzido por grupamentos tiois da glutatona a Sb³⁺ (forma ativa) no organismo (Demicheli & Frézard, 2005). A exemplo de outras doenças,

o indivíduo acometido pela leishmaniose apresenta um desequilíbrio nos mecanismos de oxirredução, podendo favorecer um intenso estresse oxidativo no organismo (Dröge, 2002; Lopes Neto, 2012). O estresse oxidativo poderá causar sérios danos aos tecidos (Huang et al., 2005). Portanto, substâncias antioxidantes poderão melhorar o quadro clínico do animal com LV, através da redução do estresse oxidativo, contribuindo para uma maior resistência do animal, assim como potencializar o efeito do antimônio.

Diversas plantas da família Annonaceae apresentam atividade leishmanicida, dentre estas se citam *Annona muricata* e *A. squamosa* (Vila-Nova et al., 2011). A família Annonaceae é constituída por cerca de 120 gêneros e aproximadamente 2.300 espécies. No Brasil, estão registrados 29 gêneros, compreendendo cerca de 260 espécies (Barroso, 1978). *Annona glabra* é encontrada principalmente na América do Sul e no Sudeste da Ásia e é usada na medicina popular como inseticida, no combate a parasitoses (Gallardo et al., 1998). Dois compostos diterpenoides, isolados de *Annona glabra*, ácido cunabico e ácido ent-kauran-19-al-17-oico inibiram a proliferação da linhagem SMMC-7721 de células HLC. O mecanismo foi correlacionado com a indução da apoptose celular pela diminuição da regulação da expressão do gene *bcl-2* e aumento da regulação do gene *bax* (Zhang et al., 2004). Em outro estudo, a atividade anticâncer foi comprovada (Cochrane et al., 2008). Alguns trabalhos apontam drogas anticâncer com atividade leishmanicida (Rath et al., 2003; Kaur et al., 2010), então, nesta perspectiva, este trabalho objetivou avaliar a atividade de extratos da espécie *A. glabra* em *L. infantum chagasi*, assim como, analisar a atividade antioxidante e antiacetilcolinesterase.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram utilizadas neste estudo, entrecasca e sementes do araticum panã (*Annona glabra* L.). As partes utilizadas foram coletadas no município de Itapipoca, Ceará. A excisada foi identificada e depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob o número 54.664.

Preparação dos extratos

Os extratos da entrecasca (14,8 g) e sementes secas (15,72 g) do araticum panã foram submetidos à extração em aparelho de soxhlet, usando 500 mL de cada solvente orgânico (PA) de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) por dez minutos cada solvente, nas respectivas temperaturas de ebulição de cada solvente. Os solventes foram evaporados para se obter respectivos extratos EH: extrato hexânico; EC: extrato clorofórmico; EAE: extrato acetato de etila e EM: extrato metanólico.

Testes fitoquímicos

Os testes fitoquímicos são feitos seguindo a metodologia proposta por Matos (2009). Para a realização destes testes 100 mg do extrato são adicionados em 100 mL de solução hidroalcoólica (etanol com 30% de água). Reagente de $FeCl_3$ para fenóis (9g de $FeCl_3$ em 50 mL de água e 2 mL de HCL 3M, completando com álcool etílico até 100 mL) - adicionam-se três gotas de solução alcoólica de $FeCl_3$ em um tubo de ensaio contendo a solução hidroalcoólica da amostra. Qualquer variação de cor ou formação de precipitado abundante escuro indica teste positivo. O teste em branco utilizado foi somente água e solução alcoólica de $FeCl_3$. O aparecimento de coloração variável entre o azul e vermelho é indicativa da presença de fenóis, quando o teste “branco” for negativo. A formação de precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (hidrolisáveis) e de tonalidade verde, a presença de taninos flavofênicos (condensados ou catéuquicos). Teste de Liberman Buchard para esteroides e triterpenos – no béquer contendo a solução hidro-alcoólica da amostra evaporada adiciona-se 1-2 mL de clorofórmio e 1 mL de anidrido acético, agitando suavemente, e cuidadosamente, acrescentam-se 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativo da presença de esteroides livres. A coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres. Teste para saponinas - ao material contido no béquer contendo a solução da amostra evaporada foram adicionados 5-10 mL de água destilada e filtrou-se para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente por 2-3 minutos e observou-se a possível formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos). Teste para alcaloides - A amostra foi dissolvida em HCL 0,1 M e dividida em três tubos de ensaio. A cada tubo foi adicionado respectivamente, três gotas dos reagentes de precipitação de alcaloides: “Hager”, “Mayer” e “Dragendorff”, observando a formação de precipitado característico. Precipitado floculoso, pesado em pelo menos um dos tubos é indicativo de alcaloides.

Teste antioxidante pela inibição do radical livre DPPH

A atividade antiradical utilizando o 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) foi determinada como descrito por Brand-Wiliams (1995). Em um tubo de ensaio, colocou-se 3,9 mL de uma solução metanólica de radical livre DPPH $6,5 \times 10^{-5} M$, em seguida foi adicionado ao tubo 0,1 mL de solução metanólica da amostra do extrato testado. Os extratos foram testados nas concentrações de 10.000, 5.000, 1.000, 500, 100, 50, 10 e 5 ppm. O teste foi feito em triplicata. As absorbâncias foram determinadas após 60 minutos de incubação na ausência de luz em temperatura ambiente em espectrofotômetro de marca Thermo, modelo Biomate 5, no comprimento de onda de 515 nm e utilizadas para calcular o índice varredor da amostra em percentual (IV%). O IV equivale à quantidade necessária de amostra para inibir o radical livre DPPH. Os valores

de IV encontrados foram aplicados no software Origin 7.0 para o cálculo da concentração que inibe 50% dos radicais livres da solução (IC_{50}). Usou-se a quercetina como padrão na mesma concentração dos extratos.

Teste qualitativo da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

O ensaio da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) baseia-se no método de Ellman et al. (1961) com pequenas adaptações para cromatografia em camada delgada por Rhee et al. (2001). Foram utilizadas soluções dos reagentes ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e iodeto de acetilcolina (ATCI) em tampão. As amostras foram aplicadas na cromatoplaça. Após evaporação do solvente, pulverizou-se o substrato (ATCI, 1mM em tampão) e o reagente de Ellman (DTNB, 1 mM em tampão). Após 3 a 5 minutos borrifou-se a enzima (3U/mL) e em 10 minutos a placa desenvolveu cor amarela. Halos brancos apareceram em torno das amostras indicando a inibição. Os halos foram medidos e comparados com o padrão, o alcaloide Fisostigmina.

Testes in vitro contra a forma promastigota de *Leishmania infantum chagasi*

Formas promastigotas de *L. infantum chagasi* foram cultivadas em meio Schneider (Sigma®) suplementado (gentamicina 40 mg/mL, 5% de urina humana masculina estéril, 10% de soro bovino fetal (FBF) [Cultilab®] e 10% de PBS). Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços com os compostos na concentração de 100µg/mL. Os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em meio Schneider (Sigma®). A concentração final de DMSO não excedeu 1%. Promastigotas de *L. infantum chagasi* foram usadas na concentração de 106 parasitas por poço em fase logarítmica. O medicamento de referência utilizado foi o glucantime. Os controles negativos foram realizados com 106 parasitas em meio Schneider (Sigma®) suplementado sem compostos. Os parasitas foram incubados a 26°C durante 48 horas e a viabilidade celular foi analisada através da conversão do sal solúvel tetrazólio MTT (brometo de 3 - [4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5 difeniltetrazólio) (Sigma®) em formazan insolúvel por enzimas mitocondriais. Vinte µl de MTT [5 mg/mL] por poço foram adicionados à cultura, mantida durante 4 horas a 26°C. Posteriormente, foi adicionado 100 µl de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%: álcool isopropílico (1:1). Após 15 minutos de agitação, foi feita a leitura da densidade óptica num leitor de Elisa de marca Beckman Coulter, modelo DTX 880, a 570 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata.

RESULTADOS

Das sementes secas de *A. glabra* obteve-se o extrato hexânico - EH (0,47g, 2,99%), o extrato clorofórmico - EC (1,39 g, 8,84%), o extrato com acetato de etila -EAE (0,27 g, 1,71%) e o extrato metanólico - EM (0,19 g, 1,21%).

A entrecasca forneceu o EH (1,57 g, 10,6%), o EC (0,14 g, 0,94%), o EAE (0,07 g, 0,47%) e EM (0,55 g, 3,71%). Ao serem analisados qualitativamente por prospecção fitoquímica estes extratos apresentaram em sua composição, principalmente, esteroides, triterpenos, alcaloides, fenóis e saponinas (tabela 1).

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH. O método baseia-se na redução da molécula do radical livre DPPH. Após o cálculo do índice de varredura em percentagem (IV%), os resultados foram aplicados software Origin 7.0 e a concentração que inibe cinquenta por cento do radical livre DPPH (IC_{50}) foi determinada. A tabela 2 apresenta os valores de IC_{50} de cada extrato. Os melhores resultados foram apresentados pelo EAE da entrecasca, o EM das sementes e o EM da entrecasca com concentração inibitória de 50% do radical DPPH (IC_{50}) entre 6,94 e 7,88 µg/mL.

Os extratos analisados da *A. glabra* apresentaram boa atividade leishmanicida, sendo que apenas o EM da entrecasca apresentou inibição relativamente baixa: 47,85%. O melhor resultado foi constatado com o EH da entrecasca, com 80,17% de inibição na concentração de 100µg/mL. Em geral, os extratos que apresentaram maior efeito leishmanicida apresentam maior halo de inibição de enzima acetilcolinesterase. A medida da atividade antiacetilcolinesterásica é dada pela medida em centímetros (cm) dos halos de inibição das amostras. Os extratos testados apresentaram inibição da acetilcolinesterase, o que pode sugerir um possível mecanismo de ação (tabela 2).

DISCUSSÃO

Os extratos de *A. glabra* apresentam como constituintes principais, esteroides, triterpenóides, alcaloides, saponinas e compostos fenólicos. Vários exemplos destes tipos de compostos são descritos na literatura como apresentando atividade leishmanicida (Cham-Bacab & Rodríguez-Peña, 2001). Quanto à atividade antioxidante, os extratos de *A. glabra* apresentaram moderada atividade. O padrão utilizado foi a quercetina, composto que pertence à classe dos flavonoides mais comuns e se destaca pelo seu grande potencial antioxidante. Os extratos de melhor atividade antioxidante foram o acetato de etila e metanólico da entrecasca e metanólico das sementes que correspondem aos que contem compostos fenólicos.

É constante a busca de novos fármacos com ação leishmanicida, principalmente pela alta toxicidade dos fármacos de primeira escolha, como o glucantime e pentamidina (WHO, 2010). Assim, plantas medicinais tornam-se alvos de testes, devido aos seus constituintes, que possuem ação inibitória. De maneira geral, todos os extratos demonstraram bons resultados. Contudo, traçando um comparativo entre os extratos testados, os extratos hexânicos da entrecasca e das sementes possuem melhor capacidade inibitória (80,17% ± 0,50 e 78,82 ± 0,11% respectivamente) e clorofórmico das sementes (77,22 ± 1,27%). Esses resultados foram comparados com o

Tabela 1- Componentes químicos das frações da *Annona glabra* L.

Parte usada	Extratos	Esteróides	Triterpenos	Alcalóides	Saponinas	Fenólicos
Entrecasca	EH		X			
	EC	-	X	X		
	EAE	-	-	X	X	Xa
	EM	X		X	X	Xab
Sementes	EH	X				
	EC	X				
	EAE	X				
	EM			X	X	Xc

EH: extrato hexânico; EC: extrato clorofórmico; EAE: extratos acetato de etila; EM: extrato metanólico.

^aPresença de catequinas; ^bPositivo para antocianinas, antocianidinas, chalconas e auronas; ^cPresença de flavononas e taninos condensados.Tabela 2 - Atividade leishmanicida, antiacetilcolinesterase e antioxidante dos extratos da *Annona glabra* L.

Parte usada	Extratos	% de inibição de <i>L. infantum chagasi</i> (100µg/mL) ± DP	Inibição da AChE [cm]	IC ₅₀ (µg/mL) do DPPH ^a
Entre-casca	EH	80,17 ± 0,50	0,7	78,6 ± 2,21
	EC	64,38 ± 3,95	0,7	17,25 ± 1,06
	EAE	64,73 ± 4,56	0,6	6,94 ± 0,19
	EM	47,85 ± 2,74	0,8	7,88 ± 0,06
Sementes	EH	78,82 ± 0,11	0,7	112,6 ± 22,4
	EC	77,22 ± 1,27	0,8	64,4 ± 7,41
	EAE	75,69 ± 0,95	0,6	16,92 ± 1,16
	EM	70,31 ± 0,22	0,8	7,55 ± 2,11
Glucantime ^b		13,95 ± 2,06	-	-
Fisostigmina ^b		-	0,9	-
Quercetina ^b			0,23 ± 0,01	

EH: extrato hexânico; EC: extrato clorofórmico; EAE: extrato acetato de etila; EM: extrato metanólico.

^a IC₅₀: Concentração inibitória que reduz 50% do radical livre DPPH^b Droga padrão

(-) = não foi testado

glucantime, fármaco de primeira escolha para o tratamento da LV. Todos os extratos testados apresentaram maior atividade leishmanicida do que o fármaco padrão, o que evidencia o potencial da *A. glabra* como fonte de moléculas promissoras no combate à LV. Nos extratos hexânico e clorofórmico, de menor polaridade, foram encontrados triterpenos e esteroides para os quais já existem relatos de suas ações leishmanicidas (Cham-Bacab & Rodríguez-Peña, 2001). Outros compostos de baixa polaridade comuns na família Annonacea são as acetogeninas e muitas delas apresentam ação leishmanicida, estando possivelmente presentes na *A. glabra*. Como exemplos, a *Annona muricata* (graviola) e *A. squamosa* (fruta de conde, ata) apresentam acetogeninas com atividade leishmanicida relevante (Vila-Nova et al., 2011).

Esses dados destacam a importância dos compostos encontrados na *A. glabra*, uma vez que além de terem atividade direta sobre o parasito *L. infantum chagasi*, substâncias com potencial antioxidante, como os extratos de *A. glabra* melhoram o quadro clínico do paciente, ao reduzir o estresse oxidativo que se encontra aumentado na leishmaniose. Além desta vantagem, há uma possível

potencialização dos antimoniais pentavalentes por moléculas antioxidantes, como é o caso da glutatona, que Frézard et al. (2005) apontam uma possível redução do antimônio pentavalente para trivalente (10 vezes mais ativo) pelo antioxidante natural glutatona. Portanto, moléculas naturais encontradas nos extratos do araticum panã, podem ser úteis no tratamento da LV como terapia ou associadas a um pentavalente, potencializando este último.

Os leishmanicidas atuais, ainda não foram bem elucidados. Os antimoniais pentavalentes parecem atuar no mecanismo bioenergético das formas amastigotas da leishmaníase, por meio de glicólise e beta-oxidação, que ocorrem nas organelas denominadas glicossomas. Outro mecanismo aventado é o de ligação com sítios sulfidrílicos, deflagrando a morte destes protozoários (Berman et al, 1985). Outro possível mecanismo de ação dos agentes leishmanicidas seria a inibição da enzima acetilcolinesterase. A *L. infantum chagasi* necessita de colina para sintetizar esteróis de membrana. A inibição da enzima acetilcolinesterase, resulta em um declínio de colina e conseqüentemente, a membrana do parasito perde a consistência, podendo sofrer lise (Vila-Nova et al., 2011).

A constatação da inibição da enzima da AChE pelo método de cromatografia em camada delgada é possível através da observação de halos brancos nas substâncias que inibem a enzima. A medida da atividade antiacetilcolinesterásica é dada pela medida em centímetros (cm) dos halos de inibição das amostras. Os extratos metanólicos da entrecasca e das sementes e clorofórmico das sementes apresentaram ótima ação anticolinesterásica, com halos de 0,8 cm, quando comparadas ao padrão fisostigmina que apresentou um halo de 0,9 cm. O resultado é considerado satisfatório porque as medidas dos halos são maiores do que 50% da medida do halo encontrado para o padrão utilizado, apontando a inibição desta enzima como um possível mecanismo de ação dos extratos de *A. glabra*.

CONCLUSÃO

Os extratos de *A. glabra* quando comparados ao padrão glucantime apresentaram *in vitro* resultados promissores em formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, bem como mostraram atividade antiacetilcolinesterase, o que sugere um possível mecanismo de ação. Este estudo mostrou o potencial leishmanicida dos extratos da planta mencionada. Futuros estudos químicos dos extratos são importantes para o isolamento dos compostos responsáveis pelas ações determinadas neste trabalho.

Todos os extratos apresentaram inibição da acetilcolinesterase e os extratos hexânicos de ambas partes mostraram maior percentual de inibição de *L. chagasi*. Os extratos de melhor atividade antioxidante foram o acetato de etila e metanólico da entrecasca e metanólico das sementes que correspondem aos que contem compostos fenólicos. Portanto compostos apolares como triterpenos, esteroides e acetogeninas são os possíveis responsáveis pela ação leishmanicida e os compostos fenólicos pela atividade antioxidante.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agencias de fomento à pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP) e do Governo Federal - CNPq e FINEP pelo suporte financeiro a projetos e bolsas PQ, IC e AT.

ABSTRACT

Phytochemical study and leishmanicidal, anticholinesterase and antioxidant activities of Annona glabra L. (araticum panã) extracts

The aim of this study was to investigate the main types of chemical constituents present in *Annona glabra* L. (*araticum panã*) and evaluate its biological potential by analyzing the antioxidant, antiacetylcholinesterase and anti*Leishmania* activities. For this, the sapwood and seeds were subjected to extraction in soxhlet apparatus using the following organic solvents: hexane,

chloroform, ethyl acetate and methanol for obtaining the respective extracts. These extracts were submitted to phytochemical prospection, antioxidant tests by scavenging the free radical DPPH, acetylcholinesterase inhibition assay on TLC plates. The *in vitro* anti*Leishmania* assay in *Leishmania infantum chagasi* promastigotes were performed in a 96 well plate in an ELISA instrument. The extracts were tested at 100 µg/mL. Phytochemical investigation revealed the presence of sterols, triterpenes, alkaloids, phenolic compounds and saponins. All extracts showed inhibition of acetylcholinesterase, and hexane extracts of both parts presented more action in *L. infantum chagasi*. The extracts with better antioxidant action were ethyl acetate and methanol extracts of the sapwood and methanol extract of seeds, which correspond to those, which contains phenolic compounds. In conclusion, *A. glabra* constitutes a potential source of anti*Leishmania* agents with possible mechanism of action by inhibiting the acetylcholinesterase in the membranes of *L. infantum chagasi* responsible for visceral *Leishmaniasis*

Keywords: *Leishmania infantum chagasi*. *Annona glabra* L. Leishmanicidal activity.

REFERÊNCIAS

Barroso GM. Sistemática de Angiosperma do Brasil. São Paulo: LTC, 1978;1:28-33.

Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the anti*Leishmania* activity of sodium stibogluconate. Antimic Agents Chemother. 1985;27:916-20.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of and free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. Food Sci Technol. 1995;28:25-30.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

Cham-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat Prod Rep. 2001;18:674-88.

Cochrane CB, Nair PK, Melnick SJ, Resek AP, Ramachandran C. Anticancer effects of *Annona glabra* plant extracts in human leukemia cell lines. Anticancer Res. 2008;28(2A):965-71.

Demicheli C, Frézard F. Novas embalagens para medicamentos à base de antimônio usados no tratamento de Leishmaniose e esquistossomose. Cad Tem Quím Nova na Escola. 2005;6:24-30.

Dröge W. Free radical in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002;82(1):47-95.

Recebido em 14 de fevereiro de 2014

Aceito em 7 de abril de 2014

Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr A, Featherstone, RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.

Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*, 2009;14:2317-36.

Frézard F, Schettini DS, Rocha OGF, Demicheli C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quím Nova*. 2005;28(3):511-8.

Gallardo T, Aragon R, Tormo JR, Blazquez MA, Zafra-Polo MC, Cortes D. Acetogenins from *Annona glabra* Seeds. *Phytochem.* 1998;47(5):811-6.

Gallego M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitas: las leishmaniosis. *Rev Sci Tech Off Int Epi.* 2004;23(2):661-76.

Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005;53(6):1841-56.

Kaur S, Sachdeva E, Dhuria S, Sharma M, Kaur T. Anti-*Leishmanial* effect of cisplatin against murine visceral *Leishmaniasis*. *Parasitol Intern.* 2010;59:62-9.

Lopes Neto BE. Avaliação do estresse oxidativo na leishmaniose visceral canina. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceara, Fortaleza, 2012.

Matos FJA. Introdução à Fitoquímica Experimental. UFC. Fortaleza-Ceará, 45pp. Ed. UFC, 2009.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC, Andrade Júnior HF, Tempone AG. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado de arte. *Quím Nova*. 2003;26(4):550-5.

Rhee IK, Meen M, Ingkaninan K, Verpoorte R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatog.* 2001;915:217-23.

Vila-Nova NS, Morais SM, Falcão MJC, Machado LKA, Beviláqua CML, Costa IRS, Brasil NVGPS, Andrade Junior HF. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44:567-71.

WHO. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of *Leishmaniases*, Geneva, 22–26 March, 2010.

Zhang YH, Peng HY, Hia GH, Wang MY, Han Y. Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* Linn. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(7):937-42.

Zufferey R, Mamoun CB. Choline transport in *Leishmania* major promastigotes and its inhibition by choline and phosphocholine analogs. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;125:127-34.