

# Fitoterapijski potencijal gravirole

---

Jerković Ivešić, Ivana

Professional thesis / Završni specijalistički

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:292735>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-02-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Jerković Ivešić

**FITOTERAPIJSKI POTENCIJAL  
GRAVIOLE (*Annona muricata* L.)**

Specijalistički rad

Zagreb, 2020.

**POSILIJEDIPLOMSKI SPECIJALISTIČKI STUDIJ:  
FITOFARMACIJA S DIJETOTERAPIJOM**

Mentor rada: prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

Specijalistički rad obranjen je dana 26. veljače 2020. na  
Zavodu za farmakognoziju, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Željani Maleš
2. prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević
3. prof. dr. sc. Zdenka Kalodera, prof. emerita

Rad ima 52 lista.

## **Predgovor**

Specijalistički rad je izrađen pod vodstvom prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević, na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na pomoći i uloženom vremenu pri izradi specijalističkog rada.*

*Mom suprugu, mojim roditeljima i prijateljima, te djelatnicima ZU Ljekarne PrimaPharme, hvala za bezuvjetnu podršku tijekom specijalističkog studija.*

# SAŽETAK

## Fitoterapijski potencijal graviole (*Annona muricata* L.)

### Cilj istraživanja

Cilj ovog specijalističkog rada je pregled podataka o nekliničkim i kliničkim studijama biljne vrste *Annona muricata* L. (Annonaceae).

### Materijal i metode

Istraživanje u okviru ovog rada je teorijskog karaktera i uključuju pregled dostupne znanstvene i stručne literature o predloženoj temi. U pretraživanju su korištene bibliografske baze podataka kao što su: Current Contents, ScienceDirect, Scopus, PubMed, Medline i Cocharen Library.

### Rezultati

Graviola, zimzeleno drvo rasprostranjeno uglavnom u tropskim i subtropskim područjima, ima dugu povijest tradicionalne primjene. Fitokemijskim istraživanjima ustanovljena je prisutnost acetogenina, megastigmana, alkaloida, polifenola i eteričnog ulja. Dokazano je da posjeduje brojne biološke učinke: pospješuje zacjeljivanje rana, štiti jetru i sluznicu probavnog trakta, smanjuje povišeni krvni tlak, šećer i lipide te djeluje antikancerogeno, protuupalno, imunomodulacijski, antimikrobno i antiparazitno. Provedeno je samo nekoliko kliničkih studija koje ne pružaju dovoljnu razinu dokaza o terpijskoj učinkovitosti graviole.

### Zaključci

Iako mnogi znanstveni dokazi upućuju na blagotvorne učinke graviole na ljudsko zdravlje, potrebne su daljnje studije kojima će se ustanoviti njezini mehanizmi djelovanja, terapijska učinkovitost i sigurnost primjene.

## SUMMARY

### **Phytotherapeutic potential of graviola (*Annona muricata* L.)**

#### **Objectives**

The aim of this work was to present the data on the conducted preclinical and clinical studies of *Annona muricata* L. (Annonaceae).

#### **Material and methods**

Research in this paper is a theoretical one and includes a detailed overview of the available professional and scientific data on the topic. Relevant bibliographic database such as Current Contents, ScienceDirect, Scopus, PubMed, Medline and Cocharen Library are searched.

#### **Results**

Graviola is an evergreen tree that is mostly distributed in tropical and subtropical regions of the world with a long history of traditional use. Phytochemical studies revealed the presence of acetogenins, megastigmanes, alkaloids, polyphenols and essential oil. Graviola has been proven to possess a wide spectrum of biological activities: wound healing, hepatoprotective, gastroprotective, antihypertensive, antidiabetic, hypolipidemic, anticancer, anti-inflammatory, immunomodulatory, antimicrobial and antiparasitic. Only a few clinical studies have been performed that do not provide sufficient evidence of its therapeutic efficacy.

#### **Conclusions**

Although many scientific evidence indicate the beneficial effects of graviola on human health, future studies are required to established its mechanism of action, therapeutic efficacy and safety.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA</b> .....	1
1.1. Botanički podaci o vrsti <i>Annona muricata</i> L. ....	2
1.2. Bioaktivne sastavnice gravirole .....	4
1.2.1. Acetogenini .....	4
1.2.2. Alkaloidi .....	6
1.2.3. Megastignami .....	7
1.2.4. Eterično ulje .....	8
1.2.5. Flavonoidi i fenolne kiseline .....	9
1.2.6. Ostali spojevi .....	10
1.3. Tradicionalna primjena gravirole .....	12
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	15
<b>3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI</b> .....	16
3.1. Neklinička istraživanja gravirole .....	17
3.1.1. Hipoglikemijski i hipolipemični učinak .....	17
3.1.2. Antihipertenzivni učinak .....	18
3.1.3. Anthelmintični učinak .....	19
3.1.4. Insekticidno djelovanje .....	20
3.1.5. Gastroprotektivni i hepatoprotektivni učinak .....	20
3.1.6. Utjecaj na proces zacjeljivanja rana .....	21
3.1.7. Utjecaj na smanjenje tjelesne mase .....	21
3.1.8. Protuupalni, analgetski i antipiretički učinak .....	21
3.1.9. Imunomodulacijski učinak .....	22
3.1.10. Antidepresivni učinak .....	23
3.1.11. Antioksidacijski učinak .....	23
3.1.12. Antivirusni učinak .....	24
3.1.13. Antimikrobni učinak .....	24
3.1.14. Antitumorski učinak .....	25
3.2. Klinička istraživanja gravirole .....	28
3.2.1. Randomizirane kontrolirane studije .....	28
3.2.2. Prikaz slučajeva .....	29
3.3. Nuspojave i interakcije s lijekovima .....	31
<b>4. RASPRAVA</b> .....	32
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	35
<b>6. LITERATURA</b> .....	36
<b>7. ŽIVOTOPIS</b> .....	46

## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Biljna vrsta *Annona muricata* L. (graviola) pripada porodici Annonaceae. Zimzeleno je drvo rasprostranjeno u tropskim i suptropskim područjima. Daje velike jestive plodove koji se, zajedno s listovima, korom, korijenom i sjemenkama, koriste i u tradicionalnoj medicini za liječenje različitih bolesti, posebice karcinoma i infekcije parazitima (1, 2). Glavne aktivne sastavnice gravirole su acetogenini, derivati masnih kiselina s 35 i 38 C-atoma jedinstvene kemijske strukture, kojima se pripisuju protutumorska svojstva. *In vitro* i *in vivo* znanstvena istraživanja ukazala su na široki spektar potencijalnih učinaka koji uključuju citotoksična, anthelmintična, protuupalna i antipiretička svojstva gravirole (3). Plodovi danas predstavljaju važnu sirovinu za prehrambenu industriju u proizvodnji pića i slatkiša, ali se sve više koriste u proizvodnji dodataka prehrani koji se već nekoliko godina nalaze i na tržištu Republike Hrvatske. Iako su registrirani u kategoriji dodataka prehrani i nema dostatnih kliničkih dokaza o terapijskom djelovanju, često im se pripisuju moćna terapijska svojstva u jačanju imuniteta i borbi protiv karcinoma. Stoga je cilj ovog rada dati sveobuhvatan pregled znanstvenih spoznaja ovoj bilnoj vrsti i njenim farmakološki aktivnim sastavnicama.



## 1.1. Botanički podaci o vrsti *Annona muricata* L.

Graviola je zimzeleno drvo prosječne visine 5-10 m. Raste na tlu bogatom vodom i mineralnim tvarima u područjima gdje prevladava suptropska i tropska klima. Ima razgranat korijenski sustav koji svojom veličinom premašuje promjer krošnje, međutim, ne prodire duboko u tlo već iz površinskih slojeva upija potrebnu vodu i mineralne tvari. Vanjska kora je siva do smeđesiva, u mladim stabala glatka, starenjem postaje gruba i prožeta fisurama. Unutarnja kora je blijedoružičaste boje. Na granama su naizmjenično poredani kožasti, eliptični listovi s kratkim peteljka (slika 1). Žućkasto zeleni cvjetovi sastavljeni su od šest latica poredanih u dva kruga po tri latice. U vanjskom krugu latice su srcastog oblika, mesnate, s grubim rubovima, dok manje i tanje latice konkavnog oblika čine unutarnji krug. Plodovi su dugi 14-40 cm, široki 10-18 cm, mogu težiti i do 7 kg. Nezreli plodovi su tamnozeleni, a zrenjem dobivaju žućkasto zelenu boju. Površina im je sjajna i prekrivena bodljama. Sočni bijeli mezokarp može sadržavati i do 200 ovalnih sjemenki koje su sjajne, crne ili tamnosmeđe, do 2 cm duge (slika 2).

Graviola je autohtona biljna vrsta Srednje i Južne Amerike te Karipskog otočja. Uspješno se kultivira i u zemljama središnje Afrike poput Kameruna, Etiopije, Gane, Nigerije, Tanzanije i Obale Bjelokosti te u zemljama jugoistočne Azije, primjerice, u Indiji, Indoneziji, Filipinima i Tajlandu (4, 5). Na području Latinske Amerike poznata je pod nazivima *guanábana*, *catuche*, *huanaba* i *zopote de viejas*, u Brazilu kao *graviola*, *coração da rainha* ili *jaca do pará*, na Filipinima kao *babana*, na području Indonezije kao *nangka seberang* ili *nangka belanda*, a u Africi pod imenima *dukumé porto*, *pawpaw brasileña* i *ebom beti* (6, 7).



Slika 1. *Annona muricata* L. - graviola  
(<https://twitter.com/nafoods/status/681781685365506048>)



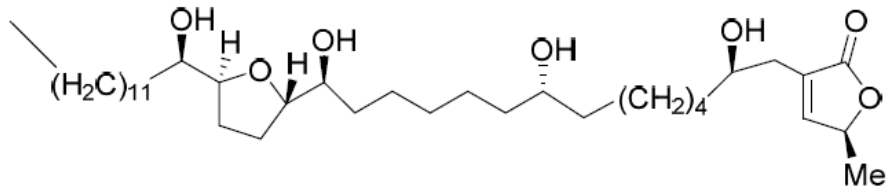
Slika 2. Graviolin cvijet i plod (<https://www.caraibe-agricole.com>)

## **1.2. Bioaktivne sastavnice graviole**

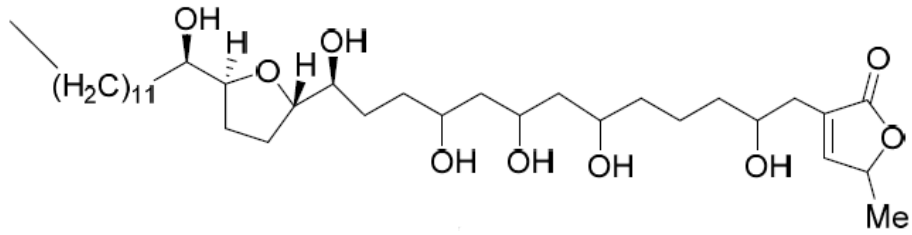
Biljna vrsta *Annona muricata* L. bogata je biološki aktivnim spojevima. Najzastupljenije skupine odgovorne za njezina ljekovita svojstva su acetogenini, alkaloidi, megastigmani, flavonoidi i fenolne kiseline. Graviola u manjim postocima sadrži i amide, ciklopeptide, vitamine, karotenoide i minerale (7, 8).

### **1.2.1. Acetogenini**

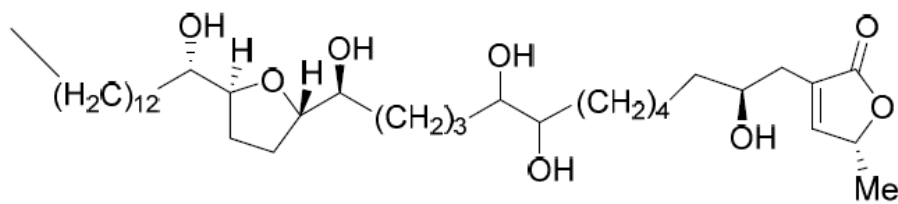
Acetogenini su spojevi karakteristični za porodicu Annonaceae kojima se pripisuju antitumorska i citotoksična svojstva. Prvi otkriveni acetogenin bio je uvaricin koji je 1982. godine izoliran iz biljne vrste *Uvaria accuminata* Oliv. Osnovna građevna jedinica acetogenina je alifatski lanac od 30-38 ugljikovih atoma koji sadrži terminalno vezan  $\gamma$ -laktonski prsten. Posjeduju također brojne hidroksilne i keto skupine te 1-2 tetrahidrofuranska prstena (slika 3). U listovima, plodovima, sjemenkama i korijenu graviole identificirano oko 120 acetogenina, a među njima najzastupljeniji je anonacin (7, 8).



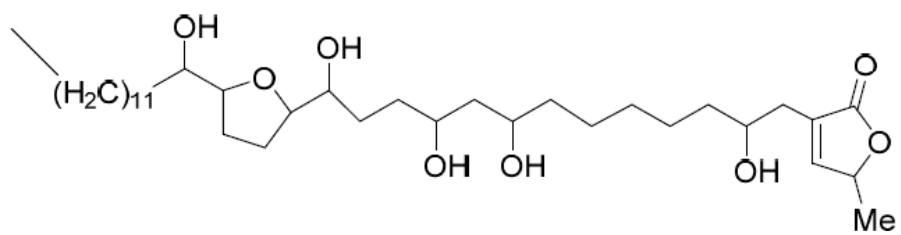
anonacin A



anoheksocin



anomuricin A

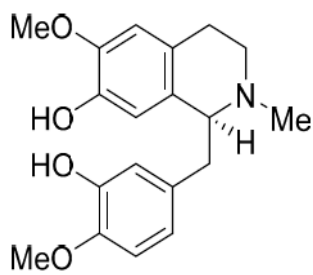


murikatocin A

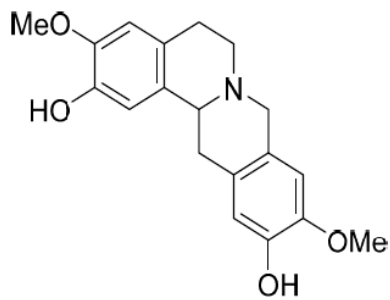
Slika 3. Struktura odabranih acetiacetogenina izoliranih iz graviole (8)

### 1.2.2. Alkaloidi

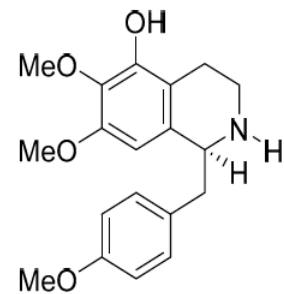
Graviola uglavnom sadrži alkaloide aporfinskog, protoberberinskog i izokinolinskog tipa, a najzastupljeniji su retikulin i koreksimin (slika 4). Većina alkaloida nalazi se u listovima, međutim, u manjim su postocima prisutni i u plodovima, korijenu te kori gravirole. Istraživanja pokazuju da posjeduju citotoksični i antidepresivni učinak (7, 8).



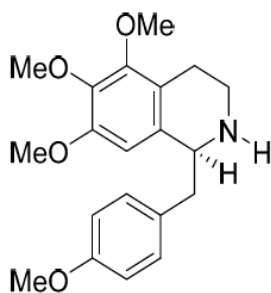
retikulin



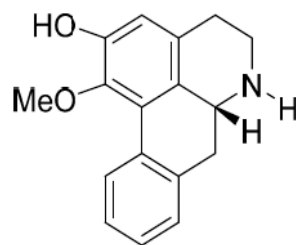
koreksimin



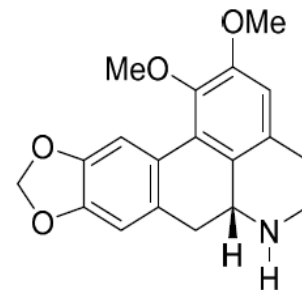
anomuricin



anomurin



asimilobin

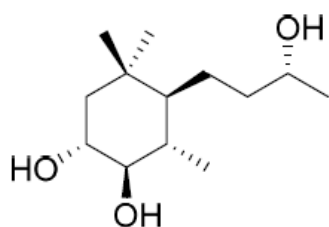


normuciferin

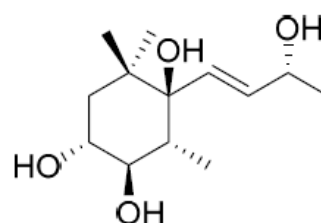
Slika 4. Strukture odabranih alkaloida izoliranih iz graviole (8)

### 1.2.3. Megastigmani

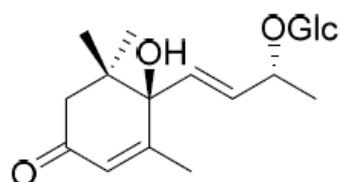
Megastigmani su izonorterpeni, spojevi srodni seskviterpenima, koji u svojoj strukturi sadrže 13 ugljikovih atoma (slika 5). Nalaze se u listovima gravirole, a osnovna građevna jedinica im je šesteročlani prsten ugljikovih atoma koji ima dvije metilne skupine na položaju C1 te jednu metilnu skupinu na položaju C5. Na taj se prsten na položaju C6 veže butilni lanac koji sadrži jednu dvostruku vezu između C-7 i C-8 te jednu hidroksilnu skupinu na položaju C-9 (9).



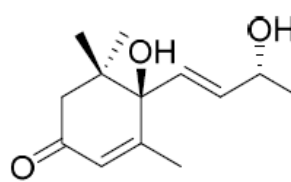
anoionol A



anoionol B



rozeozid

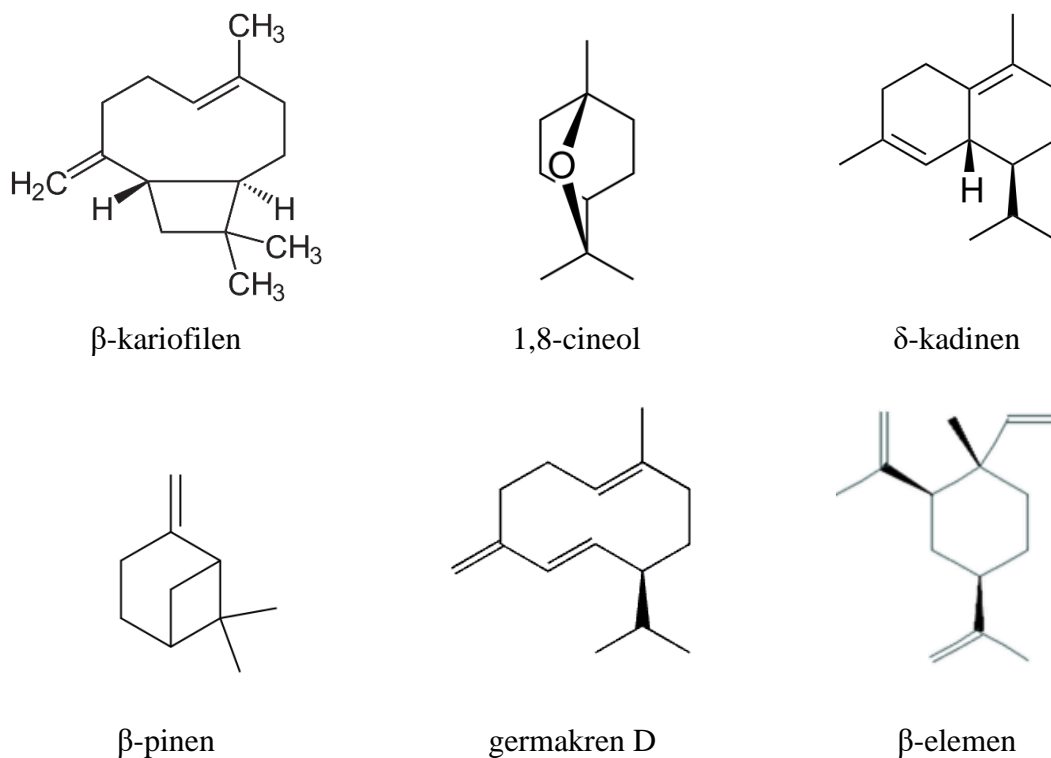


vomifoliol

Slika 5. Primjeri kemijskih struktura megastigmana izoliranih iz gravirole (8)

#### 1.2.4. Eterično ulje

Listovi i plodovi graviole sadrže i vrlo malu količinu eteričnog ulja. Jedno od najranijih istraživanja eteričnog ulja graviole provedeno je 1994. godine. Péliissier i suradnici (10) su ustanovili da je eterično ulje izolirano iz listova bogato seskviterpenima, osobito  $\beta$ -kariofilenom. Plodovi istog uzorka iz Obale bjelokosti sadržavali su eterično ulje u kojem dominiraju alifaske masne kiseline te esteri poput metil-heksanoata. Glavne sastavnice eteričnog ulja usplođa graviole iz Kameruna bile su  $\beta$ -kariofilen (12,7%), 1,8-cineol (9,9%), linalol (7,8%),  $\alpha$ -terpineol (2,8%) te esteri alifatskih kiselina (11). Eterično ulje listova graviole ubranih u Nigeriji sadržavalo je seskviterpene poput  $\beta$ -kariofilena,  $\beta$ -elemena,  $\alpha$ -humulena,  $\alpha$ -muurolena, germakrena, izokariofilena i  $\delta$ -kadinena te alkohole elemol, globulol,  $\alpha$ -epi-kadinol i  $\alpha$ -kadinol. Najzastupljenije sastavnice su  $\beta$ -kariofilen (13,6 %),  $\delta$ -kadinen (9,1 %),  $\alpha$ -kadinol (8,3 %) i  $\alpha$ -muurolen (3,5 %) (12). Za razliku od navedenih rezultata, u eteričnom ulju listova graviole iz Vijetnama prevladavali su monoterpeni  $\beta$ -pinen (20,6 %), germakren D (18,1 %), p-menta-2,4(8)-dien (9,8 %),  $\alpha$ -pinen (9,4 %) i  $\beta$ -elemen (9,1 %). Dosadašnji rezultati pokazali su da se afrički biljni uzorci značajno razlikuju od azijskih uzoraka te da geografsko porijeklo značajno utječe na kromatografski profil eteričnog ulja (13). Slika 6 prikazuje odabrane glavne sastavnice eteričnog ulja afričkih i azijskih uzoraka.

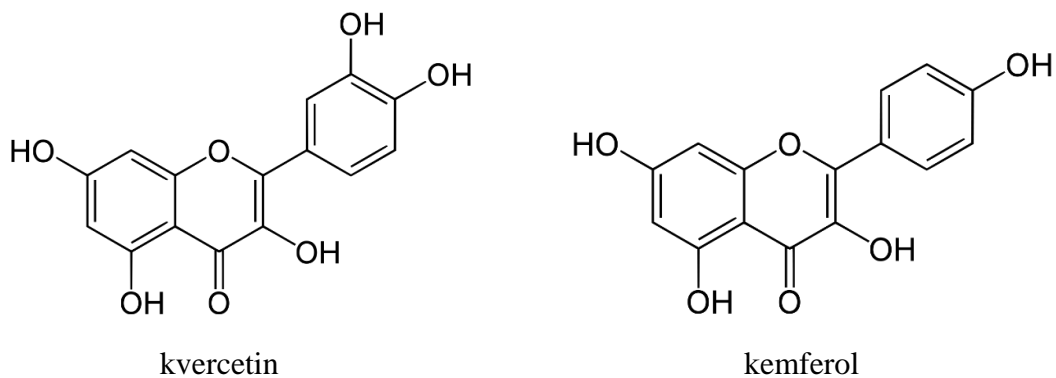


Slika 6. Strukture odabranih glavnih sastavnica eteričnog ulja gravirole  
(<https://commons.wikimedia.org/>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

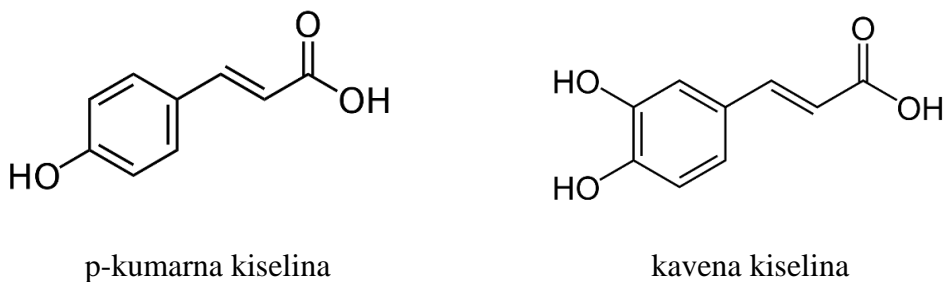
### 1.2.5. Flavonoidi i fenolne kiseline

Do danas je u listovima i plodovima gravirole identificirano 37 različitih fenolnih spojeva, najvećim dijelom flavonoida i fenolnih kiselina kojima se pripisuju protuupalna i antioksidacijska svojstva gravirole (7, 14). U plodovima su prisutni derivati hidroksicimetne i kavene kiseline te p-kumarna kiselina, dok su u listovima iz skupine flavonoida najzastupljeniji kvercetin i kemferol te njihovi glikozidni derivati (7, 8).





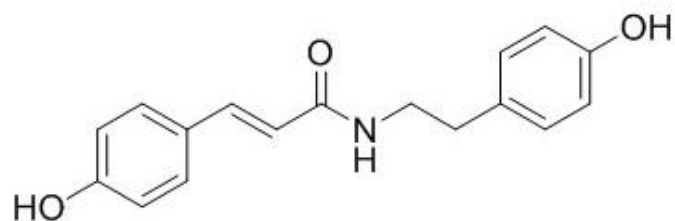
Slika 2. Strukture glavnih flavonoida prisutnih u gravioli  
 (<https://en.wikipedia.org>)



Slika 8. Fenolnih kiselina prisutne u gravioli  
 (<https://en.wikipedia.org>)

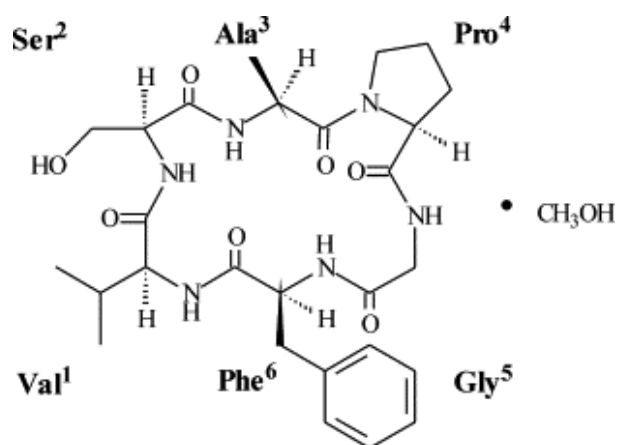
### 1.2.6. Ostali spojevi

Listovi, pulpa plodova i sjemenke graviole u manjem postotku sadrže vitamine i karotenoide. U sjemenkama su također prisutni amidi i ciklopeptidi. Slike 9 i 10 prikazuju N-p-kumaroil-tiramin i anomurikatin. Vitamini i karotenoidi imaju antioksidacijski učinak, dok amidi i ciklopeptidi djeluju protuupalno. Graviola sadrži također mikronutrijente poput bakra, kalcija, kalija, magnezija, natrija i željeza koji su važni za održavanje homeostaze u ljudskom organizmu (7, 8).



N-p-kumaroil-tiramin

Slika 9. Struktura odabranog amida izoliranog iz graviolinih sjemenki  
(<http://www.chemfaces.com/natural>)



anomurikatin A

Slika 10. Struktura odabranog ciklopeptida izoliranog iz graviolinih sjemenki  
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022286006005114>)

### **1.3. Tradicionalna primjena graviole**

U tradicionalnim sustavima liječenja diljem svijeta koriste se listovi, kora, korijen, plodovi i sjemenke graviole, najčešće u obliku dekokta. U subsaharskim tropskim zemljama kao što je Uganda, koriste se svi dijelovi biljke u liječenju malarije, bolova u trbuhu, parazitskih infekcija, dijabetesa i raka. Graviola zauzima važno mjesto i u tradicionalnom liječenju malarije u drugim tropskim zemljama kao što je Kamerun, Toga i Vijetnam (15, 16). U Gani je graviola dio biljne mješavine koja se stavlja u kupelj trudnicama prije porođaja (17), a u Indoneziji, na Karipskim otocima i zemljama južnog Pacifika kod kožnih oboljenja (18). Lokalna primjena listova na bolna mjesta zabilježena je u Novoj Gvineji, Ekvadoru i na Mauricijusu (19, 20). U svrhu ublažavanja boli uzima se dekokt listova u Brazilu, Martiniku, Meksiku i Nikaragvi, a u nekim zemljama kao što su Benin, Kuba i Karibi služi kod prehlade, gripe i astme (15, 14). Osim kao hrana, sok dobiven iz plodova se koristi u Južnoj Americi u liječenju proljeva, bolesti srca i jetre te protiv crijevnih parazita. Američki indijanci su koristili listove u liječenju kožnih i unutarnjih parazita (15, 21). U posljednje vrijeme, ljekovita svojstva graviole vežu se za liječenje povišenog krvnog tlaka, dijabetesa i raka (15, 22-24). Osim u medicinske svrhe, pripravci na bazi graviole se primjenjuju kao biopesticidi, bioinsekticidi i repelenti (15). Tablica 1 donosi detaljan prikaz tradicionalne primjene graviole.

Tablica 1. Primjena gravirole u tradicionalnoj medicini (7, 18, 25, 26)

Država/regija	Biljni organ	Ljekoviti oblik	Tradicionalna primjena
<b>Benin</b>	list, sjemenka, kora, korijen	dekoka	katari dišnih puteva; nesаница vrućica
<b>Bolivija</b>	list	dekoka	hipertenzija; bubrežne bolesti
	plod	sok	
<b>Brazil</b>	list	dekoka	bolovi; neuralgija; dijareja; hipertenzija; mršavljenje
		infuz	karcinom; teškoće pri disanju mršavljenje
	list	macerat za topikalnu primjenu	ugriz zmije
	plod	sok	dijareja; dizenterija; poticanje laktacije
<b>Ekvador</b>	list	oblozi	reumatski bolovi
<b>Filipini</b>	list	dekoka	hipertenzija; dijabetes; kašalj; hipersekrecija želučane kiseline; karcinom
<b>Jamajka</b>	list, plod	dekoka	dijareja; dizenterija; paraziti; astma; grčevi; poticanje izlučivanja urina i laktacije
<b>Južni Pacifik</b>	list	infuz	probavne tegobe
		kupka	kožne bolesti
		inhalacija	vertoglavica
<b>Kamerun</b>	list	dekoka	probavne tegobe; malarija; paraziti; tifus; grčevi
<b>Karibi</b>	list, kora	/	probavne tegobe; grčevi; gripa anksioznost
	list	kupka	kožne bolesti
<b>Kuba</b>	list	dekoka (u mlijeku ili vodi)	karcinom; problemi s prostatom; hipertenzija; artritis i reumatski bolovi; gripa; astma; kašalj; dijabetes; dijareja; poticanje laktacije
<b>Martinik</b>	list	dekoka	flatulencija; bolesti jetre
		kupka	upala; kožne bolesti
<b>Meksiko</b>	list	infuz	bronhitis; astma; dijareja; dizenterija
	list	dekoka	probavne tegobe; abdominalni bolovi
	plod	sok	dizenterija; dijabetes
<b>Nikaragva</b>	list	dekoka i infuz	vrućica; pojačano menstrualno krvarenje; dijareja
		topikalno	kožne bolesti; bolovi u leđima

Nastavak Tablice 1

Država/regija	Biljni organ	Ljekoviti oblik	Tradicionalna primjena
<b>Panama</b>	kora, usplode	dekoka	dijareja; dispepsija; želučani ulkus; alergije
<b>Peru</b>	list	infuz	dispepsija; gastritis; dijabetes; grčevi karcinom urinarne infekcije; bubrežne bolesti; pretilost
	plod	sok	
<b>Tajland</b>	list, plod	infuz	hipertenzija
<b>Trinidad i Tobago</b>	list	/	hipertenzija
<b>Uganda</b>	list	infuz	dijabetes
	plod	sok	
<b>Vanuatu</b>	list	infuz i kupka	svrab
<b>Veliki i Mali Antili</b>	list	dekoka	astma; dijareja; kožne bolesti; poticanje laktacije; anksioznost
<b>Venezuela</b>	list	dekoka	abdominalni bolovi; oštećenje jetre
<b>Vijetnam</b>	list	infuz	malarija
<b>Zapadna Afrika</b>	list	dekoka	Dijareja; dizenterija; anksioznost; iritacija nazofarinksa

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Danas se na tržištu Europske unije, pa tako i u Republici Hrvatskoj, nalaze dodaci prehrani koji sadrže graviolu. Pripisuju im se ljekovita svojstva koja često nisu potkrijepljena znanstvenim dokazima ili se rezultati provedenih znanstvenih istraživanja proizvoljno tumače. U promociji ovih proizvoda posebice se ističe njihova pozitivna uloga u liječenju karcinoma uglavnom temeljem rezultata nekliničkih studija. Stoga je cilj ovog specijalističkog rada dati pregled dosadašnjih fitokemijskih i bioloških istraživanja gravirole kako bi se sa stanovišta fitoterapije temeljene na dokazima mogli donijeti relevantni zaključci o terapijskom potencijalu ove biljke.

### **3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI**

Istraživanja u okviru ovoga specijalističkog rada teorijskog su karaktera i uključuju pregled dostupne literature o suvremenim znanstvenim istraživanjima biljne vrste *Annona muricata* L. U pretraživanju su korištene elektronske bibliografske baze podataka kao što su: Current Contents, ScienceDirect, Scopus, PubMed, Medline, Cocharen Library i Lexicomp. Prikupljeni podaci su proučeni i sistematično prikazani, a obuhvaćaju fitokemijske podatke o gravioli te relevantna neklinička i klinička istraživanja.

### 3.1. Neklinička istraživanja gravirole

#### 3.1.1. Hipoglikemijski i hipolipemični učinak

Provedeno je ispitivanje hipoglikemijskog i antioksidacijskog učinka etanolnog ekstrakta listova gravirole u uvjetima *in vitro*. Ustanovljeno je da ekstrakt posjeduje dobru antioksidacijsku aktivnost te inhibira enzim  $\alpha$ -amilazu, zbog čega pokazuje potencijal u liječenju dijabetesa i pratećih komplikacija. Smatra se da su za antidijabetički učinak gravirole zaslužni polifenoli (27).

Pinto i suradnici (28) istražili su djelovanje masnog ulja izoliranog iz sjemenki gravirole na *in vitro* i *in vivo* modelima šećerne bolesti tipa 1, odnosno na kulturi krvnih stanica dobivenih od pacijenata kojima je dijagnosticiran dijabetes te na pokusnim životinjama kojima je ova bolest izazvana streptozotocinom. Pokusne životinje podijeljene su u četiri skupine: (i) miševi s dijabetesom koji ne dobivaju ulje sjemenki gravirole, (ii) dijabetični miševi kojima se tijekom 48 sati *per os* aplicira 1 mg/kg ulja sjemenki gravirole, (iii) miševi s dijabetesom koji ne dobivaju pripravak gravirole, (iv) kontrolna skupina. Ispitivanje je pokazalo da ulje graviolinih sjemenki snižava razinu glukoze u krvi te djeluje protektivno na jetrene stanice i  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića gušterače. Rezultati ispitivanja su također ukazali na imunomodulacijska svojstva ulja sjemenki gravirole budući da je tijekom ispitivanja zabilježen pad razine interferona- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) u kulturi krvnih stanica te porast razine interleukina IL-4 i IL-10 u kulturi stanica slezene.

Adeyemi i suradnici (29, 30) svojim su istraživanjima pokazali da metanolni ekstrakt listova gravirole snižava razinu glukoze u krvi te da potiče regeneraciju  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače pokusnih životinja kojima je streptozocinom izazvan dijabetes. Prije nekoliko godina provedena je slična studija na štakorima koja je pokazala da i vodeni ekstrakt listova gravirole djeluje protektivno na  $\beta$ -stanice (31).



Pored hipoglikemijskih svojstava, Adeyemi i suradnici (32) istraživali su u dijabetičnih štakora i njihov lipidni profil nakon primjene metanolnog ekstrakta listova gravirole. Istraživanje je pokazalo da ekstrakt gravirole značajno snižava razinu triglicerida, LDL, VLDL i ukupnog kolesterola u krvi te povisuje razinu HDL-kolesterola. Nadalje, ispitan je učinak gravirole na razinu ukupnog kolesterola u krvi i masu pretilih štakora soja Wistar. Prva i druga skupina pokusnih životinja dnevno su dobivale vodeni ekstrakt listova gravirole u dozama od 200 i 400 mg/kg. Treća skupina primala je simvastatin i služila je kao pozitivna kontrola, dok su četvrta i peta skupina bile negativna kontrola, odnosno u tim skupinama pokusni štakori nisu tretirani. Studija je pokazala da ekstrakt listova gravirole utječe na razinu ukupnog kolesterola u krvi te da inhibira porast tjelesne mase pokusnih štakora (33).

Objavljeno je i istraživanje čiji je cilj bio ispitati hipoglikemijski učinak dviju različitih doza etanolnog ekstrakta kore gravirole te njihov učinak na lipidni profil animalnih modela kojima je izazvan dijabetes tipa 2. Djelovanje ekstrakta uspoređeno je s djelovanjem poznatog i često propisivanog antidijabetika glibenklamida koji je oralno apliciran kontrolnoj skupini u dozi od 500 µg/kg. Dobiveni rezultati ukazali su na potencijal gravirole za daljnja istraživanja antidijabetičkog djelovanja (34).

### **3.1.2. Antihipertenzivni učinak**

U jednom istraživanju objavljenom 2012. godine ispitan je antihipertenzivni učinak vodenog ekstrakta listova gravirole na animalnom modelu. Ekstrakt je u ovisnosti o dozi doveo do značajnog sniženja krvnog tlaka bez smanjivanja broj otkucaja srca. Iako mehanizam antihipertenzivnog djelovanja gravirole nije sasvim razjašnjen, pretpostavljeno je da se temelji na antagonističkim reakcijama prema kalcijevim ionima (35).

### 3.1.3. Anthelminitični učinak

Ekstrakti gravirole u velikom su broju istraživanja pokazali terapijski potencijal u liječenju Chagasove bolesti, leišmanijaze i malarije, infekcija uzrokovanih parazitima koje danas predstavljaju globalni zdravstveni problem (36). Graviola se prema etnofarmakološkim i etnobotaničkim podacima prikupljenim u pojedinim afričkim zemljama već dugo upotrebljava kao tradicionalni lijek protiv malarije (37). Antiplazmodični učinak pentanskog, etanolnog i vodenog ekstrakta listova gravirole te drugih biljnih vrsta koje se često primjenjuju u afričkoj tradicionalnoj medicini ispitan je na uzročniku malarije, parazitu koji pripada vrsti *Plasmodium falciparum*, na soju osjetljivom na klorokin te soju koji je rezistentan na klorokin. Pentanski ekstrakt je pokazao je najpotentniji antiplazmodični učinak (38).

Metanolni ekstrakti cvjetova, listova te perikarpa i pulpe plodova gravirole u jednom su ispitivanju pokazali antiplazmodično djelovanje na kulturi stanica W2 soja vrste *Plasmodium falciparum* koji se pokazao rezistentnim na tradicionalne antimalarike (39, 40). Vodeni ekstrakt listova djelovao je anthelmintično na jajašca, ličinke i odrasle jedinke vrste *Haemonchus contortus*, a odgovornost za učinak pripisana je fenolnim spojevima (41). Metanolno-vodeni ekstrakt sjemenki uzrokovao je toksični učinak na promastigote i amastigote vrste *Leishmania chagasi*, a autori smatraju da su acetogenini i alkaloidi gravirole odgovorni za navedeni antiparazitni učinak (42). Nadalje, acetogenini iz listova gravirole pokazali su antiparazitno djelovanje i na druge parazite iz roda *Leishmania*, kao što su *L. donovani*, *L. major* i *L. mexicana* (43). Metanolni, heksanski i etil-acetatni ekstrakti perikarpa plodova gravirole djelovali su antiparazitno na promastigote vrsta *L. braziliensis* i *L. panamensis*. Učinak ekstrakata na parazite roda *Leishmania* uspoređen je s djelovanjem antiprotozoalnog lijeka meglumin-antimonata koji je u ispitivanju korišten kao standard. Ustanovljeno je da etil-acetatni ekstrakt posjeduje najjači antiparazitni učinak koji nadmašuje čak i antiparazitno djelovanje poredbenog lijeka (44).

#### **3.1.4. Insekticidno djelovanje**

U dosadašnjim istraživanjima ispitano je insekticidno djelovanje ekstrakata listova, cvjetova, sjemenki, kore i korijena gravirole, uz pretpostavku da su za učinak odgovorni acetogenini, alkaloidi i masne kiseline (7). Etanolni ekstrakt listova djelovao je toksično na insekte *Callosobruchus maculatus* te za puža vrste *Biomphalaria glabrata* koji u tropskim i subtropskim krajevima prenosi uzročnika shistosomijaze, parazita *Schistosoma mansoni* (45, 46). Osobito snažan larvicidni učinak pokazao je etanolni ekstrakt sjemenki gravirole na insekte *Blatella germanica* (smeđi žohar), *Leptinotarsa decemlineata* (krumpirova zlatica), *Myzus persicae* (zelena breskvina uš) te na *Aedes aegypti* (egipatski komarac) koji u tropskim krajevima prenosi uzročnike denga groznice (47, 48). Etanolni ekstrakt sjemenki gravirole djelovao je sinergistički s etanolnim ekstraktom plodova papra (*Piper nigrum* L.) na larve vrste *Aedes aegypti*. Iako mehanizam djelovanja ove kombinacije nije do kraja razjašnjen, biološki učinak se vrlo vjerojatno može pripisati acetogeninima i piperamidima (49).

#### **3.1.5. Gastroprotektivni i hepatoprotektivni učinak**

Etanolni ekstrakt listova gravirole na animalnim modelima smanjio je ulcerozne lezije te pokazao antinociceptivno djelovanje, a oba su učinka bila ovisna o dozi (50). Ispitano je hepatoprotektivno djelovanje gravirole na pokusnim štakorima podijeljenim u sedam skupina. Prvoj skupini je tijekom sedmodnevnog ispitivanja oralno aplicirana destilirana voda. U svim ostalim skupinama štakorima je izazvano oštećenje jetre istovremenom primjenom tetraklorugljika i visoke doze paracetamola. Druga skupina je poslužila kao kontrola, dok je trećoj, četvrtoj, petoj i šestoj skupini oralno apliciran vodeni ekstrakt listova gravirole u različitim koncentracijama (50, 100, 200 i 400 mg/kg). Sedma skupina primila je 100 mg/kg silimarina koji je u ispitivanju korišten kao standard. Ekstrakt gravirole snizio je ukupni kolesterol i trigliceride, pomogao u ponovnoj uspostavi funkcije jetre te doveo do normalizacije razine jetrenih enzima poput alkalne fosfataze i alanin-aminotransferaze (51).

Pokazalo se da vodeni ekstrakt listova gravirole također može sniziti koncentraciju bilirubina, što ukazuje na potencijal u terapiji žutice (52).

### **3.1.6. Utjecaj na proces zacjeljivanja rana**

Etanolni ekstrakt listova gravirole pokazao je protuupalni učinak na pokusnim životinjama kojima su na površini kože izazvane rane (53). Paarakh i suradnici (54) su tijekom dvanaest dana pratili učinak etanolnog ekstrakta kore gravirole na animalnim modelima s otvorenim površinskim ranama. Već je nakon četiri dana uočeno smanjenje površine kože koja je zahvaćena ranama (55).

### **3.1.7. Utjecaj na smanjenje tjelesne mase**

Prema dostupnim etnobotaničkim i etnofarmakološkim podacima, u pojedinim regijama Brazila pretili ljudi ili oni s viškom kilograma od davnina uzimjua infuz ili dekoka listova gravirole, s ciljem smanjenja tjelesne mase (25, 56). Iako graviola sadrži biološki aktivne spojeve s hipoglikemijskim, hipolipemičnim i antioksidacijskim djelovanjem, do danas nije poznato koje njezine komponente pridonose smanjenju tjelesne mase niti koji je njihov mehanizam djelovanja, stoga je potrebno provesti daljnja istraživanja te klinički ispitati ima li graviola potencijal u liječenje pretilosti.

### **3.1.8. Protuupalni, analgetski i antipiretički učinak**

Protuupalno djelovanje etanolnog ekstrakta listova gravirole Cho i suradnici (57) ispitali su u uvjetima *in vitro* na modelu makrofaga s lipopolisaharidima izazvanim upalnim odgovorom. Rezultati su pokazali da ekstrakt značajno snižava razine NF- $\kappa$ B, dušikovog oksida (NO) te drugih proupalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 te da također dovodi do smanjenja ekspresije dvaju enzima, ciklooksigenaze-2 (COX-2) te NO-sintaze.

Protuupalno djelovanje etanolnog ekstrakta listova gravirole ispitano je i na pokusnim miševima i štakorima kojima su ksilenom izazvani edem uha i artritis. Studije su pokazale da ekstrakt smanjuje razinu proupalnih citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  te da pokazuje obećavajući potencijal u liječenju akutne i kronične upale (58). Objavljena je studija čiji je cilj bio ispitati protuupalno i analgetsko djelovanje liofiliziranog ekstrakta pulpe nezrelih plodova gravirole na pokusnim miševima kojima je ksilenom izazvan edem uha i karagenanom izazvan edem šapa. Miševi su tretirani ekstraktom u dozama 50, 100 i 200 mg/kg. Rezultati su pokazali da ekstrakt nezrelih plodova gravirole posjeduje protuupalni i analgetski učinak budući da smanjuje edeme i inhibira ciklooksigenazu 1 i 2 (COX-1 i COX-2), enzime važne u patogenezi boli (59).

Znanstvenici su se također zapitali može li graviola sniziti povišenu tjelesnu temperaturu. Shastry i suradnici (60) usporedili su djelovanje vodenog i etanolnog ekstrakta listova gravirole na pokusnim životinjama. Etanolni ekstrakt u dozi 500 mg/kg postigao je značajniji antipiretički i analgetski učinak u odnosu na vodeni ekstrakt. Flavonoidi, trjeslovine, terpeni iz eteričnog ulja te spojevi steroidne strukture istaknuti su kao nositelji analgetskog i antipiretičkog učinka. Jedno novije istraživanje provedeno je na štakorima soja Wistar kojima je povišena temperatura izazvana suspenzijom pivskog kvasca. Pokusne životinje podijeljene su u četiri skupine. Jedna je skupina dobivala *per os* destiliranu vodu, druga 100 mg/kg acetilsalicilne kiseline, dok je preostalim skupinama apliciran vodeni ekstrakt listova gravirole u dozama od 200 i 400 mg/kg. Rezultati dobiveni nakon rektalnog mjerenja temperature pokusnih životinja pokazali su da pri ispitanim dozama graviola djeluje antipiretički (61).

### **3.1.9. Imunomodulacijski učinak**

Učinak metanolnog ekstrakta listova gravirole ispitan je na staničnoj kulturi monocita THP-1. Ekstrakt nije pokazao učinak na proliferaciju makrofaga. U ovisnosti o koncentraciji poticao je sintezu dušikovog oksida (NO) te proupalnih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 (62).

Među dvadeset odabranih biljnih vrsta iz Malezije, Harun i suradnici (63) istražili su *in vitro* učinak graviole na stanicama leukocita CD18. Stanice su označene fluorescein izotiocijanatom, potom je ispitan učinak metanolnog ekstrakta kore ploda na fagocitozu leukocita te na ekspresiju staničnih receptora CD18/11a. Rezultati su pokazali da ekstrakt u koncentraciji 100 µg/mL najbolje stimulira fagocitozu leukocita, što ukazuje na moguću sposobnost modulacije imunskog sustava. Cilj studije koju su 2016. godine proveli Kim i suradnici (64) bio je ispitati imunostimulacijsko djelovanje listova graviole na staničnoj liniji makrofaga RAW 264.7. Testiran je etanolni ekstrakt standardiziran na flavonoide kvercetin-3-O-rutinozid i kemferol-3-O-rutinozid. Rezultati su pokazali da graviola potiče aktivaciju makrofaga. Oba ekstrakta inducirali su ekspresiju proupalnih citokina IL-1β i TNF-α, a destilat je inducirao i ekspresiju inducibilne NO-sintaze (iNOS). Zaključeno je da se mehanizam imunomodulacijskog djelovanja temelji na aktivaciji MAP kinaza.

### **3.1.10. Antidepresivni učinak**

Graviola se u obliku različitih ljekovitih pripravaka često primjenjuje u afričkoj i karipskoj tradicionalnoj medicini kao anksiolitik i antidepresiv (7). Hasrat i suradnici (65) su ispitali antidepresivno djelovanje ekstrakata listova, plodova i sjemenki graviole u uvjetima *in vitro*. Ustanovljeno je da navedeni ekstrakti inhibiraju vezanje alkaloida rauvolscina na serotoninске 5-HT1A receptore u hipokampusu. Za mogući antidepresivni učinak graviole odgovornost je pripisana alkaloidima anonainu, asimilobinu i nornuciferinu.

### **3.1.11. Antioksidacijski učinak**

Graviola sadrži velik broj spojeva koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost. Ustanovljen je dobar antioksidacijski učinak etanolnog ekstrakta listova graviole u koncentraciji 500 µg/mL metodom hvatanja slobodnih radikala i lipidne peroksidacije (66). Padma i suradnici (67) su tijekom šesnaest dana pratili stanje pokusnih životinja kojima je jednom dnevno apliciran

etanolni ekstrakt kore gravirole. Pokazalo se da ekstrakt inhibira stresom uzrokovanu lipidnu peroksidaciju u tkivu mozga i jetre pokusnih životinja. Ista je skupina znanstvenika na animalnom modelu pokazala da etanolni ekstrakt kore gravirole djeluje na stresom uzrokovanu promjenu razine moždanih neurotransmitora, odnosno da dovodi do normalizacije razina noradrenalina, serotonina, dopamina te enzima monoaminooksidaze (MAO) (68).

### **3.1.12. Antivirusni učinak**

Betancur-Galvis i suradnici (69) istražili su antivirusni učinak etanolnog ekstrakta listova gravirole na staničnim kulturama goveđih bubrežnih stanica (MDBK) i humanih stanica karcinoma ždrijela inficiranih virusom herpes simplex 2 (HSV-2). U ispitivanju su kao pozitivna kontrola korišteni antivirotik aciklovir i antikoagulans heparin. Rezultati ispitivanja pokazali su da etanolni ekstrakt listova gravirole inhibira razmnožavanje virusa herpes simplex 2. U drugoj je studiji ustanovljeno da etanolni ekstrakt kore gravirole djeluje inhibitorno i na virus herpes simplex 1 (HSV-1) (70). Antivirusno djelovanje gravirole na herpes simplex virus 1 u svome su istraživanju dokazali i Dvorkin-Camiel i Whelan (71). Njihovi su rezultati također pokazali da etanolni ekstrakt gravirole ne djeluje toksično na stanice koje nisu inficirane navedenim virusom.

### **3.1.13. Antimikrobni učinak**

Antimikrobni učinak etanolnih ekstrakata kore, korijena i listova gravirole ispitan je disk-difuzijskom metodom. Ekstrakt listova snažno je inhibirao rast bakterijskih vrsta *Pseudomonas aeruginosa* te *Staphylococcus aureus*, dok je ekstrakt kore i korijena jače djelovao na vrste *Escherichia coli* (72). Pai i suradnici (73) su istom metodom ustanovili da vodeni ekstrakt listova djeluje antimikrobno na vrstu *Candida albicans* te na bakterijske vrste *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* i *Porphyromonas gingivalis*. Nadalje, dokazano je da vodeni ekstrakt listova gravirole inhibira rast vrste *Enterococcus faecalis* (74). Metodom

mikrodilucije određena je minimalna inhibitorna koncentracija vodeno-etanolnog ekstrakta listova gravirole potrebna za inhibiciju rasta multirezistentnih sojeva vrsta *Staphylococcus aureus* (SA357) i *Escherichia coli* (EC27) pri samostalnom djelovanju ili u kombinaciji s gentamicinom, amikacinom, kanamicinom i neomicinom. Rezultati ispitivanja pokazali su da graviola posjeduje antimikrobna svojstva te da pojačava učinak svakog od navedenih aminoglikozidnih antibiotika, što ukazuje na njezin potencijal u liječenju infekcija uzrokovanih multirezistentnim sojevima bakterija (75).

#### **3.1.14. Antitumorski učinak**

Najveći broj radova o biološkim učincima gravirole usmjeren je prema istraživanju njezinog antitumorskog djelovanja u uvjetima *in vitro*. Među staničnim linijama na kojima je testirano antitumorsko djelovanje gravirole su stanice leukemije ECV304, limfoma U937, karcinoma vrata maternice HeLa, gušterače CD18/HPAF i EG/COLO357, dojke MCF-7, debelog crijeva HCT-116 i HT-29 te humanih keratinocita HaCaT (15). Pretpostavlja se da acetogenini i alkaloidi najviše doprinose citotoksičnom i apoptotičnom učinku gravirole (76).

Etil-acetatni ekstrakt listova gravirole djelovao je citotoksično na stanice karcinoma debelog crijeva HCT-116 i HT-29 zaustavljajući fazu G1 njihovog staničnog ciklusa te time potaknuo proces apoptoze. Pokazalo se da acetogenin anomuricin E izoliran iz listova gravirole pokreće apoptozu aktivacijom enzima kaspaze 3 i 9 (77, 78). Ustanovljen je i antiproliferacijski učinak etil-acetatnog ekstrakta listova na stanicama karcinoma pluća A549. Citotoksični učinak je bio selektivan za tumorske stanice. Zaustavljen je njihov stanični ciklus u fazama G0 i G1 te suprimirana translokacija nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ b) iz citoplazme u jezgru (79). Postoji i studija u kojoj je na tumorskim stanicama karcinoma pluća NCI-H292 metanolni ekstrakt vršnih dijelova gravirole pokazao snažan citotoksični učinak (80).



Istraživanja su pokazala da etanolni ekstrakt listova gravirole također potiče apoptozu te smanjuje vijabilnost tumorskih stanica karcinoma jetre HepG, a da mehanizam djelovanja uključuje antioksidacijski učinak (N-acetil-cistein) i smanjenje nastalog stresa endoplazmatskog retikuluma (81, 82). Vodeni ekstrakt listova gravirole pokazao je antiproliferativno djelovanje na tumorskim stanicama karcinoma prostate BPH-1 (83), dok je etanolni ekstrakt inhibirao proliferaciju tumorskih stanica karcinoma prostate tipa PC-3 (84).

Za potrebe istraživanja pulverizirani listovi i grančice gravirole suspendirani su 5 minuta u dimetil-sulfoksidu te centrifugirani. Supernatant je pokazao antitumorski učinak na stanicama karcinoma gušterače CD18/HPAF i FG/COLO357. Ustanovljeno je da bioaktivne sastavnice inhibiraju signalne putove koji reguliraju metabolizam, stanični ciklus, preživljenje i metastaziranje stanica karcinoma gušterače (85).

Etanolni ekstrakti listova, grančica i korijena gravirole u jednom su ispitivanju pokazali antiproliferativno djelovanje na tumorske stanice leukemije HL-60. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja veže se uz stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, zaustavljanje staničnog ciklusa tumorskih stanica u fazama G0 i G1 te uz utjecaj na mitohondrijski membranski potencijal (14). Nadalje, ispitana je citotoksičnost vodenog i etanolnog ekstrakta listova gravirole na stanicama Ehrlichovog ascitesnog karcinoma (EACC) te karcinoma dojke (MDA i SKBR3). Ustanovljen je selektivan antitumorski učinak na sve tri stanične linije (86). Dai i suradnici (87) pokazali su da ekstrakt plodova gravirole djeluje selektivno citotoksično na stanice karcinoma dojke MDA-MB-468 tako što zaustavlja stanični ciklus u fazama G0 i G1 te utječe na mRNA ekspresiju receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR). Istraživanjem je također ustanovljeno da se karcinom dojke u štakora smanjuje kroz pet tjedana tretmana ekstraktom plodova. Nadalje, na modelu miša s 4 T1 karcinomom dojke ustanovljeno je da vodeni ekstrakt listova gravirole smanjuje obujam tumora u odnosu na netretiranu skupinu (88).

Liofilizirana pulpa svježih plodova ekstrahirana je ionskim otapalom 1-butil-3-metilimidazol kloridom te ekstrakt podvrgnut testiranju antitumorskog učinka na stanicama karcinoma dojke MCF-7. IC<sub>50</sub> vrijednost za ekstrakt iznosila je 4,75 µg/mL, a za taksol 0,99 µg/mL. Ustanovljeno je da ekstrakt toksično djeluje na stanice karcinoma kroz smanjenje vijabilnosti, induciranje apoptoze i zaustavljenje staničnog ciklusa kroz G0/G1 fazu (89).

Acetogenin anonacin pokazao je sposobnost indukcije apoptoze stanica karcinoma dojke MCF-7 preko signalnih putova koji uključuju  $\alpha$ -estrogenske receptore i smanjenje ekspresije proteina ciklina D1 i Bcl-2. Ustanovljeno je da djeluje aditivno u kombinaciji s citostatikom 4-hidroksitamoksifenom, smanjujući vijabilnost tumorskih stanica i transkripcijsku aktivnost  $\alpha$ -estrogenskih receptora (90).

## **3.2. Klinička istraživanja gravirole**

### **3.2.1. Randomizirane kontrolirane studije**

Arroyo i suradnici (91) proveli su kliničku studiju s ciljem da se ispita učinkovitost i sigurnost gravirole kao adjuvantne terapije dijabetesa tipa 2. Studija je obuhvatila 60 ispitanika kojima je prije 2-6 godina dijagnosticirana šećerna bolest tipa 2, bez komplikacija te im je u terapiju uveden glibenklamid. Tijekom 30 dana ispitivana skupina dnevno je uzimala 5 mg glibenklamida i kapsulu koja je sadržavala 180 mg etanolnog ekstrakta listova gravirole, dok je kontrolna skupina uzimala samo glibenklamid. Na kraju ispitivanja uočeno je da su ispitanici koji su uzimali kombinaciju ekstrakta listova gravirole i glibenklamida postigli bolju regulaciju glikemije i u prosjeku nižu koncentraciju glukoze u krvi. Rezultati ove studije ohrabruju daljnja istraživanja primjene gravirole kao adjuvantne terapije u liječenju dijabetesa.

Cilj istraživanja koje su prošle godine proveli Indrawati i suradnici (92) bio je ispitati djeluje li graviola citotoksično na tumorske stanice kolorektalnog karcinoma. U studiju je uključeno 28 ispitanika starijih od 30 godina koji boluju od kolorektalnog karcinoma i koji imaju zadovoljavajuću hematološku i biokemijsku funkciju te minimalnu vrijednost od 60% na Karnofsky skali. Tijekom 8 tjedana, ispitivana je skupina uzimala propisanu kemoterapiju te jednu kapsulu koja je sadržavala 300 mg vodenog ekstrakta listova gravirole standardiziranog na 0,36% acetogenina. Uz kemoterapiju, kontrolna skupina jednom dnevno uzimala je kapsulu s placebo. Prema rezultatima istraživanja, u ispitanika koji su uz kemoterapiju uzimali ekstrakt listova gravirole zabilježen je jači citotoksični učinak na tumorske stanice kolorektalnog karcinoma u odnosu na kontrolnu skupinu.

Provedena je klinička studija kojoj je cilj bio ispitati kakav je učinak kombiniranog pripravka koji sadrži ekstrakt gravirole i elagnu kiselinu na lezije u žena inficiranih humanim papiloma virusom (HPV). Ispitivanje je obuhvatilo 106 HPV-pozitivnih žena prosječne dobi 34 godine.

Ispitivana skupina je tijekom 12 mjeseci uzimala jednu tabletu dnevno koja je sadržavala 16 mg elagne kiseline i 100 mg ekstrakta gravirole, dok kontrolna skupina nije dobivala nikakav pripravak. Nakon 6 i 12 mjeseci, ispitanice su podvrgnute Papa testu i kolposkopiji. Uočena je manja incidencija abnormalnih nalaza Papa testova u žena koje su uzimale kombinirani pripravak s graviolom i elagnom kiselinom (93).

Godine 2018. završena je jedna klinička studija s ciljem da se ispita učinak suplementacije sokom iz graviolinih plodova na krvni tlak, serumsku razinu urične kiseline i funkciju bubrega. Očekuje se objava rezultata ove studije koja je trajala tri mjeseca i obuhvatila 143 ispitanika u stadiju predhipertenzije (94).

### **3.2.2. Prikazi slučajeva**

Hansra i suradnici (95) prikazali su slučaj 66-godišnje pacijentice kojoj je 1998. godine dijagnosticiran karcinom dojke u drugom stadiju, s receptorima za estrogen i progesteron. Odmah je započeta kombinirana terapija taksanima, antraciklinima i zračenjem, međutim, četiri godine kasnije ispostavilo se da početna kemoterapija i radioterapija nisu postigle željeni učinak jer su pacijentici biopsijom otkrivene metastaze na plućima. U terapiju je uveden letrozol, fulvestrant i tamoksifen koji se također nisu pokazali djelotvornima te su zamijenjeni vinorelbinom, a potom paklitakselom, bevacizumabom, gemcitabinom i doksorubicinom. Karcinom je bio rezistentan na sve navedene linije liječenja i 2007. godine pacijentici su otkrivene nove metastaze na jetri. Zbog činjenice da se karcinom proširio na tkivo jetre, pacijentici je uveden peroralni citostatik kapecitabin u dozi od 2500 mg, koji se uzima kontinuirano tijekom dva tjedna nakon čega slijedi tjedan dana stanke od uzimanja terapije. Otprilike istovremeno kada je u terapiju uveden kapecitabin pacijentica je jednom dnevno počela uzimati dekokalet gravirole koji bi pripravila kuhanjem 10-12 suhih listova u vodi 5-7 minuta. Nakon manje od jedne godine, u nalazima krvi primijećeno je da je došlo do sniženja razine tumorskih markera te da je koncentracija jetrenih enzima alanin-

aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) u referentnom intervalu. Pozitivni učinak pripisao se acetogeninima. Pacijentica s karcinomom koji se pokazao rezistentan na brojne kemoterapeutike ostala je u stabilnom stanju tijekom razdoblja dužeg od pet godina.

Rad koji je 2013. godine objavio Steve Yap (96) govori o slučaju 44-godišnjakinje kojoj je nakon kolonoskopije otkriven karcinom debelog crijeva u trećem stadiju. Uvidom u povijest bolesti pacijentice uočeno je da joj je dvije godine ranije dijagnosticiran ulcerozni kolitis te da boluje od šećerne bolesti tipa 2 koja nije kontrolirana unatoč pridržavanju terapije. Prehrana navedene pacijentice bila je bazirana na mesu, uz dosta konzervirane, pržene i brze hrane, sokova i gaziranih pića te rafiniranog šećera. Pacijentica nije jela voće, povrće, orašaste plodove ni grahorice, ali je unosila velike količine kofeina putem kave ili energetskih napitaka. Njezin stil života nije uključivao dovoljno fizičke aktivnosti, a na temelju indeksa tjelesne mase koji iznosi 30,8 ulazi u kategoriju pretilih osoba. Nakon što joj je dijagnosticiran karcinom debelog crijeva, u terapiju su uvedeni antitumorski lijekovi i pacijentica je drastično promijenila svoje životne navike. U svoj dnevni raspored uvela je polusatnu umjerenu fizičku aktivnost poput šetnje ili laganih aerobnih vježbi te je u potpunosti promijenila prehranu iz koje je izbacila crveno meso, rafinirani šećer i škrob, a umjesto kave počela je piti žuti ili zeleni čaj, jesti puno voća i povrća te namirnice bogate vlaknima, omega-3 masnim kiselinama i antocijanima. Nadalje, počela je uzimati folnu kiselinu, vitamine D i E, magnezij, kalcij i fitopreparate poput kurkumina, artemizinina i resveratrola. Pacijentica je dnevno unosila i 5 g suhog pulveriziranog ekstrakta sjemenki i listova gravirole. Prikazom ovog slučaja ukazano je da promjena životnih navika i kontinuirana primjena fitopreparata, uključujući i ekstrakt gravirole, mogu doprinijeti smanjenju tumora debelog crijeva, čime se ohrabruju daljnja istraživanja.

### 3.3. Nuspojave i interakcije gravirole s lijekovima

Do danas nisu zabilježene značajne nuspojave niti klinički značajne interakcije gravirole s drugim lijekovima, fitopreparatima ili hranom. Zbog nedostatka studija koje bi upućivale na sigurnu ili, s druge strane, kontraindiciranu primjenu gravirole u trudnoći, ne preporučuju se preparati koji sadrže ekstrakt gravirole u trudnica i dojilja (97, 98).

Graviola se također ne preporučuje osobama oboljelim od Parkinsonove bolesti. Ta je činjenica vjerojatno potkrijepljena studijom koju su 2006. godine proveli Lannuzel i suradnici (99). Cilj im je bio ispitati postoji li korelacija između prekomjerne konzumacije listova i plodova gravirole te pojave atipičnog parkinsonizma na području Karipskog otočja. U spomenutoj se studiji spominje i potencijalno neurotoksično djelovanje gravirole zbog prisutnosti acetogenina anonacina. Champy i suradnici (100, 101) proveli su nekoliko studija o etiologiji atipičnog parkinsonizma na području otočja Gvadalupe u Karipskom moru. U njihovim se istraživanjima spominje da su za mogući neurotoksični učinak odgovorni izokinolinski alkaloidi te anonacin, najzastupljeniji acetogenin u listovima i plodovima gravirole. Neurotoksični učinak ispitan je na moždanom tkivu pokusnih štakora čime se pokazalo da anonacin u visokoj koncentraciji inhibira mitohondrijski kompleks I te dovodi do neurodegenerativnog učinka, odnosno izaziva lezije na bazalnim ganglijima i u substanciji nigri. No, zbog lipofilnog karaktera i izrazito slabe topljivosti anonacina u vodi teško je odrediti koliki se postotak ovog acetogenina apsorbira u gastrointestinalnom sustavu i dolazi do mozga. Stoga se neurotoksičnost listova i plodova gravirole nije mogla sa sigurnošću potvrditi. Smatra se da se s pojavom atipičnog parkinsonizma može povezati i anonamin, alkaloid koji je otkriven 2012. godine u metanolnom ekstraktu listova. Ispitivanja neurotoksičnog učinka anonamina pokazala su da spomenuti alkaloid djeluje citotoksično na humane stanice neuroblastoma SH-SY5Y te da inhibira biosintezu dopamina (102).

Postoji registrirano kliničko ispitivanje čiji je cilj među karipskim stanovništvom ispitati postoji li povezanost između pojave atipičnog parkinsonizma među karipskim stanovništvom i konzumacije listova ili plodova gravirole. Studija se trenutno nalazi u fazi prikupljanja ispitanika, a cilj joj je prikupiti barem 550 ispitanika starijih od devetnaest godina (103).

#### 4. RASPRAVA

Dugogodišnja primjena gravirole u tradicionalnoj medicini mnogih naroda s područja Afrike i Južne Amerike potaknula je brojna znanstvena istraživanja. Animalne studije su pokazale da etanolni i vodeni ekstrakti listova smanjuju razinu glukoze u krvi i potiču regeneraciju  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače, zatim da smanjuju razinu kolesterola i triglicerida te inhibiraju porast tjelesne mase u pretilih životinja. Dokazano je protuupalno, analgetsko i antipiretsko i antihipertenzivno djelovanje graviolinih listova, kao i sposobnost zacjeljivanja otvorenih površinskih rana, ublažavanja ulceroznih lezija i zaštite jetre u pokusnih životinja. U uvjetima *in vitro* ustanovljena su antioksidacijska, imunomodulacijska, antibakterijska, antivirusna, antiparazitna i insekticidna svojstva ove biljne vrste.

Veliki interes struke i javnosti je usmjeren na potencijal primjene pripravaka na bazi gravirole u borbi protiv karcinoma. U uvjetima *in vitro* istražen je antikancerogeni učinak na stanicama leukemije, limfoma, vrata maternice, gušterače, dojke, debelog crijeva i jetre. Mogući mehanizmi djelovanja bioaktivnih sastavnica uključuju sposobnost bioaktivnih sastavnica da zaustave stanični ciklus i induciraju apoptozu tumorskih stanica. Smatra se da acetogenini najviše doprinose ustanovljenim antikancerogenim svojstvima gravirole. No, do danas je provedena samo jedna klinička studija koja je uključila onkološke bolesnike. Ustanovljeno je da uzimanje gravirole s konvencionalnom kemoterapijom poboljšava nutritivni status pacijenata s kolorektalnim karcinomom te da pojačava *ex vivo* citotoksični učinak. Dva opisana slučaja iz prakse govore također u prilog antikancerogenim svojstvima gravirole.

Iako su dosadašnja istraživanja dala ohrabrujuće rezultate glede terapijskog potencijala gravirole, potrebno je provesti daljnja ispitivanja da bi se došlo do zadovoljavajuće razine kliničkih dokaza i razjasnili mehanizmi djelovanja biološki aktivnih sastavnica. Sigurnosni aspekt primjene fitopreparata s graviolom također ostaje otvoren, posebice zbog potencijalnog neurotoksičnog djelovanja koje se pripisuje prisutnim izokinolinskim alkaloidima i



acetogeninu anonacinu. U tim u svezi registrirana je jedna klinička studija koja ima za cilj istražiti eventualnu povezanost konzumacije listova i plodova gravirole na Karibima i pojave atipične Parkinsonove bolesti.

## 5. ZAKLJUČCI

Graviola (*Annona muricata* L., Annonaceae) je zimzeleno drvo rasprostranjeno u tropskim i suptropskim područjima koje daje jestive plodove. Listovi, plodovi, sjemenke, kora i korijen se koriste u tradicionalnoj medicini za liječenje različitih bolesti, primjerice, malarije, crijevnih parazita, bolova u trbuhu, parazitskih infekcija, povišenog krvnog tlaka, bolesti srca i jetre, prehlade, dijabetesa i karcinoma.

Fitokemijskim istraživanjima gravirole ustanovljena je prisutnost acetogenina jedinstvene kemijske s strukture (derivati masnih kiselina s 35 i 38 C-atoma), megastigmana, alkaloida, polifenola i eteričnog ulja.

Ispitivanja različitih ekstrakata gravirole na animalnim modelima i staničnim kulturama pokazala su da može pospiješiti zacjeljivanje rana, zaštititi jetru i sluznicu probavnog trakta, smanjiti povišeni krvni tlak, šećer u krvi, kolesterol i trigliceride, te djelovati antikancerogeno, protuupalno, imunomodulacijski, antimikrobno i antiparazitno.

Kliničke studije su vrlo rijetke i ne pružaju dovoljno dokaza o terapijskoj učinkovitosti fitopreparata s graviolom, međutim, ohrabruju daljnja istraživanja. Do sada su provedene tri studije koje su uključivale osobe sa šećernom bolesti tipa 2, pacijente s kolorektalnim karcinomom te žene koje su HPV pozitivne. Očekuje se da će daljnja istraživanja pojasniti i mehanizme djelovanja bioaktivnih sastavnica gravirole, posebice njihovog antikancerogenog djelovanja.

Nisu poznate interakcije gravirole s lijekovima, hranom ili dodacima prehrani. No, ne preporučuje se oboljelima od Parkinsonove bolesti zbog potencijalnog neurotoksičnog učinka te trudnicama i doiljama u nedostatku dokaza.

## 6. LITERATURA

1. Jamkhande PG, Wattamwar AS. *Annona reticulata* Linn. (Bullock's heart): Plant profile, phytochemistry and pharmacological properties. *J Tradit Complement Med* 2015;5:144-152.
2. Ioannis P, Anastasis S, Andreas Y. Graviola: A aystematic review on its anticancer properties. *Am J Cancer Prev* 2015;3:128-131.
3. Kedari TS, Khan AA. Guyabano (*Annona muricata*): A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Am J Res Comm* 2014;2:247-268.
4. *Annona muricata* L., Annonaceae. Dostupno na: [http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Annona\\_muricata.PDF](http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Annona_muricata.PDF); Pristupljeno: 15. studenog 2018.
5. Meet the plants. Dostupno na: <https://ntbg.org/database/plants/detail/annona-muricata>; Pristupljeno: 15. studenog 2018.
6. Kedari TS, Khan AA. Guyabano (*Annona muricata*): A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Am J Res Comm* 2014;2:247-268.
7. Coria-Téllez AV, Montalvo-González E, Yahia EM, Obledo-Vázquez EN. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arab J Chem* 2016; doi: 10.1016/j.arabjc.2016.01.004.
8. Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Mohd Ali HM, Kadir HA. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int J Mol Sci* 2015;16:15625-15658.
9. Blowman K, Magalhães M, Lemos MFL, Cabral C, Pires IM. Anticancer properties of essential oils and other natural products. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018; doi: 10.1155/2018/3149362.
10. Péliissier Y, Marion C, Kone D, Lamaty G, Menut C, Bessière J-M. Volatile components of *Annona muricata* L. *J Ess Oil Res* 1994;6:411-414.
11. Jirovetz L, Buchbauer G, Ngassoum MB. Essential Oil Compounds of the *Annona muricata* fresh fruit pulp from Cameroon. *J Agric Food Chem* 1998;46:3719-3720.
12. Kossouoh C, Moudachirou M, Adjakidje V, Chalchat JC, Figuérédo G. Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. leaves from Benin. *J Essent Oil Res* 2007;19:307-309.

13. Thang TD, Dai DN, Hoi TM, Ogunwande IA. Study on the volatile oil contents of *Annona glabra* L., *Annona squamosa* L., *Annona muricata* L. and *Annona reticulata* L. from Vietnam. *Nat Prod Res* 2013;27:1232-1236
14. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 2016; doi: 10.1017/jns2016.41.
15. Gavamukulya Y, Wamunyokoli F, El-Shemy HA. *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. *Asian Pac J Trop Med* 2017;10:835-848.
16. Pieme CA, Kumar SG, Dongmo MS, Moukette BM, Boyoum FF, Ngogang JY, Saxena AK. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2014; doi: 10.1186/1472-6882-14-516.
17. Asase A, Hesse D, Simmonds M. Uses of multiple plants prescriptions for treatment of malaria by some communities in southern Ghana. *J Ethnopharmacol* 2012;144:448-452.
18. Boulogne I, Germosén-Robineau L, Ozier-Lafontaine H, Fleury M, Loranger-Merciris G. TRAMIL ethnopharmacological survey in Les Saintes (Guadelope, French West Indies): A comparative study. *J Ethnopharmacol* 2011;133:1039-1050.
19. Jorim RY, Korape S, Legu W, Koch M, Barrows LR, Matainaho TK, Rai PP. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the eastern highlands of Papua New Guinea. *J Ethnobiol Ethnomed* 2012; doi: 10.1186/1746-4269-8-47.
20. Sreekeesoon D, Mahomoodally M. Ethnopharmacological analysis of medicinal plants and animals used in the treatment and management of pain in Mauritius. *J Ethnopharmacol* 2014;157:181-200.
21. Hajdu Z, Hohmann J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paragua Indian Reservation, Bolivia. *J Ethnopharmacol* 2012;139:838-857.
22. Ezuruike U, Prieto J. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: pharmacological and toxicological considerations. *J Ethnopharmacol* 2014;155: 57-924.
23. Mootoosamy A, Mahomoodally M. Ethnomedicinal application of native remedies used against diabetes and related complications in Mauritius. *J Ethnopharmacol* 2014;151:413-444.

24. Alonso-Castro A, Villarreal M. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol* 2011;133:945-972.
25. Liporacci HSN, Simão DG. Ethnobotanical survey of medicinal plants from home gardens of Bairro Novo Horizonte Ituiutaba, MG. *Rev Bras Pl Med* 2012; doi: 10.1590/S1516-05722013000400009.
26. Neamsuvan O, Komonhiran P, Boonming K. Medicinal plants used for hypertension treatment by folk healers in Songkhla province, Thailand. *J Ethnopharmacol*, 2018; 214: 58-70.
27. Justino AB, Miranda NC, Franco RR, Martins MM, Silva NMD, Espindola FS. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. *Biomed Pharmacother* 2018;100:83-92.
28. Pinto LC, Cerqueira-Lima AT, dos Santos Suzarth S, de Souza R, Ramos Tosta B, Bernardinos da Silva H, de Oliveira Pires A, de Almeida Queiroz G, Oliveira Teixeira T, Campos Dourado KM, Oliveira Costa V, Baqueiro V, Pimenta Oliveira D, Rahy Brandão H, Oliveira de Souza C, Druzian JI, de Paula Medeiros KC, de Aragão Dantas Alves C, Vieira Lopes M, Viana Figueiredo CA. *Annona muricata* L. (soursop) seed oil improves type 1 diabetes parameters *in vivo* and *in vitro*. *Pharm Nutr* 2018; doi: 10.1016/j.phanu.2017.11.002
29. Adeyemi DO, Komolafe O, Adewole S, Obuotor E, Adenowo T. Effects of *Annona muricata* (Linn) on the morphology of pancreatic islet cells of experimentally-induced diabetic Wistar rats. *Internet J Altern Med* 2007;5:1-8.
30. Adeyemi DO, Komolafe OA, Adewole OS, Obuotor EM, Adenowo TK. Antihyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2009;6:62-69.
31. Florence NT, Benoit NZ, Jonas K, Alexandra T, Désiré DD, Pierre K, Théophile D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae) aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2014;151:784-790.
32. Adeyemi DO, Komolafe OA, Adewole OS, Obuotor EM. Antihyperlipidemic activities of *Annona muricata* (Linn). *Internet J Altern Med* 2008;7:1-7.
33. Yuniarti L, Dewi MK, Lantika UA. Inhibition of body weight gain and blood cholesterol level by soursop leaves aqueous extract (*Annona muricata* L.). *Obes Res Clin Pract* 2013; doi: 10.1016/j.orcp.2013.08.087.

34. Ahalya B, Ravi Shankar K, Kiranmayi GVN. Exploration of anti-hyperglycemic and hypolipidemic activities of ethanolic extract of *Annona muricata* bark in alloxan induced diabetic rats. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2014; 25: 21-27.
35. Nwokocha CR, Owu DU, Gordon A, Thaxter K, McCalla G, Ozolua RI, Young L. Possible mechanisms of action of the hypotensive effect on *Annona muricata* (soursop) in normotensive sprague-dawley rats. *Pharm Biol* 2012;50:1436-1441.
36. Osorio E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, Paco MA, Giménez A, Robledo S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol* 2007;111:630-635.
37. Tsabang N, Fokou PV, Yamthe LR, Noguem B, Bakarnga-Via I, Nguépi MS, Nkonmeneck BA, Boyom FF. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *J Ethnopharmacol* 2012; 139: 171-180.
38. Ménan H, Banzouzi JT, Hocquette A, Péliissier Y, Blache Y, Koné M, Mallié M, Aké Assi L, Valentin A. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. *J Ethnopharmacol* 2006;105:131-136.
39. Boyom FF, Fokou PV, Yamthe LR, Mfopa AN, Kemgne EM, Mbacham WF, Tsamo E, Zollo PH, Gut J, Rosenthal PJ. Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. *J Ethnopharmacol* 2011;134:717-724.
40. Rathod PK, McErlean T, Lee PC. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9389-9393.
41. Ferreira LE, Castro PM, Chagas AC, França SC, Belebóni RO. *In vitro* antihelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* in sheep. *Exp Parasitol* 2013;134:327-332.
42. Vila-Nova NS, Morais SM, Falcão MJ, Machado LK, Beviláqua CM, Costa IR, Brasil NV, Andrade Júnior HF. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonaceae species cultivated in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44:567-571.
43. Vila-Nova NS, de Morais SM, Falcão MJ, Alcantarra TT, Ferreira PA, Cavalcanti ES, Vieira IG, Campello CC, Wilson M. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. *Exp Parasitol* 2013;133:334-338.

44. Jaramillo MC, Arango GJ, González MC, Robledo SM, Velez ID. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia* 2000;71:183-186.
45. Adeoye O, Ewete F. Potentials of *Annona muricata* Linnaeus (Annonaceae) as a botanical insecticide against *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae). *J Agric For Soc Sci* 2010;8:147-151.
46. Dos Santos A, Sant'Ana A. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine* 2001;8:115-120.
47. Bobadilla M, Zavala F, Sisniegas M, Zavaleta G, Mostacero J, Taramona L. Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus “guanabana” sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera Culicidae). *Rev Peru Biol* 2005;12:145-152.
48. Castillo-Sánchez LE, Jimenez-Osornio JJ, Delgado-Herrera M. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. *Trop Subtrop Agroecosyst* 2010;12:445-462.
49. Grzybowski A, Tiboni M, Silva MA, Chitolina RF, Passos M, Fontana JD. Synergistic larvicidal effect and morphological alterations induced by ethanolic extracts of *Annona muricata* and *Piper nigrum* against the dengue fever vector *Aedes aegypti*. *Pest Manag Sci* 2013;69:589-601
50. Hamid RA, Foong CP, Ahmad Z, Hussain MK. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *Rev Bras Farmacogn* 2012;22:630-641.
51. Arthur FKN, Woode E, Terlabi EO, Larbie C. Evaluation of hepatoprotective effect of aqueous extract of *Annona muricata* (Linn.) leaf against carbon tetrachloride and acetaminophen-induced liver damage. *J Nat Pharm* 2012;3:25-30.
52. Arthur FKN, Woode E, Terlabi EO, Larbie C. Bilirubin lowering potential of *Annona muricata* (Linn.) in temporary jaundiced rats. *Am J Pharmacol Toxicol* 2012;7:33-40.
53. Moghadamtousi SZ, Rouhollahi E, Hajrezaie M, Karimian H, Abdulla MA, Kadir HA. *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. *Int J Surg* 2015;18:110-117.
54. Paarakh PM, Chansouria JPN, Khosa RL. Wound healing activity of *Annona muricata* extract. *J Pharm Res* 2009;2:404-406.
55. Moreira RCT, Costa LCB, Costa RCS, Rocha EA. Abordagem Etnobotânica acerca do Uso do Plantas Medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. *Acta Farm Bonaerense* 2002;21:205-211.

56. Cercato LM, White PA, Nampo FK, Santos MR, Camargo EA. A systemic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? *J Ethnopharmacol* 2015;176:286-296.
57. Cho EJ, Lee JH, Sung NY, Byun EH. Anti-inflammatory effects of *Annona muricata* leaf ethanol extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 2017;46:681-687.
58. Foong CP, Hamid RA. Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. *Rev Bras Farmacogn* 2012;22:1301-1307.
59. Ishola IO, Awodele O, Olusayero AM, Ochieng CO. Mechanisms of analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) fruit extract in rodents. *J Med Food* 2014;17:1375-1382.
60. Shastry RA, Kulkarni PV, Kulkarni VH, patil BS, Habbu PV. Analgesic and antipyretic activity of leaves of *Annona muricata*. *NPAIJ* 2008;4:155-158.
61. Maruvor Arasi K, Krishnaveni C. Antipyretic potential of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. and *Spermacoce articulata* L.f. on yeast-induced pyrexia in rats. *Asian J Pharm Clin Res* 2018;11:148-151.
62. Cetina-Dorantes AJ, Arana-Arguez V, Torres-Romero J, Canul-Canche J, Ramirez-Camacho M. Effect of methanolic extract of *Annona muricata* leaves on macrophage effector functions. *J Immunol* 2016;196:69.25.
63. Hasrat JA, De Bruyne T, De Backer JP, Vaquelin G, Vlietinck AJ. Isoquinoline Derivatives Isolated from the Fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49(11): 1145-1149.
64. Kim GT, Tran NK, Choi EH, Song YJ, Song JH, Shim SM, Park TS. Immunomodulatory efficacy of standardized *Annona muricata* (graviola) leaf extract via activation of mitogen-activated protein kinase pathways in RAW 264.7 macrophages. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; doi: 10.1155/2016/2905127.
65. Hasrat JA, De Bruyne T, De Backer JP, Vaquelin G, Vlietinck AJ. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. *J Pharm Pharmacol* 1997;49:1145-1149.
66. Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian J Exp Biol* 2007;45:480-485.



67. Padma P, Chansouria JPN, Khosa RL. Effect of alcohol extract of *Annona muricata* on cold immobilization stress induced tissue lipid peroxidation. *Phytother Res* 1997;11:326-327.
68. Padma P, Chansouria JPN, Khosa RL, Ray AK. Effect of *Annona muricata* and *Polyalthia cerasoides* on brain neurotransmitters and enzyme monoamine oxidase following cold immobilization stress. *J Nat Rem* 2001;1:144-146.
69. Betancur-Galvis J, Saez J, Granados H, Salazar A, Ossa J. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:531-535.
70. Ragasa CY, Soriano G, Torres OB, Don MJ, Shen CC. Acetogenins from *Annona muricata*. *Phcog J* 2012;4:32-37.
71. Dvorkin-Camiel L, Whelan JS. Tropical American plants in the treatment of infectious diseases. *J Diet Suppl* 2008;5:349-372.
72. Vijayameena C, Subhashini G, Loganayagi M, Ramesh B. Phytochemical screening and assessment of antibacterial activity for the bioactive compounds in *Annona muricata*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2013;2:1-8.
73. Pai BHM, Gururagavendra R, Shenoy R, Rao A. Anti-microbial efficacy of soursop leaf extract (*Annona muricata*) on oral pathogens: An *in-vitro* study. *J Clin Diagn Res* 2016;10: ZC01-ZC04.
74. Mathew J, George R, Theruvil R, Padavil TC, Tomy L, Kurian A. Antibacterial activity of leaf extract of *Annona muricata* and *Simarouba glauca* on *Enterococcus faecalis*. *J Contemp Dent Pract* 2016;17:650-653.
75. Bento EB, Matias EFF, Brito Jr. FE, Oliveira DR, Coutinho HDM, Costa JGM, Kerntopf MR, Menezes IRA. Association between food and drugs: antimicrobial and synergistic activity of *Annona muricata* L. *Int J Food Prop* 2013;16:738-744.
76. Patrikios I, Stephanou A, Yiallouris A. Graviola: A systematic review on its anticancer properties. *Am J Cancer Prev* 2015;3:128-131.
77. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Karimian H, Rouhollahi E, Paydar M, Fadaeinasab M. *Annona muricata* leaves induce G1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. *J Ethnopharmacol* 2014; 156:277-289.
78. Moghadamtousi SZ, Rouhollahi E, Karimian H, Fadaeinasab M, Firoozinia M, Abdulla MA, Kadir HA. The chemopotential effect of *Annona muricata* leaves against azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect of

- acetogenin anomuricin e in ht-29 cells: a bioassay-guided approach. PLoS One 2015; doi: 10.1371/journal.pone.0122288.
79. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Paydar M, Rouhollahi E, Karimian H. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- $\kappa$ B. BMC Complement Altern Med 2014; doi: 10.1186/1472-6882-14-299.
  80. Gomes de Melo J, de Sousa Araújo TA, Thijian Nobre de Almeida e Castro V, Lyra de Vasconcelos Cabral D, do Desterro Rodrigues M, Carneiro do Nascimento S, Cavalcanti de Amorim EL, de Albuquerque UP. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. Molecules 2010;15:8534-8542.
  81. Yang HL, Liu N, Lee SC. Ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through ROS pathway. Biomed Pharmacol J 2016; 9: 919-925.
  82. Liu N, Yang HL, Wang P, Lu YC, Yang YJ, Wang L, Lee SC. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. J Ethnopharmacol 2016;189:210-217.
  83. Asare GA, Afriyie D, Ngala RA, Abutiate H, Doku D, Mahmood SA, Rahman H. Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. on the prostate, BPH-1 cancer cells and some target genes. Integr Cancer Ther 2015;14:65-74.
  84. Yang C, Gundala SR, Mukkavilli R, Vangala S, Reid MD, Aneja R. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. Carcinogenesis 2015;36:656-665.
  85. Torres MP, Rachagani S, Purohit V, Pandey P, Joshi S, Moore ED, Johansson SL, Singh PK, Ganti AK, Batra SK. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* through altering cell metabolism. Cancer Lett 2012;323:29-40.
  86. Gavamukulya Y, Abou-Ellela F, Wamunyokoli F, El-Shemy HA. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and *in vitro* anticancer potential of ethanolic and water leaves extract of *Annona muricata* (graviola). Asian Pac J Trop Med 2014;7:S355-S363.
  87. Dai Y, Hogan S, Schmelz EM, Ju YH, Canning C, Zhou K. Selective growth inhibition of human breast cancer cells by graviola fruit extract *in vitro* and *in vivo* involving downregulation of EGFR expression. Nutr Cancer 2011;63:795-801.

88. Najmuddin SUFS, Romli MF, Hamid M, Alitheen NB, Rahman NMANA. Anti-cancer effect of *Annona muricata* Linn leaves crude extract (AMCE) on breast cancer cell line. BMC Complement Altern Med 2016; doi: 10.1186/s12906-016-1290-y
89. Daddiouaissa D, Amid A, Kabbashi NA, Fuad FAA, Elnour AM, Epandy MAKMS. Antiproliferative activity of ionic liquid-graviola fruit extract against human breast cancer (MCF-7) cell lines using flow cytometry techniques. J Ethnopharmacol 2019; doi: 10.1016/j.jep.2019.03.003
90. Ko YM, Wu TY, Wu YC, Chang FR, Guh JY, Chuang LY. Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor- $\alpha$ -related pathways in MCF-7 cells. J Ethnopharmacol 2011;137:1283-1290.
91. Arroyo J, Martínez J, Ronceros G, Palomino R, Villareal A, Bonilla P, Palomino C, Quino M. Coadjuvant hypoglycemic effect of *Annona muricata* L. (guanabana) leaves ethanolic extract in patients with type 2 diabetes mellitus receiving glibenclamide treatment. Ann Fac Med 2009;70:163-167.
92. Indrawati L, Ascobat P, Bela B, Abdullah M, Suroño IS. The effect of an *Annona muricata* leaf extract on nutritional status and cytotoxicity in colorectal cancer: a randomized controlled trial. Asia Pac J Clin Nutr 2017;6:606-612.
93. Morosetti G, Criscuolo AA, Santi F, Perno CF, Piccione E, Ciotti M. Ellagic acid and *Annona muricata* in the chemoprevention of HPV-related pre-neoplastic lesions of the cervix. Oncol Lett 2017;13:1880-1884.
94. The effect of soursop supplementation on blood pressure, serum uric acid and kidney function in prehypertensive patients. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03531203?term=annona+muricata&rank=2;> Pristupljeno: 15. ožujka 2018.
95. Hansra DM, Silva O, Mehta A, Ahn E. Patient with metastatic breast cancer achieves stable disease for 5 years on graviola and xeloda after progressing on multiple lines of therapy. Adv Breast Cancer Res 2014;3:84-87.
96. Yap S. Colon cancer reversed by phyto-nutritional therapy: a case study. Int J Biotechnol Wellness Ind 2013;2:132-139.
97. Lexicomp Online. Soursop. Natural products Database. Dostupno na: [https://online.lexi.com/lco/action/doc/retrieve/docid/fc\\_rnp2/3750361;](https://online.lexi.com/lco/action/doc/retrieve/docid/fc_rnp2/3750361) Pristupljeno: 5. lipnja 2018.
98. Drugs.com. Soursop. Dostupno na: [https://www.drugs.com/npp/soursop.html;](https://www.drugs.com/npp/soursop.html) Pristupljeno: 5. lipnja 2018.

99. Lannuzel A, Hoglinger GU, Champy P, Michel PP, Hirsch EC, Ruberg M. Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae? *J Neural Transm Suppl* 2006;70:153-157.
100. Champy P, Höglinger GU, Féger J, Gleye C, Hocquemiller R, Laurens A, Guérineau V, Laprévotte O, Medja F, Lombés A, Michel PP, Lannuzel A, Hirsch EC, Ruberg M. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadelope. *J Neurochem* 2004;88:63-69.
101. Champy P, Melot A, Guérineau V, Gleye C, Fall D, Höglinger GU, Ruberg M, Lannuzel A, Laprévotte O, Laurens A, Hocquemiller R. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadelope. *Mov Disord* 2005;20:1623-1633.
102. Matsushige A, Kotake Y, Matsunami K, Otsuka H, Ohta S, Takeda Y. Annonamine, a new aporphine alkaloid from the leaves of *Annona muricata*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2012;60:257-259.
103. Epidemiology and pathophysiology of parkinsonism in the Caribbeans (CAP).  
Dostupno na:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03368300?term=annona+muricata&rank=4;>  
Pristupljeno: 15. ožujka 2019.