

GISLENE PARREIRAS COSTA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E POLPA DE
Annona crassiflora Mart. PARA UTILIZAR COMO FITOCOSMÉTICO**

ASSIS

2017

GISLENE PARREIRAS COSTA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E POLPA DE
Annona crassiflora Mart. PARA UTILIZAR COMO FITOCOSMÉTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestra em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: Prof. Dr. Darío Abel Palmieri

ASSIS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CPI)

COSTA, Gislene Parreiras

C837e Estudo da atividade antioxidante e polpa de *Annona crassiflora* mart: para utilização como fitocosmético / Gislene Parreiras Costa; orientador: Prof. Dr. Darío Abel Palmieri. Assis, SP: [s.n], 2017.
50f.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP.

1. *Annona crassiflora* 2. Atividade antioxidantes 3. Fitoquímicos
I. Título.

CDU: 581.145.2

Bibliotecária responsável: Daniele Braga Paião CRB 8ª/6368

ERRATA

Folha: FOLHA DE APROVAÇÃO

Linha: TÍTULO

O título da Dissertação de Mestrado, de GISLENE PARREIRAS COSTA, defendida em 07/03/2017, foi alterado conforme abaixo:

Onde se lê:

BIOSPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE UMA PLANTA DO
CERRADO DO BRASIL: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DE
Annona crassiflora Mart.

Leia-se:

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E POLPA DE
Annona crassiflora Mart. PARA UTILIZAR COMO FITOCOSMÉTICO

GISLENE PARREIRAS COSTA

BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE UMA PLANTA DO
CERRADO DO BRASIL: AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTIOXIDANTE DE ANNONA CRASSIFLORA Mart.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Letras – UNESP/Assis para a
obtenção do título de Mestrado Acadêmico em
BIOCIÊNCIAS (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da Diversidade
Biológica)

Data da Aprovação: 07/03/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Darío Abel Palmieri - UNESP/ASSIS



Membros: Profa. Dra. Lucinéja dos Santos - UNESP/ASSIS



Prof. Dr. Marcelo Dib Bechara - UNIMAR/MARÍLIA



*Dedico este trabalho a meu pai **José** (in memoriam), que desde pequena me incentivou aos estudos e a ser uma pessoa melhor. Guardo suas lembranças comigo!*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todas as dificuldades dadas, pelas vitórias e conquistas em todas os momentos de dificuldade. Obrigada por me fazer crer quando achei que não fosse capaz.

À minha mãe **Irma** e a minha tia avó **Luzia**, pelo amor incondicional por todos os momentos e por ser meu porto seguro diante das tempestades. À minha irmã **Gisleide** e ao meu cunhado **Marcelo** pelo apoio e carinho e meus sobrinhos **Afonso** e **Guilherme**. Sem vocês a caminhada não teria razão.

A todos meus familiares tios, tias e primos por todo amor, incentivo e apoio.

Ao meu orientador **Dr. Darío Abel Palmieri**, com toda admiração, meus sinceros agradecimentos, pela orientação, conselhos, amizade, paciência, oportunidade e por toda confiança depositada durante todo esse tempo.

À professora **Dra. Lucinéia dos Santos**, por ter aceitado com alegria o convite para compor a banca. Toda minha admiração por toda sua dedicação e experiência profissional para a conclusão deste trabalho. E sua gentileza por ceder a utilização em seu Laboratório de Tecnologia Farmacêutica em Fitoterápicos, do Departamento de Biotecnologia.

Ao professor **Dr. Marcelo Dib Bechara**, que gentilmente aceitou o convite para compor a banca.

À professora **Dra. Mônica Rosa Bertão**, por ter participado da minha banca, pela amizade e apoio com suas palavras motivadoras.

A todos companheiros da pós-graduação pelo convívio e amizade.

Às minhas queridas amigas **Juliara Souza, Sandra Neris e Silvana Nogueira**, pela amizade, conselhos, e muitas orações.

Aos alunos de graduação **Anderson, Nadine e Giovana**, pela paciência e disponibilidade em me transmitir todo seu conhecimento de laboratório.

À mestre **Milena** pela sua amizade, sua disponibilidade de transmitir seus conhecimentos e sempre muito prestativa em ajudar.

A mestranda **Célia e Amanda Costa** pela amizade e pelo apoio nos momentos difíceis.

À doutoranda e amiga **Amanda Martins Viel**, que despertou, incentivou e colaborou com meu retorno aos estudos e durante ele. Sou muito grata.

À doutoranda **Kamille Spera** pela nossa amizade desde a sua graduação, muito obrigada pelos esforços cedidos em me ajudar a concluir este trabalho.

Aos companheiros e colegas conquistados durante o convívio no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Departamento de Biotecnologia, **Gabriela, Keren, Lia, Gabriel, Ricardo, Rodrigo, Tárík e Tiago**.

Aos meus queridos amigos de trabalho **Yara, Claudinha, Luciana, Lúcia, Inês, Michela, Marisa, Cássia, Renata, Jefferson, Jean e Samuel (equipe técnica de informática)** pelos abraços e palavras positivas nos momentos de dificuldades e pelos momentos de descontração que passamos juntos.

Aos funcionários da Universidade Estadual Paulista, em especial o **Gilberto e Eliana**, pela disposição e auxílios prestados.

A chefia da empresa Universidade Paulista a quem presto serviço, pelo apoio e oportunidade para realizar meu aperfeiçoamento profissional.

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação, meus sinceros agradecimentos.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos e minha eterna gratidão.

*“Os que semeiam com lágrimas colherão com alegria.
Aquele que leva a preciosa semente, andando e
chorando voltará, sem dúvida, com alegria trazendo
consigo os seus frutos .”*

Salmo 126: 5-6

COSTA, Gislene Parreiras. **Estudo da Atividade Antioxidante de Folhas e Polpa de *Annona crassiflora* Mart. Para utilizar como Fitocosmético** Mart. 2017. 52f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2017.

RESUMO

O Cerrado, um dos principais biomas brasileiros, tem sofrido sucessivas agressões a sua biodiversidade, ocasionando o desaparecimento de inúmeras espécies com potencial biotecnológico. Dentre as espécies típicas do Cerrado, *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), também conhecida como marolo, possui especial importância, principalmente devido à presença de fitoquímicos com ação antioxidante. O presente trabalho teve como objetivo investigar a ação antioxidante e quantificar a presença de fenóis, flavonoides e taninos nos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das folhas e da polpa de frutos de *A. crassiflora*. Foi possível verificar que o extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas de *A. crassiflora* apresentou valores de compostos fenólicos, flavonoides e taninos equivalentes aos respectivos padrões (ácido gálico, quercetina e proantocianidinas, respectivamente). Com base nestes resultados, foi produzido e testado, *in vitro*, um fitocosmético em forma de gel. Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que a formulação de um gel enriquecido com este extrato abre a possibilidade do desenvolvimento de um novo fitocosmético com atividade antienvhecimento.

Palavras-chave: Plantas nativas, Antioxidantes, Fitoquímicos, Fitocosmético.

COSTA, Gislene Parreiras. **Study of the Antioxidant Activity of Leaves and Pulp of *Annona crassiflora* Mart. To use as Phytocosmetics** 2017. 52f. Dissertation (Master in Biosciences). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2017.

ABSTRACT

The Cerrado, one of the main Brazilian biomes, has undergone successive aggressions against its rich biodiversity, causing the disappearance of numerous species with biotechnological potential. Among the typical species of the Cerrado, *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), also known as marolo, has special importance, mainly due to the presence of phytochemicals with antioxidant action. The present work had as objective to investigate the antioxidant action and to quantify the presence of phenols, flavonoids and tannins in the hydroalcoholic extracts obtained from the leaves and fruit pulp of *A. crassiflora*. It was possible to verify that the hydroalcoholic extract of *A. crassiflora* leaves contain phenolic compounds that can serve as natural sources of antioxidant agents, especially tannins. Based on these results, we produced and testedppp, *in vitro*, a phytocosmetic in gel form, obtaining very promising results. In this way, the formulation and evaluation of a gel enriched with this extract opens the possibility of the development of a new phytocosmetics with antiaging activity.

Keywords: Native plants, antioxidants, phytochemicals, phytocosmetics.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
Cerrado.....	12
<i>Annona crassiflora</i> Mart.....	14
Plantas com atividade antioxidante.....	16
OBJETIVOS	20
REFERÊNCIAS	21
Capítulo Único	
Estudo da Atividade Antioxidante de Folhas e Polpa de <i>Annona crassiflora</i> Mart. para utilizar como Fitocosmético	25
Anexo I.....	45

Introdução

Cerrado

No Brasil existe uma grande biodiversidade, sendo o bioma Cerrado um dos seus principais representantes. O Cerrado é amplamente distribuído em território brasileiro e possui mais de 6.000 espécies vegetais com valores alimentícios e medicinais, muitas das quais ainda não foram devidamente estudadas e exploradas (MYERS et al., 2000). Segundo Eiten (1972) o Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, porém, grande parte das áreas deste bioma foram transformadas em pastagens, plantações de grãos e para outras finalidades (KLINK E MACHADO, 2005).

Devido a sua localização, o Cerrado compartilha espécies com a maioria dos biomas brasileiros, especialmente com a floresta amazônica, a caatinga e a mata atlântica; contudo devido ao alto grau de endemismo, aproximadamente 45% de suas espécies são nativas e à ocupação desordenada e destrutiva de sua área, tornou este bioma o ecossistema brasileiro que mais tem sofrido agressões. A valorização e a descoberta de meios de uso sustentável da biodiversidade do Cerrado são alternativas interessantes do ponto de vista da sua conservação e de grande importância socioeconômica (MACHADO, 2010).

Existem diversos estudos sobre a caracterização físico-química de frutas nativas do Cerrado devido a sua importância como fonte de proteínas, lipídeos, taninos, carboidratos, minerais, fibras, ácidos graxos e vitaminas; além de uma grande número de substâncias bioativas, tais como carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides e taninos. Ainda, os frutos dessas espécies são atrativos pelo sabor, cor, aroma peculiar e intenso (SILVA et al., 2001).

Os frutos das espécies pertencente à família Annonaceae, muitas delas nativas do Cerrado, ocupam um lugar de destaque por apresentarem elevados teores de açúcares, vitaminas, proteínas e sais minerais, sendo utilizadas como matéria-prima para a produção de doces, geléias, sorvetes, licores ou, ainda, *in natura* (SOARES et al., 2009).

A família Annonaceae (Dicotyledonae), descrita por Antoine Laurent de Jussieu, inclui 112 gêneros com aproximadamente 2.150 espécies tropicais (MABBERLEY, 1997; MAAS et al., 2001), sendo registrados no Brasil aproximadamente 26 gêneros e 260 espécies. No Cerrado foram registradas 27 espécies de Annonaceae, perfazendo 3,5% da flora total. Destacam-se pelo seu potencial frutífero os gêneros *Rollinia*, *Duguetia* e *Annona* (NOGUEIRA et al., 2005). No gênero *Annona* destacam-se algumas espécies dos Cerrados paulistas e mineiros, tais como *Annona cacans*, *A. coriaceae* e *A. crassiflora* (Figura 1), produtoras de frutos comestíveis, que são popularmente conhecidas como *araticum*, nome derivado do tupi, e que significa “árvore de fibra rija e dura”, “fruto do céu”, “saboroso”, ou ainda “fruto mole”. Nativo do planalto central brasileiro, o araticum pode ser encontrado nas áreas de Cerradão, Cerrado, Cerrado Denso, Cerrado Ralo e Campo Rupestre. Sua distribuição ocorre no Distrito Federal e nos Estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo e Tocantins (SILVA et al., 2001).



Figura 1. *Annona crassiflora* Mart. adulta.

As árvores são de pequeno porte com a altura variando entre 4 e 8 m e o diâmetro da copa podendo chegar aos 40 cm, com caule tortuoso, revestido por uma casca áspera, e resistente a ação do fogo (SOARES et al., 2009). Apesar do lento crescimento são recomendados para arborização de ruas estreitas. A planta floresce geralmente entre os meses de outubro e novembro (LORENZI, 1998).

***Annona crassiflora* Mart.**

Esta espécie arbórea, conhecida popularmente como marolo, é nativa dos Cerrados brasileiros, e classificada dentro da divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Magnoliales, família Annonaceae. Em diferentes regiões, é também conhecida como araticum-do-Cerrado, araticum-do-campo, panã, cabeça de negro e pinha-do-Cerrado (SOARES et al., 2009). Seus frutos são ricos em vitaminas, ferro, fósforo e cálcio (ALMEIDA, 1998). A temporada de colheita ocorre entre fevereiro e abril e são comercializados para o consumo *in natura* em feiras livres e beiras de estradas. Segundo Melo (2005) os frutos são utilizados na produção de doces, licores e geléias, e os seus princípios

ativos vêm sendo explorados na produção de medicamentos para o tratamento de câncer, entre outras aplicações.

A espécie floresce durante os meses de outubro e novembro, as flores (Figura 2A) podem ser solitárias ou agrupadas, auxiliares, dotadas de pétalas carnosas de coloração verde-amarela (RIBEIRO et al., 2000; SOARES, 2002). O araticum é uma planta diplóide (RIBEIRO et al., 2000) preferencialmente alógama, com plantas funcionais reprodutiva masculinas, femininas e hermafroditas, podendo apresentar certo grau de autofecundação, a qual é preferencialmente realizada por meio da polinização cruzada, não havendo a formação de frutos por apomixia (CAVALCANTI et al., 2009). As sementes (Figura 2B) de *A. crassiflora* apresentam dormência o que dificulta a produção de mudas da espécie (RIZZINI, 1973; RIBEIRO et al., 2000; MELO, 2005). A germinação é extremamente lenta, necessitando, em condições de campo, de 240 a 260 dias para que 50% da população de sementes apresentem emergência das plântulas (RIZZINI, 1973). A frutificação se inicia em novembro, com a maturação dos frutos concentrados entre janeiro e abril. Após o plantio, a produção dos primeiros frutos (Figura 2C) é de aproximadamente quatro anos (SOARES et al., 2009); o fruto é subglobuloso, possuindo uma casca de coloração verde quando em desenvolvimento e marrom, quando maduro. Já a polpa é adocicada, podendo variar do branco ao amarelo. De acordo com Mesquita et al. (2007), o marolo é uma fruta rústica, embora sua área basal total seja influenciada positivamente pelos níveis de cálcio, magnésio e potássio no solo. Para a conservação, caracterização e uso de plantas nativas do Cerrado tais como o araticum, o estabelecimento de bancos de germoplasma, os ajustes no processo de domesticação e o estabelecimento de plantios comerciais, são de grande importância como alternativas também para o extrativismo predatório (JUNQUEIRA et al., 2008).



Figura 2. (A) Flor de *A. crassiflora*, (B) Sementes, (C) Fruto.

Leboeuf (1980) estudou a composição de metabólitos secundários em diferentes espécies da família Annonaceae, identificando a predominância de alcalóides aporfínicos e oxoaporfínicos. Além destes alcalóides, foram identificados também polifenóis, óleos essenciais, terpenos e substâncias aromáticas. Nas espécies do gênero *Annona*, os metabólitos secundários mais frequentes são os terpenos, as acetogeninas, os alcalóides e os flavonóides (SIMÕES et al., 2010; BERMEJO et al., 2005).

Plantas com atividade antioxidante

Os antioxidantes podem ser encontrados naturalmente em nosso organismo e em alimentos. Estes são responsáveis pela proteção do organismo contra a ação oxidativa dos radicais livres (PÚVOA FILHO, 1995; YOUNGSON, 1995; HALLIWELL E GUITTERIDGE, 2000), que em excesso no organismo podem desencadear várias doenças como: o câncer, doenças cardíacas e doenças degenerativas, como Mal de Alzheimer, assim como ao processo inflamatório e ao envelhecimento precoce (LOIZZO et al., 2012; ROESLER et al., 2007; SHAMI E MOREIRA, 2004).

Conforme sua estrutura, os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos. Os principais componentes do sistema antioxidante enzimático são a superóxido dismutase, a catalase e a glutathiona peroxidase, que agem no início da cadeia de

formação das espécies reativas, evitando o acúmulo dos radicais O_2^- e H_2O_2 . Os antioxidantes não-enzimáticos incluem compostos produzidos *in vivo*, tais como a glutatona reduzida, a ubiquinona, o ácido úrico e as proteínas de transporte de metais de transição (transferrina e ceruloplasmina) e compostos obtidos diretamente da dieta, tais como o betacaroteno e as vitaminas C e E (MACNEE, 2000). As espécies de Annonaceae se destacam por apresentarem atividades antioxidantes incluem os fenóis, ácidos fenólicos como flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido ascórbico, pigmentos, taninos e esteróis (BERNARDES et al., 2010).

Os compostos fenólicos compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, a síntese dos fenóis não ocorre na espécie humana e suas características e efeitos biológicos são: antiinflamatórias, anticarcinogênicas, antitrombóticas, antivirais, antimicrobianas, vasodilatadoras, imunomodulatórias e analgésicas (GUSMAN, 2001; CANTOS; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2002), expectorante, colerética (SIMÕES, 2010) e, sobretudo, inibem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

Os taninos condensados apresentam importância nos alimentos. Em baixas concentrações em frutos, os taninos conferem-lhes características sensoriais desejáveis. Portanto, em concentrações mais elevadas, conferem aos frutos e outros alimentos características adstringentes (DEGÁSPARI E WASZCZYNSKYJ, 2004). Como os taninos apresentam um potencial antioxidativo, detêm a capacidade de atuar no processo de estabilização de radicais livres (PAIVA et al., 2002).

Flavonóides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos dentre outros (MANN, 1987). Os flavonóides previnem doença arterial coronariana (doenças cerebrovasculares) (REIN et al., 2000; HALLIWELL, 1992), doenças renais e doenças do diabetes mellitus (LAPIDOT; WALKER; KANNER,

2002) e a apigenina exibe efeitos antiproliferativos sobre vários tipos de câncer, como câncer de próstata, por exemplo (GUPTA; AFAQ; MUKHTAR, 2001) e também induz mudanças morfológicas em algumas células (KUO E YANG, 1995). Em estudo desenvolvido por Zhang; Vareed; Nair (2005) foi constatado o efeito inibitório da cianidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina e malvidina na proliferação de células humanas cancerígenas, originadas em diferentes partes do corpo como estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central.

Nos últimos anos a indústria farmacêutica está empenhada em desenvolver fármacos de origem vegetal importantes para o tratamento do câncer, como os alcaloides dos fármacos vincristina e vimblastina, isolados da espécie *Catharanthus roseus*, da família Apocynaceae, originária do continente Africano, e utilizada no tratamento de diabetes (GUERITTE E FAHY, 2005). O alcalóide camptotecina é bem conhecido por ser utilizado em quimioterápicos, isolada da espécie *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), uma árvore ornamental chinesa (RAHIER; THOMAS; HECHT, 2005).

A família Annonaceae vem se destacando há mais de uma década, quanto à sua atividade farmacológica e componentes químicos, principalmente no que diz respeito ao isolamento de alcalóides (LÚCIO et al., 2015). Atualmente, os estudos sobre fitoquímica das anonáceas estão sendo intensificados, devido à presença das acetogeninas, que são uma classe de compostos com ampla atividade biológica, que também são objeto de estudo (MATSUMOTO et al., 2010), e abrange citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana (LIMA et al., 2010). Nas anonáceas são encontrados também compostos como óleos essenciais, cuja composição predominante são monoterpenos e sesquiterpenos (SILVA et al., 2001).

Foi comprovada em estudos prévios (TEMPONE et al., 2005; OLIANI, 2012) a atividade antiprotozoária dos alcalóides presentes em diversas plantas da família Annonaceae,

particularmente, na espécie *A. crassiflora*. A partir da análise do extrato etanólico obtido das sementes de *A. crassiflora*, foram identificadas acetogeninas com atividade citotóxica frente a várias linhagens de células tumorais (GONÇALVES; MOSQUEIRA; PIMENTA, 2010).

Dentre os compostos fenólicos com efeito antioxidante e potencial de utilização para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos já identificados na espécie *A. crassiflora*, destacam-se: taninos, tocoferóis, esteróides, ácidos fenólicos e flavonoides (ROESLER et al., 2007; LUZIA E JORGE, 2013; LAGE et al., 2014).

Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo investigar a ação antioxidante e quantificar os fenóis totais, flavonoides e taninos condensados presentes no extrato hidroalcoólico da polpa e das folhas de *A. crassiflora*. Além disso, foi objetivo deste trabalho desenvolver um fitocosmético a partir do extrato que apresentou os melhores resultados farmacológicos e fitoquímicos e avaliar a atividade antioxidante desse bioproduto.

Referências

- ALMEIDA, S. P. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, DF: Embrapa CPAC, p. 247-281, 1998.
- BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from An- Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Product Reports*, v. 22, n. 2, p. 269-303, 2005.
- BERNARDES, N. R.; PESSANHA, F. F.; OLIVEIRA, D. B. Alimentos Funcionais: Uma breve revisão. *Ciência e Cultura - Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB*, v. 6, n. 2, p. 11-19, 2010.
- CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC– DAD– MS– MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 20, p. 5691-5696, 2002.
- CAVALCANTE, T. R. M.; NAVES, R. V.; FRANCESCHINELLI, E. V.; SILVA, R. D. Polinização e formação de frutos em araticum. *Bragantia*, v. 68, n. 1, p. 13-21, 2009.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos [antioxidant properties of phenolic compounds]. *Visão Acadêmica*, v. 5, p. 33-40, 2004.
- EITEN, G. The cerrado vegetation of Brazil. *The Botanical Review*, v. 38, n. 2, p. 201-341, 1972.
- GONÇALVES, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; PIMENTA, L. P. S. *Annona crassiflora* Wood Constituents: Antimalarial Efficacy, Larvicidal and Antimicrobial Activity. *Comprehensive Bioactive Natural Products-Efficacy, Safety & Clinical Evaluation*, v. 1, 2010.
- GUÉRITTE, F.; FAHY, J. The vinca alkaloids. *Anticancer agents from natural products*, v. 10, p. 123-135, 2005.
- GUPTA, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 287, n. 4, p. 914-920, 2001.
- GUSMAN, J.; MALONNE, H.; ATASSI, G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, v. 22, n. 8, p. 1111-1117, 2001.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, 1992.
- HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. New York: Oxford Science Publications, 936p, 2000.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

JUNQUEIRA, N.; FALEIRO, F.; BRAGA, M.; PEIXOTO, J. Domesticação de espécies da flora nativa do Cerrado. PARRON, L. M.; AGUIAR, L. M. S.; DUBOC, E.; OLIVEIRA FILHO, E. C.; CAMARGO, A. J. A.; AQUINO, F. G. (Ed.). *Cerrado: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável*. Planaltina: Embrapa Cerrados p. 125-163, 2008.

KLINK, A. C.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. Brasília: Megadiversidade, v. 1, n. 1, 2005.

KUO, M. L.; YANG, N. C. Reversion of vH-ras-transformed NIH 3T3 cells by apigenin through inhibiting mitogen-activated protein kinase and its downstream oncogenes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 212, n. 3, p. 767-775, 1995.

LAPIDOT, T.; WALKER, M. D.; KANNER, J. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic β -cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 25, p. 7220-7225, 2002.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1980.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*, v. 122, n. 4, p. 1129-1138, 2010.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; MENICHINI, F.; MASTELLONE, V.; AVALLONE, L.; MENICHINI, F. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill.(cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 25, n. 2, p. 179-184, 2012.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 352 p, 1998.

LÚCIO, A. S.; ALMEIDA, J. R.; DA-CUNHA, E. V.; TAVARES, J. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. *Alkaloids Chemistry and Biology*. v. 74, p. 233-409, 2015.

MAAS, P. J.; DE KAMER, H. M. V.; JUNIKKA, L.; DE MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, 52: 65-98, 2001.

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

MACHADO, R. R. B. Diversidade arbóreo-arbustiva da caatinga e cerrado piauienses: uma aplicação ao meio urbano, 2010. p. 34.

- MACNEE, W. Oxidants/antioxidants and COPD. CHEST Journal, v. 117, n. 5 (suppl. 1), p. 303S-317S, 2000.
- MANN, J. Secondary metabolism. Oxford: Clarendon Press, p. 374, 1987.
- MATSUMOTO, R. S.; RIBEIRO, J. P. N.; TAKAO, L. K.; LIMA, M. I. S. Allelopathic potential of leaf extract of *Annona glabra* L.(Annonaceae). Acta Botanica Brasilica, v. 24, n. 3, p. 631-635, 2010.
- MELO, D. L. B. Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart. Lavras, 2005. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- MESQUITA, M. A. M.; NAVES, R. V.; SOUZA, E. D.; BERNARDES, T. G.; SILVA, L. B. Caracterização de ambientes com alta ocorrência natural de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) no Estado de Goiás. Revista Brasileira de Fruticultura, **ecol**, v. 29, n. 1, p. 15-19, 2007.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- OLIANI, J. Estudo químico e avaliação das atividades antiprotozoária e antimicobacteriana *in vitro* dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae). São Paulo, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- PÛVOA FILHO, H. Antioxidantes. In: PÛVOA FILHO, H. Radicais Livres: em Patologia Humana. Rio de Janeiro: Imago, p. 211-246, 1995.
- RAHIER, N. J.; THOMAS, C. J.; HECHT, S. M. Camptothecin and its Analogs. In: CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. Anticancer Agents from Natural Products. Boca Raton: Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group (Eds.), p. 5-22, 2005.
- REIN, D.; PAGLIERONI, T. G.; PEARSON, D. A.; WUN, T.; SCHMITZ, H. H.; GOSSELIN, R.; KEEN, C. L. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. The Journal of Nutrition, v. 130, n. 8, p. 2120S-2126S, 2000.
- RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. de; SCALOPPI JUNIOR, E. J.; FONSECA, C. E. L. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.). Jaboticabal: FUNEP, 52p.(folha /livro), 2000.
- RIZZINI, C. T. Dormancy in seeds of *Anona crassiflora* Mart. Journal of Experimental Botany, v. 24, n. 1, p. 117-121, 1973.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
- SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. Machado. Licopeno como agente antioxidante. Revista de Nutrição, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004.

SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. Frutas do Cerrado. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 179p., 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS/ EDUFSC, 2010.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. Revista de Nutrição, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOARES, F. P. et al. Marolo: uma frutífera nativa do cerrado. Boletim Técnico, Lavras, n. 82, p. 1-17, Ed. UFLA, 2009.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. T.; DE ANDRADE, H. F.; DE AMORIM GUALDA, N. C.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. Phytomedicine, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005.

YOUNGSON, R. Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes. Rio de Janeiro: Campus, 151p., 1995.

ZHANG, Y.; VAREED, S. K.; NAIR, M. G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. Life sciences, v. 76, n. 13, p. 1465-1472, 2005.

Capítulo Único

Revista Brasileira de Farmacognosia

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E POLPA DE *Annona crassiflora* Mart. VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE UM FITOCOSMÉTICO

Gislene Parreiras Costa^a, Lucineia dos Santos^a, Darío Abel Palmieri^{a1}

^aUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Biotecnologia, Avenida Dom Antônio 2100, CEP: 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

¹Autor correspondente

Tel.: +5518 33025800

E-mail: darioap@assis.unesp.br

Resumo

Dentre as espécies típicas do Cerrado, *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), também conhecida como araticum ou marolo, possui especial importância farmacológica e fitocosmética, devido à presença de compostos bioativos como ação antioxidante. O presente trabalho teve como objetivo investigar a ação antioxidante e quantificar a presença de fenóis, flavonóides e taninos nos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das folhas e da polpa de frutos de *A. crassiflora*. A partir dos resultados da avaliação da ação antioxidante dos extratos, foi possível produzir e testar *in vitro* um fitocosmético em forma de gel. O extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas de *A. crassiflora* foi o que apresentou a melhor ação antioxidante nas condições testadas. Estes resultados demonstram o uso potencial deste extrato para o desenvolvimento de um fitocosmético com efeito antioxidante e protetor.

Palavras-chave: *Annona crassiflora*, radicais livres, antioxidante.

1. Introdução

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil (Eiten, 1972), apresentando mais de 1200 espécies de plantas. Destas, cerca de 110 possuem um forte potencial econômico. Muitos dos seus frutos são saborosos e contêm proteínas, sais minerais, ácidos graxos, vitaminas do complexo B e carotenóides. São atrativos pelo sabor, cor, aroma peculiar e intenso. Porém, mesmo apresentando tanta riqueza as espécies do Cerrado estão sendo pouco utilizadas e exploradas comercialmente (Silva et al., 2001).

Entre os gêneros encontrados no Cerrado encontram-se o gênero *Annona* que atualmente é composto por uma espécie entre as *A. crassiflora* é popularmente conhecida como marolo, é uma espécie arbórea nativa do Cerrado brasileiro, pertencente à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Magnoliales e a família Annonaceae. Em diferentes regiões, o fruto também é conhecido como araticum-do-Cerrado, araticum-do-campo, panã, cabeça de negro e pinha-do-Cerrado (Soares et al., 2009). Seus frutos são ricos em vitaminas, ferro, fósforo, cálcio e moléculas antioxidantes (Almeida, 1998).

Nos últimos anos a indústria farmacêutica tem se empenhado em desenvolver produtos de origem vegetal, devido ao fato destes apresentarem importantes propriedades farmacológicas e terapêuticas. Neste sentido, o objetivo de nosso trabalho foi desenvolver um fitocosmético a partir do extrato da *A. crassiflora*. Para isso, foi investigada a ação antioxidante desta planta e quantificados os níveis de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal

2.1.1 Coleta e preparação do material vegetal

As folhas e os frutos da *A. crassiflora* M. foram coletados no município de Assis/São Paulo/Brasil (latitude: 22°39'42"S, longitude: 50°24'44"W, altitude: 546m), de ocorrência nativa com colaboração a dos pesquisadores do Instituto Florestal do Estado de São Paulo, localizado na cidade de Assis/SP, local onde foi realizada a identificação e o depósito da exsicata no herbário da Estação Ecológica de Assis. O material coletado foi limpo e submetido a secagem em estufa de ar circulante ($\pm 40^{\circ}\text{C}$). As folhas foram pulverizadas em moinho de facas. Os frutos foram despulpados e as polpas congeladas a -18°C e liofilizadas.

2.1.2 Preparação dos extratos

Os extratos hidroalcoólicos da polpa e da folha da *A. crassiflora* foram preparados utilizando 10 g de material seco em 100 ml de solução (etanol 70% e água destilada 30%). Em seguida os extratos foram submetidos à agitação mecânica por um período de 90 min, permanecendo em maceração estática ao abrigo da luz por 3 dias. O resíduo vegetal foi retirado por filtração a vácuo e reextraído por duas vezes. Os extratos obtidos foram levados ao rotaevaporador para eliminação completa do álcool. Os extratos foram colocados em estufa até obtenção do peso seco constante. Ambos extratos foram armazenados em frasco de vidro âmbar (para evitar degradação por oxidação), protegido da luz.

2.2 Preparo dos extratos em diferentes concentrações

Os extratos hidroalcoólicos secos, da polpa e folha da *A. crassiflora*, foram diluídos em álcool etílico P.A. nas concentrações de 1.000 a 10.000 $\mu\text{g/mL}$. Estas diluições foram empregadas no teste da atividade antioxidante DPPH e de lipoperoxidação, avaliação das absorvâncias e na quantificação de fenóis, flavonoides e taninos.

2.3. Caracterização fitoquímica dos extratos da *A. crassiflora*

2.3.1 Dosagem de fenóis totais

O método utilizado foi o de *Folin-Ciocalteu* para a determinação dos compostos de fenóis totais, utilizando-se ácido gálico como padrão de comparação. A cada 0,5 mL de amostra de cada extrato em diversas concentrações foram adicionados 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico). Após 3 min foi adicionado 1 mL de solução de bicarbonato e sódio (Na_2CO_3) saturada a 10% e a mistura armazenada por 1 h. A absorbância foi medida a 725 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em miligrama de ácido gálico por grama de extrato seco (mg/g).

2.3.2 Dosagem de flavonoides

Os flavonoides totais dos extratos foram quantificados utilizando espectrofotômetro UV-Vis. As amostras foram preparadas segundo a metodologia de Zhishen; Mengcheng; Jianming (1999) com modificações, baseado na complexação dos flavonoides com cloreto de alumínio (AlCl_3), ocorrendo o deslocamento das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda. Uma alíquota de 500 μL dos extratos em diversas concentrações foram misturados com 1,5 mL de álcool etílico absoluto P.A. e 0,1 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) 10%. Foi adicionado 0,1 mL de acetato de sódio (CH_3COONa) e os tubos foram completados para 5,0 mL com 2,8 mL de água destilada. Os tubos com as misturas foram agitados e homogeneizados. Após 30 min ao abrigo da luz foi realizada a leitura a 425 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em miligrama de quercetina por grama de extrato seco.

2.3.3 Dosagem de taninos condensados

Os taninos foram analisados segundo a metodologia descrita por Price; Hagerman; Butler (1980) com modificações realizadas pela nossa equipe, por meio de reação colorimétrica com solução de vanilina empregando diferentes concentrações de extratos. Em tubos de ensaios pré-aquecidos a 30 °C foi adicionado 1,0 mL da amostra, e acrescentados 2,5 mL de H₂SO₄ 25% e 2,5 mL de vanilina 1%. As amostras foram homogeneizadas e aquecidas durante 20 min à temperatura de 30 °C. A leitura foi realizada a 500 nm em espectrofotômetro, obtendo-se assim a concentração de taninos a partir de uma curva padrão de proantocianidinas, sendo os resultados expressos em miligrama de proantocianidinas por grama de extrato seco.

2.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da *A. crassiflora*

2.4.1 Por sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH)

Para a avaliação do antioxidante o método utilizado foi o decaimento da absorvância no comprimento de onda observado entre 515 a 528 nm, produzido pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical DPPH.

Os experimentos com os extratos hidroalcoólicos das folhas e polpa de *A. crassiflora* foram realizados em triplicata para fins estatísticos, utilizando a solução de 1 mL de tampão acetato (pH 5,5 e 100 mM), 1,25 mL de etanol P.A., 500 µL de solução de DPPH[•] (250 µM) e de 50 µL das amostras de cada extrato. Os extratos reagiram com o radical DPPH[•] por um período aproximado de 30 min em ambiente de pouca luminosidade e em seguida foram submetidos ao espectrofotômetro UV-Vis a um comprimento de onda de 517 nm, comprimento de onda em que o DPPH[•] apresentou máxima absorvância. O álcool etílico absoluto foi utilizado como controle. O cálculo da atividade antioxidante dos extratos, ou seja, a capacidade de sequestrar radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]) foi expressa

pelo percentual de inibição de oxidação do radical, de acordo com a fórmula: atividade antioxidante (%) = $[(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$; onde A_{amostra} é a absorbância das amostras após 30 min e A_{controle} é a absorbância do DPPH, ambos a 517 nm.

2.4.2 Pelo método de lipoperoxidação *in vitro*

Visto que a descoberta de novos extratos vegetais que, optamos por avaliar o stress oxidativo é consequentemente o peróxido lipídico de suma importância. Analisamos a capacidade do extrato da *A. crassiflora*, em inibir o processo de peroxidação lipídica. Para tanto foi escolhido o extrato da folha que apresentou um melhor resultado no teste. Este ensaio foi realizado de acordo com o modelo proposto por Daker et al. (2008), com algumas modificações. Como fonte de lipídios foi usado um homogeneizado de gema de ovo. Assim, inicialmente 10 g de gema foram homogeneizados em 100 mL de tampão fosfato 0.1 M.

Em tubos de vidro com tampa de rosca foi adicionado 0,5 mL de solução de gema, 0,4 de água destilada e 0,1 ml da solução do extrato hidroalcoólico da folha da *A. crassiflora* em álcool metílico nas concentrações já definidas, de modo a obter as concentrações finais de 1,25, 2,5 e 5 mg/mL. A este meio foi adicionado 0,1 ml de solução AAPH (2,2-azobis amidinopropano dihidroclorido) a 0,12 M. Incubado a 37°C por 30 min. Adicionado 1,5mL de TCA (ácido tricloroacético) a 20% e 1,5 mL de TBA (Ácido Tiobarbitúrico) a 1%. Esta mistura foi incubada a 95°C por 60 min, em seguida foram adicionados 5,0 mL de butanol a cada tubo e centrifugado a 3500g por 10 min. Após este período foi retirado 1 mL do sobrenadante e medida a absorbância a 532 nm.

Como controle negativo (CN) foi utilizado álcool metílico absoluto em substituição aos extratos da folha, também, no volume de 0,1 ml. Como controle positivo (CP) foi utilizado 0,1 mL de uma solução contendo quercetina na concentração de 0,1 mg/mL, dissolvida em álcool metílico. O branco (B) continha apenas álcool metílico.

A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição da peroxidação de lipídeos, segundo a equação: Inibição da peroxidação lipídica (%) = $[(A_{CN} - A_B) - (A_A - A_B)] / (A_{CN} - A_B) \times 100$; onde A_A é a absorbância das amostras, A_{CN} é a absorbância do controle negativo e A_B é a absorbância do branco.

2.5 Preparo da formulação do gel do extrato da folha *A. crassiflora*

Gel de Natrosol é o gel de maior interesse para veiculação de ativos em dermatologia. Apresenta caráter não iônico sendo solúvel em água quente ou fria. Ele é indicado para incorporação de fármacos que diminui o pH final da formulação como, por exemplo, ácido glicólico. Forma filme não oclusivo e de fácil remoção com água.

2.6 Preparo de soluções com o gel de *A. crassiflora*

Foi preparada uma solução com a concentração 50 mg/ml do extrato seco, 1 g do gel, contendo 100 mg do extrato, foi dissolvido em 1 mL de álcool metílico. A partir desta foram realizadas sucessivas diluições de modo a obter as concentrações de 12,5; 6,25 e 3,12 mg/mL, que foram empregadas no teste de sua atividade antioxidante.

2.7 Avaliação da atividade antioxidante do gel de *A. crassiflora*

Neste teste a atividade antioxidante do gel nas concentrações de 12,5, 6,25 e 3,12 mg/mL foi avaliada pelo método do sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH), de acordo com metodologia já descrita no item 2.4.1, para a avaliação dos extratos.

3. Resultados

3.1 Dosagem de fenóis totais

Para a quantificação de fenóis totais no extrato da folha da *A. crassiflora* inicialmente foi plotada uma curva de calibração, utilizando o ácido gálico como padrão (Figura 1).

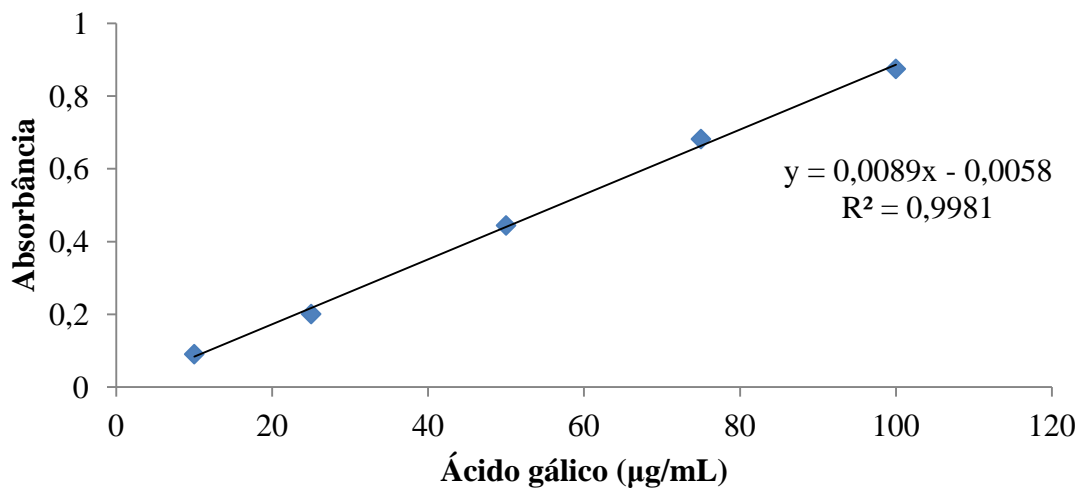


Figura 1. Curva de calibração com ácido gálico.

Posteriormente, os valores das absorbâncias medidos para cada amostra foram inseridos na curva de calibração e então obtidos os valores dos compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico. Sendo os resultados expressos em miligrama de ácido gálico por grama de extrato seco (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de compostos fenólicos ($\text{mg}_{\text{ácido gálico}}/\text{g}_{\text{extrato seco}}$) presentes no extrato das folhas e da polpa de *A. crassiflora*

Concentração (mg/mL)	Folhas	Polpa
1,0	15,458	13,443
2,5	20,746	14,049
5,0	29,107	24,549
7,5	48,462	23,197
10,0	123,647	37,224

3.2 Dosagem de flavonoides

A dosagem de flavonoides dos extratos avaliados consistiu primeiramente em plotar uma curva de calibração, em que se utilizou a quercetina como padrão (Figura 1).

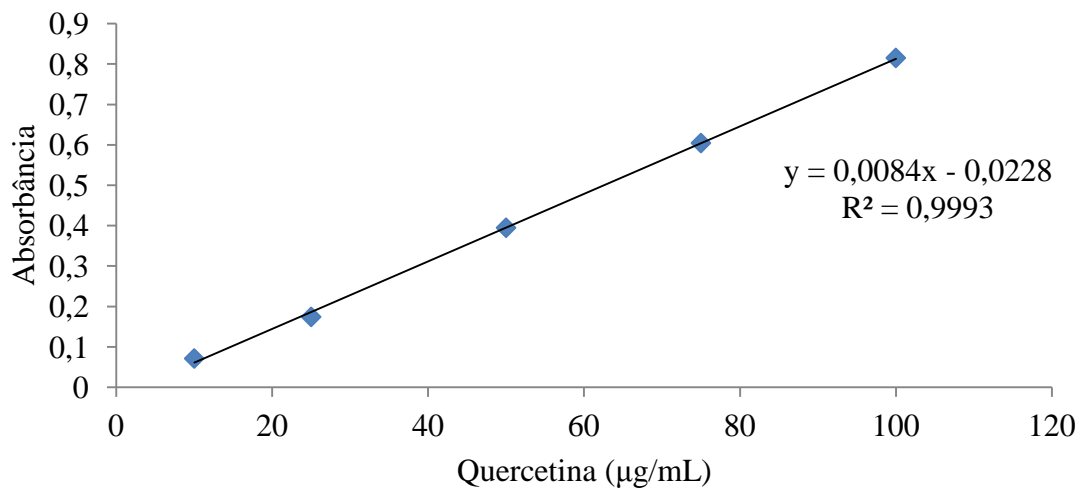


Figura 2. Curva de calibração com quercetina.

Os valores das absorbâncias medidas para as amostras de cada extrato foram inseridos na curva de calibração e então obtidas as concentrações dos compostos flavonóicos equivalentes à quercetina. Sendo os resultados expressos em miligrama de quercetina por grama de cada extrato seco (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de compostos flavonoides ($\text{mg}_{\text{quercetina}}/\text{g}_{\text{extrato seco}}$) presentes no extrato das folhas e da polpa de *A. crassiflora*.

Concentração (mg/mL)	Folhas	Polpa
1,0	1,005	27,277
2,5	1,657	31,323
5,0	1,328	40,661
7,5	0,959	47,510
10,0	0,954	46,600

3.3 Dosagem de taninos condensados

Os taninos condensados encontrados na dosagem desse metabólito, no extrato de folha desse fitoquímico foi avaliada quantitativamente. Para isso, primeiramente uma curva de calibração, utilizando as proantocianidina como padrão foi plotada (Figura 3).

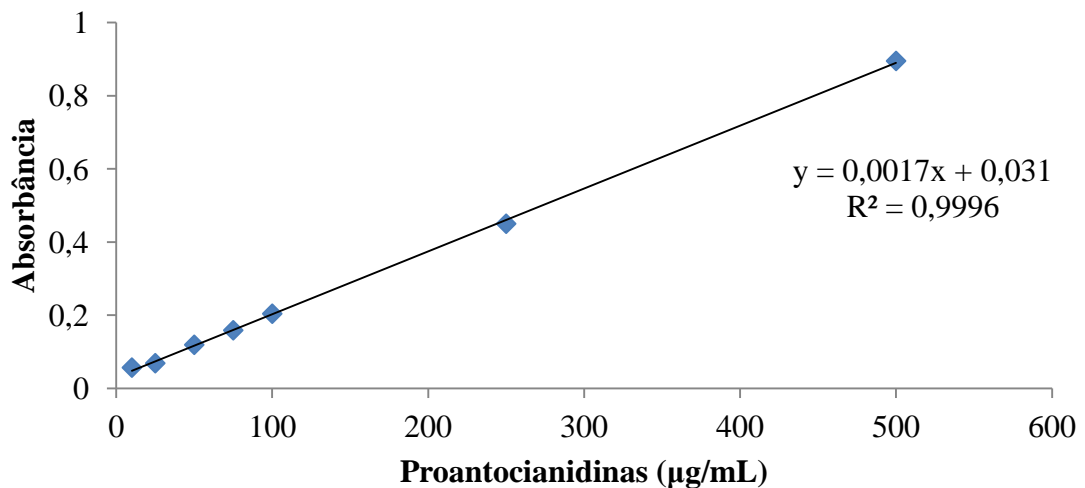


Figura 3. Curva de calibração com proantocianidinas.

A inserção dos valores da absorbância medido para cada amostra dos extratos na curva de calibração resultou nas concentrações dos taninos condensados equivalentes às proantocianidinas. Sendo os resultados expressos em miligrama de proantocianidinas por grama de extrato seco (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração de taninos condensados ($\text{mg}_{\text{proantocianidinas}}/\text{g}_{\text{extrato seco}}$) presente no extrato da folha de *A. crassiflora*.

Concentração (mg/mL)	Folhas	Polpa
1,0	30,882	0
2,5	80,784	0
5,0	183,941	0
7,5	232,862	0
10,0	122,607	0,882

3.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos por meio do teste do DPPH.

Os valores médios da atividade antioxidante (AA), resultantes da análise de cada um dos extratos de *A. crassiflora* estão expressos em porcentagem e foram obtidos por meio do teste de sequestro de radical livre estável DPPH (Tabela 4). Este método foi validado com o uso da quercetina a 0,1 mg/mL que promoveu inibição de 95,73%.

Tabela 4. Percentual dos valores médios da atividade antioxidante (AA) e dos extratos das folhas e da polpa de *A. crassiflora*, avaliados em diferentes concentrações.

Concentração (mg/mL)	AA (%) Folhas	AA (%) Polpa
1,0	75,313	10,826
2,5	67,052	7,494
5,0	76,095	12,390
7,5	84,136	44,806
10,0	90,425	69,743

3.5 Avaliação da lipoperoxidação do extrato da folha de *A. crassiflora in vitro*.

O método da peroxidação lipídica foi validado com o uso da quercetina a 0,1 mg/mL e obteve inibição de 92,76% (Tabela 5). O teste mostrou que o extrato obtido a partir das folhas de *A. crassiflora* também apresentou capacidade de inibição à lipoperoxidação.

Tabela 5. Porcentagem de inibição da peroxidação lipídica pelo extrato obtido a partir das folhas de *A. crassiflora*.

Concentração do Extrato (%)	Inibição (%)
1,0	89,14
2,5	91,40
5,0	95,25

3.6. Avaliação da atividade antioxidante do gel enriquecido com o extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas de *A. crassiflora* Mart.

O gel enriquecido com o extrato a partir das folhas *A. crassiflora* apresentou uma atividade antioxidante, pois foi capaz de sequestrar radicais livres DPPH, no teste realizado.

Tabela 6: Percentual dos valores médios da DPPH do gel enriquecido com o extrato da folha da *A. crassiflora*, por meio do teste do DPPH avaliados em diferentes concentrações.

Concentração (mg/mL)	AA (%)
12,5	63,31
6,25	38,20
3,12	5,34

4. Discussão

A atividade antioxidante de plantas está correlacionada à quantidade de seus compostos fenólicos (Cheung; Cheung; Ooi, 2003). Assim, tem sido mostrado, que os flavonoides possuem a capacidade de inibir a xantina oxidase, enzima responsável pela oxidação de tecidos, sendo, portanto, capazes de inibir a formação de radicais livres e de prevenir o envelhecimento precoce. A capacidade de remoção de radicais livres dos flavonoides pode prevenir processos de estresse oxidativo, que causam a morte celular (apoptose), como a degeneração de neurônios e membranas celulares (Parkinson e mal de Alzheimer) (Giasson et al., 2002). Além disso, diversos estudos têm evidenciado que os taninos possuem ação contra determinados microrganismos, como agentes carcinogênicos e causadores de toxicidade hepática. Além disso, podem agir como anti-inflamatório e cicatrizante, e até como inibidores da transcriptase reversa em HIV (Monteiro; Albuquerque; Araújo, 2005).

Os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para a ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares, e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal (Júnior et al., 1998). Assim, o equilíbrio entre a produção e o combate de radicais livres é fundamental para manter a integridade das estruturas moleculares – proteínas, lipídios, carboidratos, nucleotídeos, necessária para sustentar a homeostase metabólica. A reação dos radicais livres com os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (Lima e Abdalla, 2001). Isto porque, a peroxidação lipídica induzida por radicais livres constitui um dos danos moleculares mais expressivos do processo metabólico degenerativo molecular. A peroxidação lipídica está relacionada ao envelhecimento celular e muitas doenças podem ser por ela ocasionadas, como aterosclerose, diabetes *mellitus*,

insuficiência renal crônica, artrite reumatoide e doenças neurodegenerativas (Abuja e Albertini, 2001).

Avaliação dos compostos fenólicos, flavonoides e taninos, os resultados obtidos neste trabalho evidenciou que o extrato hidroalcoólico obtido a partir da polpa de *A. crassiflora* apresentou as maiores concentrações de flavonoides, enquanto que o extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas apresentou a maior concentração de compostos fenólicos e de taninos condensados. Devido aos testes de dosagem tornou-se evidente que as folhas apresentaram maiores concentrações de compostos.

A molécula de DPPH[·] é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm (Molyneux, 2004). Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH[·], reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH[·], a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido. Esta habilidade foi primeiramente avaliada espectroscopicamente por Ressonância de Elétron Spin (RES), uma vez que a intensidade do sinal do radical DPPH[·] é inversamente relacionada com a concentração do antioxidante testado e o tempo de reação (Chen et al., 2000).

Pelo método do DPPH, a análise revela que o extrato da folha da *A. crassiflora* apresentou atividade antioxidante, ao padrão quercetina. Ao compararmos a concentração de compostos fenólicos presentes nos extratos da *A. crassiflora*, com a atividade antioxidante apresentada pelos mesmos, é possível sugerir que a intensidade desta atividade biológica está correlacionada com uma alta concentração desses compostos presentes nos extratos, principalmente de taninos condensados, visto que o extrato hidroalcoólico obtido a partir das

folhas de *A. crassiflora* apresentou altas concentrações de taninos e maior atividade antioxidante.

Hatano et al. (1989) em estudo detalhado de várias espécies vegetais, determinou que o alto peso molecular e a presença dos grupos hidroxilo dos compostos fenólicos promovem um aumento do sequestro de radicais DPPH, ou seja, diminui o efeito oxidante do radical. Oliveira Junior et al. (2013) relataram que flavonoides e taninos presentes em extratos da espécie *Neoglaziovia variegata* conferem alta atividade antioxidante. O extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas da *A. crassiflora* que apresentou a maior atividade antioxidante avaliada pela técnica de DPPH foi avaliado quanto à sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica, sendo possível constatar uma atividade antioxidante comparável ao padrão quercetina.

Dessa forma, os resultados obtidos com o extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas de *A. crassiflora* se mostraram promissores para o desenvolvimento de um fitocosmético com efeito antioxidante e protetor, pois se trata de um extrato bruto, sem o isolamento dos metabólitos secundários específicos que respondem por essa ação. E usa esse produto desta forma é um, método considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais simples e viável precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais ricos em flavonoides e terpenoides (Szabo et al., 2007).

Na literatura recente existem numerosos relatos de que vários polifenóis, como os flavonoides e as proantocianidinas (taninos condensados) presentes em diversas espécies vegetais são capazes de exercer efeitos antioxidantes (Ramkissoon et al., 2013; Sadowska-Bartosz e Bartosz, 2015). Esses resultados corroboram ainda mais a importância dos resultados obtidos no presente estudo.

Os extratos vegetais certamente estão sendo presente da cosmetologia. Neste sentido, o gel de natrosol enriquecido com uma concentração de 12,5 mg/mL do extrato hidroalcoólico

obtido a partir das folhas da *A. crassiflora* apresentou alta atividade antioxidante. Este resultado sugere que a concentração dos compostos fenólicos vegetais, em especial dos taninos condensados, presentes nas folhas desta planta, atuam como protetores do estresse oxidativo por eliminar as espécies reativas de oxigênio. Embora não tenha sido realizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o isolamento de suas biomoléculas e aprimoramento da formulação do fitocosmético e já foi obtido um extrato que permite futuras perspectivas.

5. Conclusão

O presente estudo demonstrou que o extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas de *A. crassiflora* contém compostos fenólicos que podem servir como fontes naturais de agentes antioxidantes, em especial os taninos. Descartamos a utilização da polpa para a realização de teste para realização do gel pelo seu pouco rendimento de antioxidante. Assim, a formulação e avaliação de um gel enriquecido com este extrato abre a possibilidade do desenvolvimento de um novo fitocosmético com atividade antienvhecimento. Devido a falta de aperfeiçoamento de nossos estudos ainda não conseguimos obter dados se o araticum nativo é mais viável do que o araticum comercial.

Referências

- Abuja, P.M., Albertini, R., 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta.*, 306, 1-17.
- Almeida, S.P., 1998. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina, DF: EMBRAPA CPAC, 247-281.
- Chen, C., Tang, H., Sutcliffe, L.H., Belton, P.S., 2000. Green tea polyphenols react with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radicals in the bilayer of liposomes: direct evidence from electron spin resonance studies. *J. Agric. Food Chem.*, 48, (11) 5710-5714.
- Cheung, L.M., Cheung, P.C.K., Ooi, V.E.C., 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.*, 80(2), 249-255.
- Daker, M., Abdullah, N., Vikineswary, S., Goh, P.C., Kuppusamy, U.R., 2008. Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabilizer of lipid-rich foods. *Food Chem.*, 107, 1092-1098.
- Eiten, G., 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Bot. Rev.* 1., 38(2), 201-341.
- Giasson, B.I., Ischiropoulos, H., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., 2002. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, 32, 1264-1275.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free Radic. Biol. Med.* 3 ed. New York: Oxford Science Publications, 936p.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T., Okuda, T., 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. : *Chem. Pharm. Bull.*, 37(8), 2016-2021.
- Júnior, A.A.J., Chiarello, P.G., Bernardes, M.S.M., Vannucchi, H., 1998. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina Ribeirão Preto(RPRET. RIFAINA)*., 31, 434-449.
- Klink, A.C., Machado, R.B., 2005. A conservação do cerrado brasileiro. Brasília: Megadiversidade, 1(1).
- Lage, G.A., Medeiros, F.D.S., Furtado, W.D.L., Takahashi, J.A., Filho, J.D.D.S., Pimenta, L.P.S., 2014. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. *Nat Prod Res*, 28(11), 808-811.
- Lima, E.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. bras. ciênc. farm.*, 37(3), 293-303.

- Loizzo, M.R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., Menichini, F., 2012. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill.(cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *J. Food Comp. Anal.*, 25(2), 179-184.
- Luzia, D.M.M., Jorge, N., 2013. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. *Ind Crops Prod.*, 42, 231-235.
- Maas, P. J.; De Kamer, H. M. V.; Junikka, L.; De Mello-Silva, R.; Rainer, H., 2001. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rdza*, 52: 65-98.
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH[•]) for estimating antioxidant activity. (*SJST*), 26, 211-219.
- Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Araújo, E.L., 2005. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova*, 28(5), 892-896.
- Oliveira Junior, R.G., Araújo, C.S., Souza, G.R., Guimarães, A.L., Oliveira, A.P., Lima-Saraiva, S.R.G., Morais, A.C.S., Santos, J.S.R., Almeida, J.R.G.S., 2013. *In vitro* antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). (*JAPS*), 3(1), 122-127.
- Price, M.L., Hagerman, A.E., Butler, L.G., 1980. Tannin content of cowpeas, chickpeas, *J. Agric. Food Chem.*, 28(2), 459-461.
- Pûvoa Filho, H. Antioxidantes. In: Pûvoa Filho, H. 1995. *Radicais Livres: em Patologia Humana*. Rio de Janeiro: Imago, p. 211-246.
- Ramkisson, J.S., Mahomoodally, M.F., Ahmed, N., Subratty, A.H., 2013. Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pac J Trop.*, 6(7), 561-569.
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S., Pastore, G.M., 2007. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Food Sci.*, 27(1), 53-60.
- Sadowska-Bartosz, I., Bartosz, G., 2015. Prevention of protein glycation by natural compounds. *Molecules*, 20, 3309-3334.
- Shami, N.J.I.E., Moreira, E.A. Machado.,2004. Licopeno como agente antioxidante. *Rev. nutr.*,17(2), 227-236.
- Silva, D. B.; Silva, J. A.; Junqueira, N. T. V.; Andrade, L. R. M. *Frutas do Cerrado*. 2001. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 179p.
- Soares, F.P. et al., 2009. Marolo: uma frutífera nativa do cerrado. *BTAQC*, Lavras, n. 82, p. 1-17, Ed. UFLA.
- Szabo, M.R., Idituiu, C., Chambre, D., Lupea, A.X., 2007. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chem. Pap.*, 61, 214-216, 2007.
- Youngson, R.1995. *Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes*. Rio de Janeiro: Campus. 151p.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64, (4)555-559.

Anexo I

The Revista Brasileira de Farmacognosia (*Brazilian Journal of Pharmacognosy*) is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews, and communications in the field of Pharmacognosy (the study of biologically active natural products).

1. General rules

1.1 All submitted manuscripts must be unpublished. The simultaneous submission of manuscripts describing the same work to other journals is not recommended. The Journal will accept contributions on the understanding that the author has obtained the necessary authority for publication; in the case of several authors, each of them should have consented to the corresponding author.

1.2 The Revista Brasileira de Farmacognosia accepts for publication original scientific work, reviews, and communication articles written only in English. The content of the text is of entire responsibility of the author(s), and does not necessarily reflect the opinion of the Editor, Editorial Board or members of the Advisory Board.

1.3 Manuscripts written by authors whose mother language is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission. Assistance of independent editing services can be found at <http://www.sbfgnosia.org.br/revista/englishassistance.html>. All services are paid for and arranged by the author, and the use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

1.4 The Revista Brasileira de Farmacognosia reserves the right to submit all received manuscripts to *ad hoc* referees, whose names will be kept confidential, and will have the authority to decide on the pertinence for acceptance. Referees may send back manuscripts to Editor-in-Chief, or to Section Editors, for transmission to the author(s) with suggestions for necessary alterations, which are to be made in order to conform to the standards and editorial rules of the Journal.

1.5 All articles involving studies with humans or animals should have the approval and authorization of the Ethics Committees on Research on Human Beings or on Animals of the institutions to which the author(s) belong.

1.6 All plant, microorganism, marine organism materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name of the person identifying the biological material, and the location of the voucher specimen.

1.7 Authors should be prepared to provide documentary evidence that approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection and, if applicable, to follow the rules concerning the biodiversity rights.

1.8 It is desirable manuscripts dealing with essential oils that contain seasonal harvest and biological activity exploring mechanisms of action or synergism.

1.9 The journal will not accept responsibility for research works which do not comply with the author's country of residence legislation.

1.10 We strongly recommend that authors avoid stating that the popular or traditional use of a certain herb was confirmed by pre-clinical, *in vitro* or *in vivo* tests using animals.

1.11 The following immediate rejection criteria apply:

- i. the manuscript does not fall into the areas of interest of the Journal;
- ii. manuscripts not formatted in accordance with the standards of the journal (see Section 3);
- iii. the manuscript results are preliminary;
- iv. manuscripts reporting activity data without comparison to a reference, or without a positive control, or no proper controls, and not based on adequate statistics;
- v. the biological source (*e.g.* plant, microorganism, marine organism etc.) is not clearly identified, authenticated, and documented;
- vi. experimental work on antioxidant activity of crude extracts without isolation, identification and content estimation of the active compounds;
- vii. experimental work on antimicrobial activity with crude extracts without isolation and identification of the active compounds, with large MIC values ($\mu\text{g/mL}$) for antimicrobial activity ($\geq 250 \mu\text{g/mL}$ for plant extracts and $\geq 50 \mu\text{g/mL}$ for pure compounds), and without proper identification of culture collections/strain designation codes;
- viii. experimental work on essential oils with only one sample of a single plant specimen with a single chromatographic analysis and without proper statistical analysis; without oil yield (%) and characterization and components quantification not performed using GC-MS-FID and the analysis of the retention indexes of the components not calculated using *n*-alkane homologous series together with analysis some of the isolated natural components. Biological activity results without chemical characterization of the compounds.
- ix. Too preliminary data using *in-vitro* assays will not be acceptable, when i) no information on the type of activity is given; ii) single dose or very high concentrations (must show dose-response studies); iii) repetition of a simple bioassay (usually one assay with replicates); iv) lack of proper controls (solvents; positive or negative substances according to the study); v) no IC₅₀ values whenever it is the case.
- x. manuscripts with repetition of a single bioassay for yet another extract or plant;
- xi. use solely the brine shrimp assay (*Artemia salina*) to access toxicity of extracts;
- xii. isolation and bioassay of well known compounds with tiny or no relation to the activity or to the plant medicinal use without clear justification;
- xiii. manuscripts reporting pharmacological or biological activities of crude extracts without chemical and technical standardization.

2. Rules for the elaboration of contributions

2.1 The author(s) should retain a copy (electronic and paper) of the submitted manuscript, in the event the loss or damage to the original sent to the journal.

2.2 The figures (photographs, charts, drawings *etc*) and tables should be inserted close to the point at which they are discussed and numbered consecutively in Arabic numbers. The respective captions should be clear, concise, with no abbreviations, and located underneath the figures. Their respective position in the text should be indicated preferentially just after their citation in the body of the manuscript. *When figures are from another font, a formal authorization is required.*

2.3 Tables should be presented after the References and numbered consecutively using Arabic numbers. Tables (numeric data) should not be closed by side lines. The respective captions must be clear, concise, with no abbreviations, and located above table. There should be an indication of the approximate position in the text where tables should be placed, preferentially, just after their citation in the body of the manuscript.

2.4 The captions of botanical illustrations (anatomical description abbreviations) should be in accordance with the rules adopted by the Journal. Please request standards by email to revista@sbfgnosia.org.br.

3. Text formatting and contents of the work

3.1 *Original papers*: Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the following order: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figures with Legends, Tables, Structural Formulas. Results and Discussion sections may appear as a combined “Results and Discussion” section. The normal length of the main text of an Original Paper, excluding references, tables, figures and figure legends, is about 3,000 words. In exceptional and well justified cases longer manuscripts may be accepted. When submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement in the cover letter, giving compelling reasons for the length of the paper.

3.2 *Short communications*: This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical fonts, or complementary results of an ongoing work. The text should be arranged as follows: Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Material and Methods with brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without headlines, Acknowledgements, References up to 20 citations, Figures and/or Tables up to 3. Authors should limit the text and not exceed 2,000 words.

3.3 *Reviews* will generally be invited by the Editor-in-Chief, and will only be considered those with more than one hundred references. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter, and inform the reader critically of the latest developments in the field. They should be as concise as possible and not include experimental details.

3.4. In addition to these Guidelines, a template (for original papers) and a sample cover letter are available at www.sbfgnosia.org.br/revista. Authors are strongly recommended to follow these formats when preparing a manuscript.

3.5 The originals should be on A4 size paper, double spaced using Times New Roman size 12 font, fully justified, with margins of 2 cm.

3.6 *Title and subtitle*: They should be in lower case, using Times New Roman size 14 font, and in accordance with the contents of the article, taking in consideration the scope and objectives of the Journal.

3.7 *Authors*: The authors' names should appear centered underneath the title. The first and last names should appear in full, followed by the initials of all other names (*e.g.* Carlos N. U. Silva). In the case of several authors, the names should be separated by commas.

3.8 *Authors' affiliation*: After each author name there should be superscript Arabic numbers indicating the institution to which they are affiliated. The list of institutions should appear immediately below the list of authors. The name of the corresponding author should be identified with a superscript asterisk indicating the address to which all correspondence should be sent. The electronic institutional address, telephone, and fax number of the main author should appear after references. The Journal will not publish commercial e-mail address.

3.9 *Abstract*: A brief and concise abstract with 200 or less words highlighting the most important information, including the methodology, results, and conclusions that allow readers to evaluate their interest in the article and thus avoiding the reading of the full work.

3.10 *Keywords*: Very important for data base searches, thus validating the article, the authors should identify a maximum of six Keywords, in alphabetical order and separated by commas, to represent the content of the article.

3.11 *Introduction*: The Introduction should clearly establish the objectives of the work and its relationship with other works in the same field. Extensive literature reviews should be replaced by references of more recent publications, where these reviews have been published, and are available.

3.12 *Materials and methods*: The description of the Material and the Methods used should be brief, and clear enough to make possible the comprehension and the reproducibility of the work. Processes and techniques already published, unless extensively modified, should be referenced. Plant names should be complete, including author name and family, according to <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>; www.theplantlist.org/ or www.tropicos.org.

3.13 *Results*: The Results should be presented with a minimum personal discussion or interpretation, and whenever possible, be accompanied by adequate tables and figures. The data, when pertinent, should be submitted to statistical analysis.

3.14 *Discussion*: The Discussion must be restricted to the significance of the data presented, avoiding conclusions not based on them. Alternatively, at the discretion of the author, the Results and Discussion could be presented in one section.

3.15 *Acknowledgements*: This is an optional item. Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to the article.

3.16 *Authors' contributions*: The role of each author for the development of the study and/or the elaboration of the manuscript must be clearly described, referred to by their initials. Please see template for example.

4. References

The formatting of the references should be standardized to conform to the requirements of the journal as outlined. *Preferentially use references that can be accessed by the readers worldwide.*

4.1 References inside the text: at the beginning of the citation: Author in lower case, followed by the publication year between parenthesis, e.g. Pereira (1999); at the end of the citation:

Author in lower case and year, both between parenthesis. *e.g.* (Silva, 1999) or (Silva and Souza, 1998) or (Silva et al., 1999) or (Silva et al., 1995a,b); textual citation: the page must be provided, *e.g.* (Silva, 1999, p. 24).

4.2 The references should be presented in alphabetical order by the last name of the first author, in lower case in ascending order of the publication date. Take into consideration the following possibilities:

4.2.1 Article from a periodical: Title of the periodical in italics abbreviated conform *Chemical Abstracts Service Source Index* (<http://www.cas.org/sent.html> or <http://library.caltech.edu/reference/abbreviations/>). In the case of an authorized abbreviation of a certain periodical can not be located and it is not obvious, the title should be cited complete (*e.g.*): Kumar, D., Bhujbal, S.S., Deoda, R.S., Mudgade, S.C., 2010. *In-vitro* and *in-vivo* antiasthmatic studies of *Ailanthus excelsa* Roxb. on guinea pigs. *J. Sci. Res.* 2, 196-202

In case the cited journal can not be easily accessible, it is recommended to present its *Chemical Abstract Number*, as follows:

Qu, W., Li, J., Wang, M., 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22, 203-206, apud *Chemical Abstracts* 116, 124855r.

In a citation the sources should be shown in italics:

Wax, E.T., 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J. Braz. Biol. Res.* 41, 77-82, apud *Nat. Prod. Abs.* 23, 588-593, 1978.

4.2.2 Book:

Costa, A.F., 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Book chapter:

ElSohly, M.A., Stanford, D.S., Murphy, T.P., 2007. Compounds properties and drug quality. In ElSohly, M.A. (org.) *Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids*. New Jersey: Humana Press, p. 51-66.

4.2.4 Thesis or dissertation materials:

Singab, A.N.B.I., 1996. *Phytochemical studies of some potential bioactive Egyptian plants*. Tokyo, 173 p. PhD Thesis, Meiji College of Pharmacy. Romero, M.A.V., 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Scientific meetings:

Oliveira, R.M.M.W., Lolli, L.F., Santos, C.A.M., 2006. Possible involvement of GABAA-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. *19th ECNP Congress*. Paris, France.

4.2.6 Patents:

Should be identified as indicated below; whenever possible the *Chemical Abstracts Service* number should be informed. Ichikawa, M., Ogura, M., Lijima, T., 1986. Antiallergic flavones glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 61,118,396, apud Chemical Abstracts 105, 178423q.

4.2.7 Internet pages:

Taylor, L., 2000. *Plant based drugs and medicines*. <http://www.raintree.com/plantdrugs.htm>, accessed Oct 2009.

5. Abbreviations

Units will be in accordance with the International System (SI) as adopted by the 11th General Conference on Weights and Measures. Common abbreviations to be used are m meter; cm centimeter; mm millimeter; μm micrometer; nm nanometer; kg kilogram; g gram; mg milligram; μg microgram; ng nanogram; ml milliliter; μl microliter; s seconds; min minutes; h hours; N normal; M molar; mM millimolar; μM micromolar; SD standard deviation; SE standard error; \bar{X} mean; Ci Curie; mp melting point; bp boiling point; TLC thin-layer chromatography; GC gas chromatography; NMR nuclear magnetic resonance; MS mass spectrometry; UV ultraviolet; CD circular dichroism; and IR infrared; g instead rpm; ppm parts per million; cpm counts per minute; dpm disintegrations per minute; Hz hertz; LD₅₀ medial lethal dose; LC₅₀ medial lethal concentration; TLV threshold limit value. When using a word that is asserted to be a proprietary term or trade mark, authors must use the symbol ®.

6. Illustration

6.1 The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the journal production staff. The graphics must be submitted as part of the manuscript file. Contrast is important.

6.2 Remove all color from graphics, except for those graphics that author(s) would consider for publication in color (see Costs section for details).

6.3 Chemical structures should be drawn according to the ACS (American Chemical Society) style. Structure drawing preferences can be found as preset style in appropriate softwares.

6.4 Upload each figure in either .tiff .jpg or .eps format, the figure number and the top of the figure indicated. Lettering must be with Arial font of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please, include this in the figure legend.

6.5 The journal uses recycled paper, so colour pictures are accepted and will be available only online unless the author(s) agree to cover the extra expenses for the print publication irrespective of the number of pages of the article.

7. Submission of manuscripts

7.1 Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to the authors.

7.2 Manuscript submissions will be processed exclusively online at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rbfar-scielo>. Please follow carefully the guidelines for authors. Submissions by *e*-mail will not be accepted.

7.3 Important: All authors, with their respective *e*-mail addresses, should be entered into the system.

7.4 The qualification of the manuscript will be certified by at least two referees indicated by the Editorial Board.

8. Processing fee

8.1. The journal charges nominal publication fee for articles upon acceptance to cover production cost.

8.2 The charge is US\$ 200.00/paper when the corresponding author is a member of the Brazilian Society of Pharmacognosy and US\$ 300.00/paper for nonmembers. Articles with high scientific relevance will have reduced fee.

8.3 A limited number of waivers for article-processing charges are also available at the editors' discretion, and authors wishing to apply for these waivers should contact the editors.

8.4 Editors and reviewers have no access to whether authors are able to pay; decisions to publish are only based on editorial criteria.

9. Proofs and reprints

9.1. Galley proofs will be sent to all authors as a PDF file. Rephrasing of sentences, or additions, is not permitted at the page proof stage. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within five days of receipt in order to ensure timely publication of the manuscript.

9.2 The journal does not provide reprints to corresponding authors.

9.3 Before publication, the articles will be available ahead of print on the Scielo Portal.

For further information, please contact:

Revista Brasileira de Farmacognosia

Prof. Cid Aimbiré M. Santos – Editor

Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia – UFPR

Rua Prof. Lothario Meissner, 632 - Jd Botânico, 80210-170, Curitiba-PR, Brasil

revista@sbfgnosia.org.br