

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 12/04/2021.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
UNESP**

KAMILLE DALECK SPERA

**CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
MICROENCAPSULAÇÃO DE *Annona crassiflora* Mart. E *Annona cacans* Warm.**

**ARARAQUARA
2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
UNESP**

KAMILLE DALECK SPERA

**CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
MICROENCAPSULAÇÃO DE *Annona crassiflora* Mart. E *Annona cacans* Warm.**

Tese apresentada como requisito à obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista – UNESP – campus Araraquara.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Regildo M.G. da Silva

**ARARAQUARA
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

S749c Spera, Kamille Daleck
Caracterização, avaliação do potencial antioxidante e
microencapsulação de *Annona crassiflora* Mart. e *Annona
cacans* Warm. / Kamille Daleck Spera. –
Araraquara : [s.n.], 2019
91 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Regildo Márcio Gonçalves da Silva

1. Anonaceae. 2. Radicais livres (Química). 3. Secagem
em spray. 4. Fitoterapia. 5. Moléculas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Caracterização, avaliação do potencial antioxidante e microencapsulação de *Annona crassiflora* e *Annona cacans*"

AUTORA: KAMILLE DALECK SPERA

ORIENTADOR: REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis

Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ANNE LIGIA DOKKEDAL BOSQUEIRO
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru

Prof. Dr. MONICA ROSA BERTÃO
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis

VIDEO CONFERÊNCIA

Prof. Dr. PATRIZIA PEREGO
Università degli studi di Genova / UNIGE - Genova - Itália

Araraquara, 12 de abril de 2019



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Caracterização, avaliação do potencial antioxidante e microencapsulação de *Annona crassiflora* e *Annona cacans*"

AUTORA: KAMILLE DALECK SPERA

ORIENTADOR: REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis

Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ANNE LIGIA DORRÉDAL BOSQUEDRO
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru

Prof. Dr. MONICA ROSA BERTÃO
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis


Prof. Dr. PATRIZIA FEREGO
Università degli studi di Genova / UNIGE - Genova - Itália

Araraquara, 12 de abril de 2019

Dedico a todos e a tudo que eu penso quando tento significar a palavra gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À minha família, Julio, Katia e Allain, por serem sempre o meu motivo, e a minha força quando ela parece acabar.

Ao profº Drº Regildo Marcio Gonçalves da Silva, pela orientação e a confiança.

A UNESP/Assis em nome do Fitolab, por sediar as nossas pesquisas.

Aos companheiros do Fitolab, pela troca de experiências diárias de vida e conhecimento, em especial ao Anderson e ao Filipe pelo auxílio na realização do projeto.

Aos amigos de doutorado Pamela e Pedro que tiveram papel fundamental no desenvolvimento do meu trabalho de doutorado e também da vida.

Ao Conselho e a Secretaria de Pós-graduação em Biotecnologia pela liberação para o período de doutorado sanduíche, e o auxílio sempre que necessário.

Ao João Luiz Bronzel Jr. e ao Nubbe do Instituto de Química da UNESP/Araraquara pelas análises com os espectrômetros e por estar sempre disponível para nos ajudar no que fosse preciso.

Ao Leonardo Saldanha da UNESP/Bauru pelas análises com HPLC.

À Drª Ana Lucia Tasca Gois Ruiz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unicamp pelas análises de citotoxicidade, e ao Rafael Rosolen pelo auxílio com os resultados.

Ao pessoal do Horto Florestal de Assis em nome da Drª Elaine Akiko Honda, pelas portas sempre abertas e para o auxílio na coleta das plantas, em especial ao Adriano e ao Joãozinho.

Ao pessoal da fazenda de Platina/SP, pelo fornecimento dos frutos de marolo.

À Profª Drª Patrizia Perego por ter aberto as portas da Università degli studi de Genova, e me proporcionado viver essa experiência única, e ao técnico Drº Alberto Casazza, pela paciência e por ter me ajudado sempre.

A todo o pessoal do laboratório da UNIGE que esteve comigo em Genova, em especial a Caroline, a Elena e ao Piffa, por estarem presentes em momentos que serão inesquecíveis. E ao Profº Drº Attilio Converti por ter me acolhido e tornado tudo mais fácil.

Aos meus amigos da vida, que se eu for nomear vão faltar páginas, estou com todos no pensamento.

A CAPES pelo financiamento da pesquisa.

“... – Eu só queria saber que caminho tomar.
– Isso depende do lugar onde quer ir.
– Oh realmente não importa desde que eu...
– Então não importa que caminho tomar,”
(Lewis Carroll, *Alice no país das maravilhas*, 1865)

SPERA, K.D. Caracterização, avaliação do potencial antioxidante e microencapsulação de *Annona crassiflora* Mart. E *Annona cacans* Warm. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Química, Araraquara/SP.

RESUMO GERAL

Os compostos de origem vegetal e fitoterápicos tem seu uso cada vez mais difundido na indústria na busca de fontes que tenham atividade biológica para auxílio do tratamento e/ou prevenção de doenças. Esse aumento traz consigo a busca por alternativas que visem preservar as características de extratos vegetais, como a encapsulação em micropartículas. As acetogeninas são compostos orgânicos derivados de ácidos graxos de cadeia longa que apresentam ampla variedade de propriedades biológicas, tais como atividades citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana, além disso existe um interesse crescente neste composto devido ao seu potencial para inibir células resistentes a alguns fármacos. *Annona crassiflora* e *Annona cacans* são espécies da família Annonaceae que foram pouco estudadas, sendo, portanto, alvo de interesse na busca de compostos com potencial terapêutico. O presente trabalho obteve a caracterização dos compostos, o perfil antioxidante através de diferentes métodos e a avaliação do potencial antiproliferativo de extratos da folha e polpa das duas espécies. Foi realizado também um design experimental para a microencapsulação com maltodextrina em Spray Dryer com os extratos das folhas de *A. crassiflora* e *A. cacans*. Foram identificados diversos compostos nas espécies, com maior incidência de açúcares e compostos fenólicos. Todos os extratos apresentaram antioxidante significativa para os diferentes métodos, dando destaque para *A. crassiflora*, que precisou de uma menor concentração do extrato para obter atividade. Foram identificados possíveis picos do composto acetogeninas nas folhas de *A. cacans*. Os extratos de polpa e folha de ambas as espécies apresentaram potencial quanto a avaliação da atividade antiproliferativa. O desenvolvimento do método de microencapsulação foi efetivo, mantendo a composição dos extratos brutos quando encapsulado.

Palavras-chave: Annonaceae, radicais livres, acetogeninas, DPPH, maltodextrina

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Produção de radicais livres no organismo.....	15
FIGURA 2 Antioxidantes endógenos e exógenos produzidos pelo organismo e obtidos na alimentação.....	17
FIGURA 3 <i>Annona crassiflora</i> (A) <i>Annona cacans</i> (B) e suas ocorrências no Brasil.....	20
FIGURA 4 Mapa de espécies com ocorrência no Brasil ameaçadas de extinção (CNCFLora, 2012).....	21
CAPÍTULO 1	
FIGURA 1.1 Perfil cromatográfico do extrato de acetato de etila da folha de <i>A. crassiflora</i> obtida por HPLC (A) Perfil cromatográfico obtido com $\lambda=360$ nm (B) Perfil cromatográfico com $\lambda=245$ nm (C) Perfil cromatográfico com $\lambda= 210$ nm. Sistema de eluição: ACN (A) e H ₂ O (B) acidificados (0,1 % Ác. Fórmico). Gradiente exploratório: 5-100 % de A em B em 60 min. Coluna Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm i.d. 5 μ m), fluxo 1,0 mL Volume de injeção: 20 μ L. Forno coluna: 40 °C.....	32
FIGURA 1.2 Espectros de banda de absorção máxima UV identificados para flavonoides na folha de <i>A. crassiflora</i>	33
FIGURA 1.3 Perfil cromatográfico do extrato de acetato de etila da polpa de <i>A. crassiflora</i> obtida por HPLC (A) Perfil cromatográfico obtido com $\lambda=360$ nm (B) Perfil cromatográfico com $\lambda=245$ nm (C) Perfil cromatográfico com $\lambda= 210$ nm. Sistema de eluição: ACN (A) e H ₂ O (B) acidificados (0,1 % Ác. Fórmico). Gradiente exploratório: 5-100 % de A em B em 60 min. Coluna Phenomenex C18 (250x4,6 mm i.d. 5 μ m), fluxo 1,0 mL Volume de injeção: 20 μ L. Forno coluna: 40 °C.....	34
FIGURA 1.4 Espectros de banda de absorção máxima UV identificados para flavonoides na polpa de <i>A. crassiflora</i>	34
FIGURA 1.5 Perfil cromatográfico do extrato de acetato de etila da folha de <i>A. cacans</i> obtida por HPLC (A) Perfil cromatográfico obtido com $\lambda=360$ nm (B) Perfil cromatográfico com $\lambda=245$ nm (C) Perfil cromatográfico com $\lambda= 210$ nm. Sistema de eluição: ACN (A) e H ₂ O (B) acidificados (0,1% Ác. Fórmico). Gradiente exploratório: 5-100 % de A em B em 60 min. Coluna Phenomenex C18 (250x4,6 mm i.d. 5 μ m), fluxo 1,0 mL Volume de injeção: 20 μ L. Forno coluna: 40 °C.....	35
FIGURA 1.6 Espectros de banda de absorção máxima UV identificados para flavonoides na folha de <i>A. cacans</i>	36
FIGURA 1.7 Perfil cromatográfico do extrato de acetato de etila da polpa de <i>A. cacans</i> obtida por HPLC (A) Perfil cromatográfico obtido com $\lambda=360$ nm (B) Perfil cromatográfico com $\lambda=245$ nm (C) Perfil cromatográfico com $\lambda= 210$ nm. Sistema de eluição: ACN (A) e H ₂ O (B) acidificados (0,1 % Ác. Fórmico). Gradiente exploratório: 5-100 % de A em B em 60 min. Coluna Phenomenex C18 (250x4,6 mm i.d. 5 μ m), fluxo 1,0mL Volume de injeção: 20 μ L. Forno coluna: 40 °C.....	37

FIGURA 1.8 Espectros de banda de absorção máxima UV identificados para flavonoides na polpa de *A. cacans*.....37

FIGURA 1.9 Componentes principais (PCA) da folha e polpa de *Annona crassiflora* (A) e *Annona cacans* (B) de acordo com a classe dos compostos.....39

FIGURA 1.10 Atividade antioxidante pelo método de hemólise do extrato da folha (A) e polpa (B) de *A. crassiflora* durante 6 h de incubação e mensurada a 540 nm em espectrofotômetro.....42

FIGURA 1.11 Atividade antioxidante pelo método de hemólise do extrato da folha (A) e polpa (B) de *A. cacans* durante 6 h de incubação e mensurada a 540 nm em espectrofotômetro.....43

CAPÍTULO 2

FIGURA 2.1 – Cromatograma do extrato bruto das folhas (negativo) e polpa (positivo) de *A. crassiflora* por MS.....63

FIGURA 2.2 – Cromatograma do extrato bruto em 10 ppm das folhas e polpa de *A. cacans* por Ms (Modo positivo).....64

FIGURA 2.3 – Fragmentação do íon aduto 597 [M+H]⁺ identificado nas folhas de *A. cacans* 10 ppm HPLC/Ms (Modo positivo).....65

FIGURA 2.4 – Fragmentação do íon aduto 613 [M+H]⁺ identificado nas folhas de *A. cacans* 10 ppm HPLC/Ms (Modo positivo).....65

FIGURA 2.5 – Fragmentação do íon aduto 623 [M+H]⁺ identificado nas folhas de *A. cacans* 10 ppm HPLC/Ms (Modo positivo).....66

FIGURA 2.6 – Fragmentação do íon aduto 629 [M+H]⁺ identificado nas folhas de *A. cacans* 10 ppm HPLC/Ms (Modo positivo).....66

FIGURA 2.7 – Fragmentação do íon aduto 639 [M+H]⁺ identificado nas folhas de *A. cacans* 10 ppm HPLC/Ms (Modo positivo).....66

FIGURA 2.8 *Fullscan* do extrato bruto em 10 ppm das folhas de *A. cacans* em modo positivo por MS de alta resolução.....67

FIGURA 2.9 – Taxa de crescimento celular com doxorrubicina em linhagens celulares tumorais e em queratinócitos. Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-O (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-03 (ovário); HT-29 (côlon). Linhagem não tumoral humana: HaCaT (queratinócito).....68

FIGURA 2.10 Taxa de crescimento celular com extrato da polpa e folha de *A. crassiflora* em linhagens celulares tumorais e em queratinócitos. Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-O (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-03 (ovário); HT-29 (côlon). Linhagem não tumoral humana: HaCaT (queratinócito).....69

FIGURA 2.11 Taxa de crescimento celular com extrato da polpa folha de *A. cacans* em linhagens celulares tumorais e em queratinócitos. Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-O (rím); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-03 (ovário); HT-29 (cólon). Linhagem não tumoral humana: HaCaT (queratinócito).....70

CAPÍTULO 3

FIGURA 3.1 Quantificação de fenóis totais pelo método de *Follin ciocateau* dos extratos em diferentes condições de extração.....78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1.1 Teor de Fenois e Flavonoides totais dos extratos da polpa e folha de *A. crassiflora* e *A. cacans*..... 31

TABELA 1.2 Resultados de açúcares solúveis totais das folhas de *A. crassiflora* e *A. cacans*.....38

TABELA 1.3 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH (%) e EC50, FRAP, TBARS e NO dos extratos da polpa e folha de *A. crassiflora* e *A. cacans*.....41

CAPÍTULO 2

TABELA 2.1 Identificação dos picos de acetogeninas nos extratos da folha de *A. crassiflora* e *A. cacans*64

TABELA 2.2 Atividade antiproliferativa dos extratos de *A. crassiflora* e *A. cacans* e do fármaco antineoplásico Doxorrubicina frente a linhagens tumorais71

CAPÍTULO 3

TABELA 3.1 Atividade antioxidante dos extratos das folhas de *A. crassiflora* e *A. cacans* pelo método DPPH em diferentes concentrações.....79

TABELA 3.2 Atividade antioxidante dos extratos de folha de *A. crassiflora* e *A. cacans* pelo método ABTS em diferentes concentrações.....79

TABELA 3.3 Condições de processo obtidas por Box-Behnken e rendimento de processo do pó obtidos para os extratos de folha de *A. crassiflora* e *A. cacans*80

TABELA 3.4 Índice de solubilidade em água (IA) e índice de absorção de água (IA) e atividade de água (AA) nas microcápsulas de extratos de *A. crassiflora* e *A. cacans*.....81

TABELA 3.5 Quantificação de Polifenóis totais, superficiais e microencapsulados nas microcápsulas de extratos de *A. crassiflora* e *A. cacans*.....81

TABELA 3.6 Atividade antioxidante pelo método ABTS das microcápsulas de extratos de *A. crassiflora* e *A. cacans* nas condições definidas pelo modelo experimental.....82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 LEVANTAMENTO TEORICO.....	15
3 OBJETIVOS	
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
 <i>CAPÍTULO 1</i>	
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Annona crassiflora</i> Mart. E <i>Annona cacans</i> Warm.	
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4 CONCLUSÃO.....	44
 <i>CAPÍTULO 2</i>	
IDENTIFICAÇÃO DE ACETOGENINAS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE <i>Annona crassiflora</i> Mart. E <i>Annona cacans</i> Warm..	
1 INTRODUÇÃO.....	58
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4 CONCLUSÃO.....	71
 <i>CAPÍTULO 3</i>	
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS <i>Annona crassiflora</i> Mart. E <i>Annona cacans</i> Warm.	
1 INTRODUÇÃO.....	75
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4 CONCLUSÃO.....	82
 CONCLUSÃO GERAL.....	 85
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO GERAL

A microencapsulação é um processo utilizado para recobrir pequenas partículas de sólidos, gotículas de líquido ou materiais gasosos (Menezes et al., 2013). As microcápsulas são constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero de espessura variável (FIB, 2013). A técnica de microencapsulação permitiu o desenvolvimento de fórmulas com liberação controlada de compostos ativos em locais e meios onde devem agir ou onde serão absorvidos (Santos et al., 2000; Ré, 2000).

O princípio ativo protegido é liberado gradativamente por meio de estímulos adequados, como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução, entre outros (Gibbs *et al.*, 1999). Substâncias com atividade medicamentosa, por exemplo, tem seu efeito prolongado no organismo, assim como produtos alimentícios funcionais podem ser otimizados pelo mecanismo de liberação mais eficiente, sendo assim os produtos de microencapsulação têm aplicação direta tanto na indústria farmacêutica quanto na alimentícia e cosmética (Ré, 2000).

Compostos funcionais passaram a ter maior atenção devido a suas propriedades preventivas a doenças. Entre eles, destaca-se os antioxidantes, que protegem o organismo contra o estresse oxidativo (Oroian e Escriche, 2015). A oxidação é um processo metabólico que resulta na produção de energia para as atividades celulares (Roesler et al., 2007). O metabolismo do oxigênio nas células vivas desencadeia a produção de radicais livres (Oroian e Escriche, 2015), a qual, se não for controlada, pode causar danos ao organismo (Roesler et al., 2007). Em sistemas biológicos existe um equilíbrio entre os fatores que promovem a oxidação e os mecanismos de defesa antioxidantes (Carocho et al., 2018), porém, é o acúmulo desses radicais que leva ao estresse e ao desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas e Alzheimer (Ferreira e Abreu, 2007).

Os antioxidantes são compostos capazes de agir contra os danos da oxidação (Niki, 2010). Entre seus mecanismos de ação estão: suprimir a formação de radicais por inibição enzimática ou por quelar elementos envolvidos na sua produção; eliminar espécies reativas de oxigênio, manter o mecanismo de defesa antioxidante regulado e protegido (Andallu et al., 2014).

Extratos vegetais têm sido considerados em diferentes estudos por apresentar flavonoides com capacidade de sequestrar radicais livres, doadores de hidrogênio, e quelante de metais (Pietta, 2000; Gonzalo e Alonso, 2002; Zaid et al., 2009). Outros compostos naturais que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, tocoferóis, fosfolipídios e esteróis (Roesler, 2007).

Entre as famílias botânicas, de interesse como produtoras de compostos ativos, destaca-se a Annonaceae e o gênero *Annona*. Annonaceae é uma família pantropical de árvores, arbustos e lianas, ocorrentes principalmente em ecossistemas de floresta tropical (Couvreux et al., 2012). Até o momento são descritos e reconhecidos cerca de 130 gêneros e mais de 2000 espécies (Joly, 1979; Lorenzi e Matos, 2002), sendo o gênero *Annona* um dos mais representativos (Nunes et al., 2012). No Brasil ocorrem 29 gêneros (sendo um endêmico) e cerca de 386 espécies (Maas et al., 2015).

Economicamente, a família tem importância considerável como fonte de frutos comestíveis (Lebouef et al., 1982) sendo as espécies mais exploradas *Annona muricata* L. (graviola), *Annona squamosa* Delile (fruta-do-conde) e *Annona crassiflora* Mart. (marolo) (Telles et al., 2003), devido às propriedades nutricionais dos frutos consumidos *in natura*, e ao fato de apresentarem como particularidade, sabor adocicado e perfume característico (Lorenzi e Matos, 2002; Takahashi, 2008). Existem espécies dessa família, como por exemplo, a espécie nativa do cerrado *Annona cacans* Warm., (Lorenzi e Matos, 2002) que apesar de não consideradas com importância econômica relevante, são conhecidas em comunidades locais.

O Marolo (*Annona crassiflora*) apresenta grande apelo sensorial, tais como cor, aroma e sabor, além de ser muito eficiente nutricionalmente, apresentando altos níveis de vitaminas, ácido ascórbico e carotenoides (Corrêa et al., 2011). Apesar destas características, o marolo fresco na fase maduro é pouco consumido, mas apresenta características físico-químicas adequadas para a utilização como ingrediente alimentar (Lage et al., 2014).

Além de ser conhecido pela riqueza em compostos antioxidantes, marolo fornece fibras alimentares, o que torna este fruto benéfico para a saúde (Corrêa et al., 2011). Na alimentação humana, o fruto do araticum-cagão (*A. cacans*) não é muito apreciado *in natura*, pois apesar de ter polpa abundante e doce, apresenta efeito diarreico (Mattos, 1978; Saito e Alvarenga, 1994). Os frutos são saborosos, porém sua ação é tão grande que essa propriedade específica lhe ficou consagrada até na denominação popular como na botânica (Kulhmann e Kuhn, 1947).

Na formação da biodiversidade de substâncias químicas das Annonaceae foram catalogados cerca de 320 produtos naturais secundários provenientes de 150 espécies pertencentes a 41 gêneros, como substâncias aromáticas, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, catequinas, proantocianidinas, óleos essenciais, terpenos, esteroides, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, carotenos, saponinas, entre outros (Lebouef et al., 1982; Carochi et al., 2018). Flavonoides encontrados no gênero *Annona* foram flavonas (luteonina) e flavonóis (canferol, quercetina, ramnetina e rutina) (Arruda, 2018).

Algumas Annonaceae são amplamente cultivadas e utilizadas como inseticidas e parasiticidas (Chen et al., 2004), e comprovadas atividades anti-helmíntica, antimalárica, antimicrobiana, antiprotozoária, pesticida e antioxidantes (Alali et al., 1999; Julián-Loeza et al., 2010). Estudos farmacológicos em espécies de Annonaceae se intensificaram, em grande parte, devido à descoberta das acetogeninas, compostos orgânicos derivados de ácidos graxos de cadeia longa, e que tem grande variedade de atividades biológicas (Rupprecht et al., 1990).

Diversos estudos apontam o alvo de ação das acetogeninas como sendo a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons no complexo I da cadeia respiratória e ação específica na enzima NADH-ubiquinona-oxidoreductase (Rupprecht et al., 1990). As acetogeninas inibem a NADH-oxidase ligada a ubiquinona, presente nas membranas de células tumorais (Alali et al., 1999). Tem demonstrado citotoxicidade seletiva em células cancerosas (Wu, 2006), atividade parasiticida (Wang et al., 2002), inseticida, antitumoral e imunossupressora, antimalárica e antiprotozoária (Alali et al., 1999; Nova, 2008), e antimicrobiana (Yang et al., 2010).

Os processos micro/nanotecnológicos vêm sendo aplicados, principalmente, na indústria farmacêutica e cosmética pois torna eficiente a veiculação de moléculas bioativas no organismo, bem como facilita a penetração desses compostos nas camadas mais profundas da pele, potencializando o efeito dos produtos (Schmaltz et al., 2005).

Existem muitas razões para encapsular compostos bioativos, sendo que, de modo geral, este processo resulta em sua maior proteção, melhora a especificidade do produto final, e otimiza a ação dos mesmos em sítios alvo (Suave et al., 2006). A microencapsulação de acetogeninas, por exemplo, pode prolongar a estabilidade do composto e, conseqüentemente, permitindo que seu valor medicinal e/ou nutricional não seja significativamente diminuído.

Diante da variedade de atuação das acetogeninas, e a possibilidade de encontrar compostos de interesse nas Annonaceae, se justificam a implantação, o objetivo e o desenvolvimento deste projeto e a importância da investigação das espécies *Annona crassiflora* e *Annona cacans* para conhecer a biodiversidade de sua composição, e assim serem possíveis fontes de bioativos, assim como o processo de microencapsulação do mesmo, permitindo forma otimizar as atividades biológicas das espécies para aplicação na indústria alimentícia, de medicamentos e cosméticos.

2 LEVANTAMENTO TEÓRICO

2.1 Radicais livres

Radicaís livres são moléculas instáveis de qualquer espécie química contendo elétrons não pareados, e que tendem a capturar elétrons de moléculas biológicas estáveis, como lipídios, DNA, proteínas, para se neutralizar (Betteridge, 2000). Os radicaís livres mais conhecidos são, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Carocho et al., 2018), as quais podem ser, ânion superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO), o radical hidroxila (OH^\cdot), metais como ferro e cobre, entre outros (Betteridge, 2000).

Existem processos naturais no organismo que levam a produção de radicaís livres (Figura 1). Os derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies radicaís geradas em sistemas vivos (Miller et al., 1990), e a principal fonte de acúmulo das ROS são as mitocôndrias, onde durante a transdução de energia, ocorre a oxidação, e com ela se dá a formação do produto final superóxido (Valko et al., 2007).

(Fonte: King, 2007)

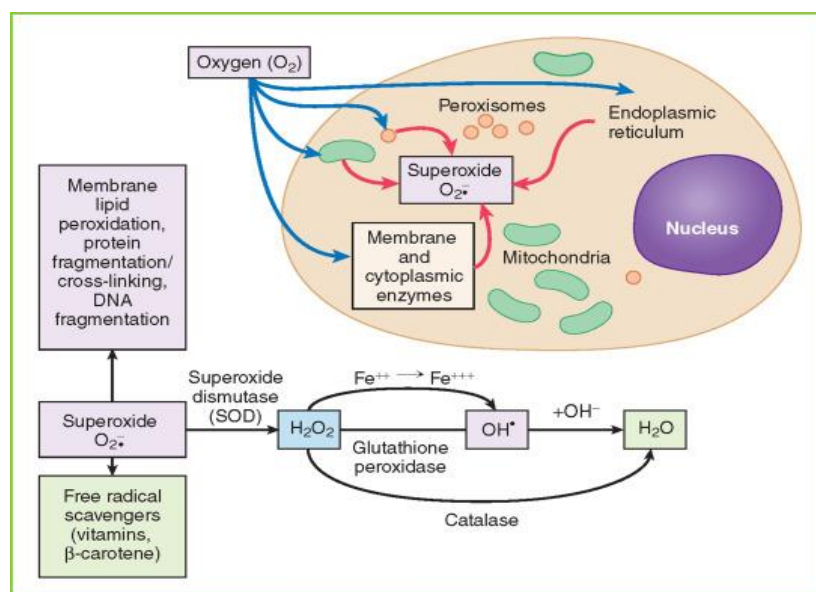


FIGURA 1. Produção de radicaís livres no organismo

O radical fisiológico óxido nítrico (NO) é produzido pelo endotélio vascular como um fator de relaxamento (Moncada e Higgs, 1993). O óxido nítrico (NO) atua como molécula sinalizadora oxidativa em vários processos fisiológicos, como neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa, relaxamento da musculatura lisa e regulação imunológica, porém seu excesso pode ser tóxico (Bergendi et al., 1999).

Uma via de formação de radicais livres é quando o radical superóxido reage com íons de ferro e cobre e geram radicais hidroxila, ou então, se combina com o óxido nítrico e obtém peroxinitrito (Anderson, 1996). Esse produto final, quando em decomposição, gera produtos tóxicos, incluindo gás dióxido de nitrogênio, radical hidroxila e íon nitronium, e tem propriedades que podem causar a fragmentação do DNA (Carr et al., 2000).

O ataque de radicais nas membranas ou lipoproteínas inicia a peroxidação lipídica (Witzum, 1994). Durante a peroxidação lipídica, ocorrem reações em cadeia frequentes e que removem H de moléculas, nesse processo, ocorre a liberação do radical hidrogênio (H^+), considerado o radical livre mais simples, pois é formado apenas por um próton e um elétron (Anderson, 1996) e a formação de AGES, os produtos finais da reação entre carboidratos e grupo amino livre de proteínas (Valko et al., 2007).

Além de serem geradas no metabolismo celular, as ROSs podem ser produzidas em resposta a diferentes estímulos externos como radiação ionizante, poluição, agentes oxidantes e quimioterápicos (Halliwell, 1991; Halliwell e Gutteridge, 2007). A formação do radical hidroxila (OH^{\cdot}) pode ocorrer com a quebra da água por raios gama quando em exposição à radiação solar ou até mesmo uma radiação eletromagnética de baixo comprimento de onda (Anderson, 1996). Este mecanismo demonstra que os radicais livres além de serem produzidos pelo organismo, podem ter sua produção agravada por fatores externos.

2.2 Estresse oxidativo

Em sistemas biológicos existe um equilíbrio entre os fatores que promovem a oxidação e os mecanismos de defesa contra os radicais livres, os antioxidantes (Ferreira e Abreu, 2007). Se a produção de radicais livres supera a capacidade de ação dos antioxidantes, a oxidação de biomoléculas é facilitada e então, gerados seus produtos finais, que servem como marcadores do chamado estresse oxidativo (Barbosa et al., 2010). Esses produtos podem ser, entre outros, derivados de lipídeos, proteínas e DNA (Vincent et al., 2007).

O estresse oxidativo, portanto, é configurado como o desequilíbrio da relação radical livre/antioxidante, que pode contribuir para o surgimento ou a piora no desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas como Alzheimer, Parkinson, Diabetes, Esclerose, Hipertensão, entre outras (Carocho et al., 2018). Os danos no DNA causados pelos radicais livres tem como seu alvo de ação principal os processos de mutagênese e carcinogênese (Poulsen et al., 1998).

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo causado por ROS e RNS vindas do meio ambiente ou geradas pelo próprio organismo e a ação de espécies oxidantes sobre o DNA é responsável por mutação ou oncogênese e cabe às micromoléculas, tais como tocoferóis, carotenoides e flavonoides o papel de impedir ou regenerar os danos causados (Barreiros e David, 2006).

Muitas fontes vegetais frequentemente utilizadas com atividade antioxidante ainda não foram estudadas ou seus princípios ativos ainda não foram totalmente identificados (Pan et al., 2009). O mecanismo complexo de atividade anti e pró-oxidante destas substâncias ainda precisa ser avaliado para verificar como e onde serão utilizadas suas propriedades, bem como se existem mecanismos de sinergia entre os compostos presentes.

2.3 Antioxidantes e mecanismos de ação

Os antioxidantes equilibram os radicais livres no organismo. São moléculas que agem contra os danos dos radicais por diversos mecanismos de ação, seja por impedir sua formação pela inibição das reações; impedir o ataque a moléculas estáveis; reparar lesões causadas; remover os danos do DNA; reconstituir membranas celulares e/ou aumentar a síntese de enzimas antioxidantes (Bianchi e Antunes, 1999; Carocho et al., 2018). Um antioxidante considerado de boa atividade, possui doadores de elétrons ou de hidrogênio aos radicais em função de seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição e local de ação (Manach et al., 2004).

O organismo possui antioxidantes endógenos que atuam como primeira linha de defesa, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Barreiros e David, 2006). Muitas vezes as defesas antioxidantes do organismo não são suficientes, sendo necessários antioxidantes provenientes de fontes externas, os exógenos. São obtidos por meio da alimentação, por exemplo, α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), curcumina, β -caroteno, flavonoides, glutathione, e metais como zinco, cobre, selênio e magnésio, que otimizam a proteção contra os radicais livres (Shahidi e Ho, 2007) (Figura 2).

A busca por antioxidantes tem sido beneficiada pelo estudo de compostos de origem natural, principalmente os oriundos de vegetais, como os polifenóis, em particular, flavonoides, que tem sido considerado os de maior potencial antioxidante em diversos estudos (Niciforovic et al., 2010), sendo até mesmo mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade dos compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, com papel na absorção e neutralização de radicais livres (Degáspari e Waszczynskyj, 2004).

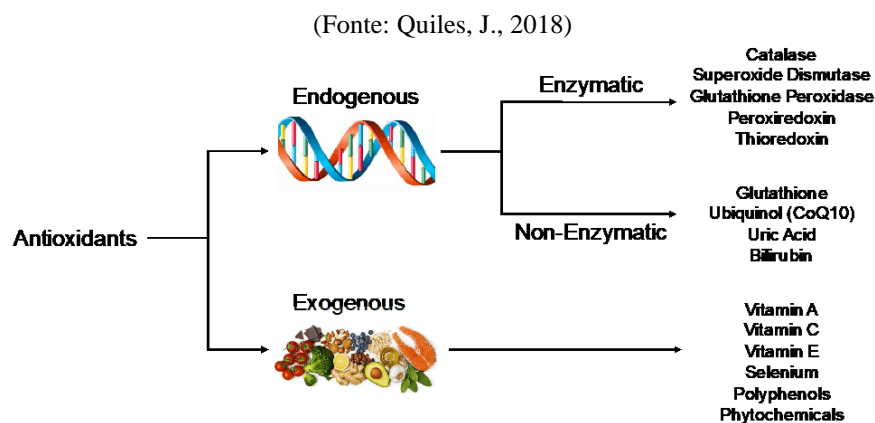


FIGURA 2. Antioxidantes endógenos e exógenos produzidos pelo organismo e obtidos na alimentação

Vegetais *in natura*, como frutos, legumes, folhosos em geral e condimentos, contêm numerosos fitoquímicos, destacando-se os compostos fenólicos, os compostos nitrogenados, os carotenoides, o ácido ascórbico e os tocoferóis (Pereira e Cardoso, 2012). Esses compostos apresentam significativa atividade antioxidante e estão associados à menor incidência e menor mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis, sobretudo o câncer, em seres humanos. Ressalta-se assim a importância da dieta balanceada na prevenção de diferentes doenças e do envelhecimento precoce (WCRF, 2007).

2.4 Família Annonaceae

Entre as famílias botânicas de interesse como fontes de compostos ativos destaca-se a Annonaceae, principalmente as espécies do gênero *Annona*. Esta família caracteriza-se por árvores, arbustos e lianas, ocorrentes principalmente em ecossistemas de floresta tropical (Couvreur et al., 2012).

São geralmente de hábito disperso e ocorrem em florestas perene de baixa altitude, na América tropical são arbóreos e crescem principalmente em planícies abertas (Hutchinson, J. 1964). Até o momento foram descritos e reconhecidos cerca de 130 gêneros e mais de 2000 espécies, sendo o gênero *Annona* um dos mais representativos (Leboeuf et al., 1982). No Brasil ocorrem 29 gêneros e cerca de 386 espécies (Maas et al., 2015).

Economicamente a família é de importância considerável, como fonte de frutos comestíveis (Nunes et al., 2012). As espécies mais exploradas são *Annona muricata* L. (graviola), *Annona squamosa* Delile (fruta-do-conde), *Annona reticulata* Sieber ex A.DC. (condessa) e *Annona crassiflora* Mart. (marolo), devido às propriedades nutricionais dos frutos e pelo sabor adocicado e perfume (Takahashi, 2008).

Existem espécies silvestres dessa família, como por exemplo, a espécie nativa do cerrado *Annona cacans* Warm., que apesar de não serem consideradas de importância econômica relevante são conhecidas em comunidades locais. Os estudos científicos de caracterização fitoquímica das diferentes espécies de Annonaceae concentram-se na composição alcaloídica das plantas, mas estas, também produzem uma ampla gama de diferentes compostos pertencentes a vários grupos fitoquímicos, aproximadamente 500 alcaloides são investigados em 138 espécies de Annonaceae de 43 gêneros (Leboeuf et al., 1982; González-Esquinca et al., 2014).

Essa família necessita de investigações fitoquímicas completas e mais amplas que proporcionem a elucidação e a descoberta de novos compostos ativos passíveis de serem empregados na indústria de medicamentos, cosméticos, agrícolas e de alimentos (Alfaia e Almeida, 2016). Em estudos fitoquímicos realizados com diferentes Annonaceae já foram identificados cerca de 320 produtos naturais secundários como substâncias aromáticas, fenólicos, taninos, flavonoides, catequinas, proantocianidinas, óleos essenciais, terpenos, esteroides, carboidratos, lipídios, proteínas, carotenos, saponinas, entre outros (Leboeuf et al., 1982, Lúcio et al., 2015).

Entre os compostos presentes na graviola, destacam-se ácidos graxos, terpenóides e acetogeninas. No óleo essencial das folhas estão presentes 80 compostos, 39 os constituintes mais abundantes β -cariofileno, Δ -cadineno, epi- α -cadinol e α -cadinol (Kossouoh, 2007). Em estudo realizado por Coria-Téllez (2018) foi revisado cerca de 200 compostos com atividades metabólicas desta espécie. As cascas, raízes, sementes ou folhas de graviola utilizadas em decocções ou cápsulas são empregadas no tratamento popular do câncer (Tisott et al., 2013).

As atividades biológicas desta espécie são atribuídas principalmente à sua composição em acetogeninas, devido a suas propriedades citotóxica, antitumoral, sedativa, imunossupressora, antiparasitária, antimicrobiana e pesticida (Nova, 2008; Yang et al., 2010). Os óleos essenciais de *Annona* possuem várias atividades biológicas, como perfil anticancerígeno, analgésico, antiinflamatório e de citotoxicidade (Râbelo et al., 2015).

Estudos tem demonstrado de modo geral, que o gênero *Annona* apresentam em sua composição flavonoides principalmente flavonas (luteonina) e flavonóis (canferol, quercetina, ramnetina e rutina) (Nunes et al., 2012). Quanto aos efeitos farmacológicos das Annonaceae, podemos citar a atividade antitumoral, bioinseticida, vermífida, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite, repelente de insetos tópicos, entre outras (Cavé et al., 1997; Alali et al., 1998, Leatemia e Isman, 2004, Isman e Akhtar, 2007).

2.5 *Annona crassiflora* e *Annona cacans*

Entre as espécies do gênero *Annona*, com capacidade de se tornar fonte de compostos ativos de interesse industrial, destacam-se *A. crassiflora* e *A. cacans* (Figura 3). Estas espécies possuem poucos estudos científicos baseados em seus compostos e suas potencialidades de aplicação em comparação a outras espécies do mesmo gênero.

Entretanto já foram identificados pontos relevantes de análise como pós-colheita e conservação, pois os frutos são altamente perecíveis, a produção é irregular, com anos de alta e de baixa produtividade; ocorrência de pragas e doenças como broca-do-fruto (*Cerconota anonella*) e sistema propagação vegetativa pois as sementes possuem alto grau de dormência (Broglia-Micheletti e Berti-Filho, 2000).

(Fonte: autor e Maas et al., 2015)

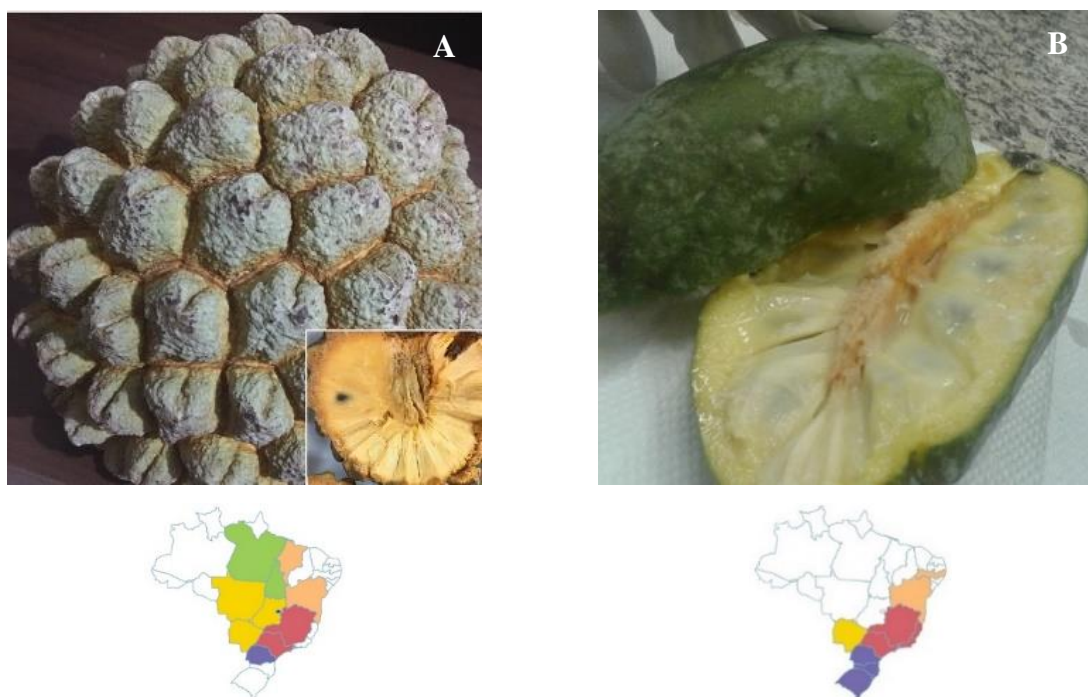


FIGURA 3 - *Annona crassiflora* (A) *Annona cacans* (B) e suas ocorrências no Brasil

Sobre as características morfológicas de *Annona crassiflora*, apresenta porte arbóreo, medindo entre 4 a 8 metros de altura, com tronco geralmente tortuoso de 20 a 30 cm de diâmetro, casca áspera e corticosa; folhas alternas simples; flores axilares, com pétalas engrossadas e carnosas (Lorenzi, 2002). Os frutos têm cerca de 15 cm de diâmetro com média de 2 kg de peso, oval arredondado, com casca na cor marrom claro e polpa creme amarelada firme e grande quantidade de sementes elípticas e marrom escuras.

No domínio fitogeográfico do Cerrado, o araticum é encontrado nas fisionomias: cerradão, cerrado denso, cerrado típico, cerrado ralo e campo rupestre (Almeida et al., 1998). A distribuição geográfica de *A. crassiflora* no Brasil ocorre nos estados de MG, SP, MS, DF, GO, MT, PA, BA, TO, MA e em áreas remanescentes de cerrado no PR (Maas et al., 2015).

Conhecida popularmente como marolo, araticum, araticum-do-cerrado, *Annona crassiflora*, é amplamente consumida como fruto de mesa e em pratos típicos (doces, geleias, licores, refrigerantes, sorvetes e sucos) nas regiões de ocorrência, principalmente devido ao seu sabor, aroma e cor (Luzia e Jorge, 2013). Tem grande potencial nutricional, apresentando altos níveis de vitaminas, ácido ascórbico e carotenoides (Botrel et al., 2016). No entanto, seu consumo é menor que os das outras espécies de anonas, como a graviola e fruta do conde. Esta espécie possui também compostos antioxidantes e seus frutos fornecem fibras alimentares que beneficiam a saúde (Corrêa et al., 2011).

A capacidade antioxidante e a estabilidade oxidativa foram evidenciadas em *A. crassiflora* como significativamente influenciadas pelo teor de fitoesterol e pela composição de ácidos graxos presentes, o que contribui para a possibilidade de emprego dessa espécie como ingrediente na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (Luzia e Jorge, 2013). São vários os aspectos que tornam a espécie interessante do ponto de vista comercial, inclusive seu fruto já é explorado por indústrias de doces, sorvetes e outros produtos alimentícios.

Annona cacans é conhecida popularmente como Araticum cagão. Sua distribuição geográfica tem ocorrência estados da BA, PE, MS, ES, MG, RJ, SP, PR, RS e SC, e presença nos domínios fitogeográficos do Cerrado e Mata Atlântica (CNCFLora, 2012). A árvore tem de 7 a 20 m de altura, ramos jovens, ramos adultos glabros, folhas cartáceas, elípticas, glabras, até 2 flores, fruto ovóide verde com polpa amarelada e vermelha na base (Maas et al., 2001).

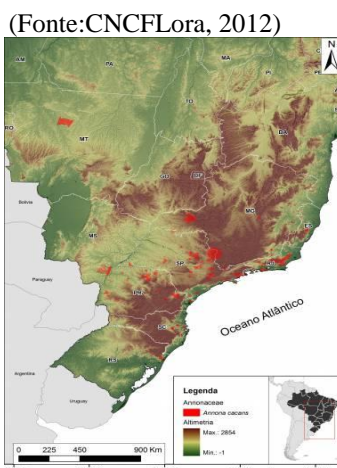


FIGURA 4. Mapa de possibilidade de extinção de *A. cacans* no Brasil

Os frutos de *Annona cacans* não são consumidos pois possuem atividade diarreica, porém apresenta uma polpa adocicada e aromática (Carvalho, 2003). A espécie foi pouco avaliada, porém já foram identificados alcaloides, em extratos obtidos de seu caule e em particular, a liriodenina, tanto no tegumento quanto no endosperma das suas sementes (Saito e Alvarenga, 1994; Sousa et al., 2019). A espécie está na lista vermelha de risco de extinção (Figura 4) (CNCFlora, 2012).

Nascimento (2008) descreveu diterpenos caurânicos, acetogeninas, esteróides, e alcaloides em *Annona cacans*, além de ter isolado seis substâncias inéditas: um caurano, três acetogeninas naturais, verificou alta toxicidade em *Artemia salina* e possível atividade inseticida contra *Musca domestica*. Recentemente foram avaliadas sua potencialidade antioxidante e fotoprotetora de extratos obtidos da polpa do fruto e das folhas desta espécie (Spera, K.D. 2014).

2.6 Acetogeninas

Estudos farmacológicos utilizando espécies de Annonaceae se intensificaram, em grande parte, devido à descoberta das acetogeninas, compostos orgânicos derivados de ácidos graxos de cadeia longa e que tem grande variedade de atividades biológicas (Rupprecht et al., 1990). Setenta espécies a partir de cinco gêneros (*Annona*, *Goniothanlamus*, *Rollinia*, *Uvaria* e *Xylopia*) da família Annonaceae são fontes de acetogeninas (Gu, 1995).

Diversos estudos apontam como alvo de ação das acetogeninas a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, conhecido como complexo I da cadeia respiratória, e tem ação específica na enzima NADH-ubiquinona-oxidoreductase (Rupprecht et al., 1990). Além disso inibe a NADH-oxidase ligada a ubiquinona está presente nas membranas de células tumorais (Alali et al., 1998).

As acetogeninas de Annonaceae exibem uma ampla gama de propriedades bioativas tais como citotoxicidade seletiva especificamente em células cancerosas, atividade parasiticida, inseticida antitumoral, antineoplásicas, antiparasitárias, citotóxicas, imunossupressoras, neurotóxicas e pesticidas (Wu, 2006; Nova, 2008). Quanto à citotoxicidade, foi relatada a atividade de anonacina e acetogeninas presentes em extratos de *Annona muricata* em células Raji linfoblastos-B infectados com vírus Epstein Barr (Roduan et al., 2018) existem também estudos anteriores, que descobriram que a anonacina é citotóxica na maioria das linhas celulares de câncer, como pâncreas e mama (Woo et al. 1999; Yuan et al. 2003; Ko et al. 2011).

Foram verificadas interações entre fármacos antitumorais e antioxidantes, onde ocorreu potencialização do mecanismo de ação desses fármacos na diminuição do tamanho dos tumores e devido a atividade biológicas dos antioxidantes, obtiveram uma ação com menos efeitos colaterais, o que levou a melhoria da qualidade de vida do paciente (Rohenkohl et al., 2011). Portanto, quando se fala em quimioterapia, já está sendo considerado o uso da graviola, para evitar possíveis infecções protegendo o sistema imunológico levando em consideração o fato de que diferente dos quimioterápicos convencionais, os compostos não atingem as células saudáveis (González-Esquinca et al., 2014).

Já foram identificadas mais de 500 tipos de acetogeninas em Annonaceae de 51 espécies em 13 gêneros (González-Esquinca et al., 2014). Os efeitos citotóxicos e antitumorais dessas substâncias são responsáveis pela popularidade destas moléculas (Liaw et al., 2016).

2.7 Tecnologia de microencapsulação de compostos bioativos

Uma desvantagem na utilização de antioxidantes naturais, é a possibilidade de degradação durante o processamento, o que resulta em perda total ou parcial de atividade. O microencapsulamento, que consiste no processo de recobrir o composto ativo por uma camada de polímero de espessura variável e conhecida, está provando ser uma solução para manutenção da atividade antioxidante de diferentes compostos naturais (FIB, 2013; Carochio et al., 2018).

Essa tecnologia permite também o desenvolvimento de fórmulas com liberação controlada por estímulos adequados (mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução, entre outros) em locais e meios onde devem agir ou onde serão absorvidos (Suave et al., 2006). No que diz respeito ao processo de microencapsulamento de ativos naturais, a escolha do material encapsulante se dá pela sua capacidade de formação de filme, baixa viscosidade em altas concentrações, capacidade emulsificante e não reatividade com o material encapsulado (Gharsallaou et al, 2007). Entre os diferentes encapsulantes a maltodextrina sozinha ou combinada com gomas são os agentes mais utilizados no processo de secagem e obtenção do produto encapsulado (Ding e Shah, 2009).

A técnica de microencapsulação por Spray Dryer consiste numas etapas onde a substância a ser encapsulada é homogeneamente dispersa ou dissolvida em uma solução aquosa ou com o solvente de interesse, contendo o agente encapsulante, então, essa solução é atomizada em corrente de ar quente que vai promover a evaporação do solvente, obtendo-se a rápida solidificação das gotículas que depois serão recolhidas no ciclone em forma de pó (Nunes, 2014, Maciel, 2018).

Os produtos de microencapsulação têm, portanto, aplicação direta tanto na indústria farmacêutica quanto na de alimentos, cosméticos e agrícola. A encapsulação de extratos direcionados para acetogenina pode oferecer um sistema eficiente para o composto ativo. Os processos micro/nanotecnológicos vêm sendo aplicados, principalmente, na indústria farmacêutica e cosmética e torna mais eficiente a veiculação de moléculas bioativas no organismo, bem como facilita a penetração desses compostos nas camadas mais profundas da pele (Schmaltz et al., 2005).

CONCLUSÃO GERAL

Os extratos de folhas e polpa de *Annona crassiflora* e *Annona cacans* foram submetidos a análises espectrofotométricas e cromatográficas.

Nas folhas e polpa de *A. crassiflora* foram encontrados cerca de 90 compostos e em *A. cacans* mais de 250. As duas partes vegetais das duas espécies apresentaram flavonoides e alto teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante significativa em baixa concentração pelos diferentes métodos avaliados.

A. crassiflora e *A. cacans* apresentaram compostos que podem ser caracterizados como acetogeninas, e atividade antiproliferativa contra diferentes linhagens células tumorais, mais estudos são viáveis para comprovar a relação entre esses compostos e a atividade antitumoral.

A microencapsulação com maltodextrina dos extratos de folha de ambas as espécies se mostrou efetiva com relação ao processo e o teor de compostos fenólicos.

REFERÊNCIA GERAL

Alali, F.Q.; Kaakeh, W.; Bennett, G.; McLaughlin, J. Annonaceous acetogenins as natural pesticides; potent toxicity against insecticide susceptible and resistant german cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, Lanham, 91(3), 641-649, 1998.

Alali, F.Q.; Liu, X.; McLaughlin, J.L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, 62(3), 504-540, 1999.

Alfaia, D.P.S.; Almeida, S.S.M.S. Avaliação fitoquímica, análise citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas de *Annona muricata* L (Annonaceae). *Biota Amazonia*, 6(1),26-30, 2016.

Almeida, S.P. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: Embrapa-CPAC, 247-281, 1998.

Andallu, B.; Shankaran, M.; Ullagaddi, R.; Iyer, S. *In vitro* free radical scavenging and *in vivo* antioxidante potential of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Journal of Herbal Medicine*, 4, 10-17, 2014.

Anderson, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage *Mutation Research*, 350, 103-108, 1996.

Arruda, H.S.; Pereira, G.A.; Morais, D.R.; Eberlin, M.N.; Pastore, G.M. Determinação da composição fenólica livre, esterificada, glicosilada e insolúvel na parte comestível de frutos de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) e seus subprodutos por HPLC-ESI-MS / MS. *Química alimentar*, 245, 738-749, 2018.

Barbosa, K.B.F.; Costa, N.M.B.; Alfenas, R.C.G.; De Paula, S.O.; Minim, V.P.R.; Bressan, J. Estresse oxidativo: conceito, aplicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição de Campinas*, 23(4), 629-643, 2010.

Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29 (1), 113-123, 2006.

Bergendi, L.; Benes, L.; Durackova, Z.; Ferencik, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Science*, 65, 1865–1874, 1999.

Betteridge, D.J. What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2), 3-83, 2000.

Bianchi, M.L.P., Antunes, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição de Campinas*, 12(2), 123-130, 1999.

Botrel, D. A.; Rodrigues, I. C. B.; Souza, H. J. B.; Fernandes, R.V.B. Application of inulin in thin-layer drying process of araticum (*Annona crassiflora*) pulp. *LWT – Food Science and Technology*, 69, 32-39, 2016.

Broglio-Micheletti, S.M.F.; Berti-Filho, E. Controle de Cerconota anonella em pomar de gravioleira. *Scientia Agricola*, 57(3), p.557-559, 2000.

Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 107-120, 2018.

Carvalho, P.E.R. Araticum-cagão. Circular Técnica Embrapa. 2003.

Carr, A.; McCall, M.R.; Frei, B. Oxidação de LDL por mieloperoxidase e reações reativas de nitrogênio, vias de reação e proteção antioxidante *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20, 1716 – 1723, 2000.

Cavé, A.; Figadère, A.; Laurens, A.; Cortes, D. Acetogenins from Annonaceae. In: Herz, W.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Steglich, W.; Tamm, C. (eds). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. New York: Springer Verlag, 281-287, 1997.

Chen, C.H.; Hsieh, T.J.; Liu, T.Z.; Chern, C.L.; Hsieh, P.Y.; Chen, C.Y. Annoglabayin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annomontacin from the fruits of *Annona glabra*. *Journal of Natural Products*, 67, 1942-1946, 2004.

Corrêa, S. C.; Clerici, M. T. P. S.; Garcia, J. S.; Ferreira, E. B.; Eberlin, M. N.; Azevedo, L. Evaluation of dehydrated marolo (*Annona crassiflora*) flour and carpels by freeze-drying and convective hot-air drying. *Food Research International*, 44, 2385-2390, 2011.

Couvreur, T.L.P.; Maas, P.J.M.; Meinke, S.; Johnson, D.M.; Kebler, P.J.A. Keys to the genera of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169, 74–83, 2012.

Degáspari, C.H.; Waszczynskyj, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Acadêmica*, 5(1), 33-40, 2004.

Ding, W.K.; Shah, N.P. An effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 74, 100-107, 2009.

FIB (Food Ingredients Brasil). Microencapsulação: A microencapsulação a serviço de indústria alimentícia, n. 25, 2013.

Ferreira, I.C.F.R.R.; Abreu, R.M.V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, 2, 32-39, 2007.

Gharsallaou, I.A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International* 40, 1107, 2007.

Gibbs, B. F.; Kermasha, S.; Alli, I.; Mulligan, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 213-224, 1999.

González-Esquinca, A.R., De-la-cruz-chacón, I., Castro-Moreno, M., Orozco-Castillo, A., Riley-Saldaña, C.A. alkaloids and acetogenins in annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 1-16, 2014.

Gonzalo, J.C.R.; Alonso, M.G. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 9(2), 31-38, 2002.

- Gu, Z.M., Zhao, G.S., Oberlies, N.H., Zeng, L.; McLaughlin, J.L. Annonaceous acetogenins - potent mitochondrial inhibitors with diverse applications. In: Arnason, J.T.; Mata, R. (eds) Recent advances in Phytochemistry. New York, Plenum Press: 249-310, 1995.
- Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine*, 9, 14-22, 1991.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edition ed. Clarendon, Oxford, 2007.
- Hutchinson, J. *The Genera of Flowering Plants*. Vol. 1. University Press, Oxford, 1964.
- Isman, M.B.; Akhtar, Y. Plant natural products as a source for developing environmentally acceptable insecticides. In: Ishaaya, I., Nauen, R., Horowitz, A.R. (Eds.), *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. Springer-Verlag, Berlin, 235–248, 2007.
- Joly, A. B. *Botânica, introdução a taxonomia vegetal*. São Paulo: Nacional, 1979. 550p.
- Julián-Loeza, A.P.; Sánchez, N.S.F.; Valadez, R.B.; Guzmán, B.S.S.; Salas-Coronado, R. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*, 34 (2), 1262-1268, 2010.
- Ko, Y.M.; Wu, T.Y.; Wu, Y.C.; Chang, F.R.; Guh, J.Y.; Chuang, Y. Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor- α -related pathways in MCF-7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 137, 1283-1290, 2011.
- Kossouh C.; Moudachirou M.; Adjakidje V.; Chalchat J.C.; Figuéredo, G. Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. leaves from Benin. *Journal of Essential Oil Research*, 19, 307-309, 2007.
- Kulmann, M.; Kuhn, E. *A flora do Distrito de Ibiti*. São Paulo: Instituto de Botânica, 1947. 221p.
- Lage, G.A.; Medeiros, F.S.; Furtado, W.L.; Takahashi, J.A.; Souza-Filho, J.D.; Pimenta, L.P.S. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. *Natural Product Research*, 1, 37-41, 2014.
- Leatemia, J.A.; Isman, M.B. Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against Lepidopteran Larvae. *Phytoparasitica* 32, 30–37, 2004.
- Lebouef, M.; Cavé, A.; Bhaumik, K.; Mukerjee, B.; Mukerjee, R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, 21(12), 2783–2813, 1982.
- Liaw, C.C.; Liou, J.R.; Wu, T.Y.; Chang, F.R.; Wu, Y. C Acetogenins from Annonaceae. *Progress in chemistry of organic natural products*, 101, 113-230, 2016.
- Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. *Plantas Medicinais do Brasil*. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002, 544 p.
- Lúcio, A.S.S.C.; Almeida, J.R.G.S., da-Cunha, E.V.L., Tavares, J.F.; Barbosa Filho, J.M. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 233–409, 2015.

Luzia, D.M.M.; Jorge, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 231-235, 2013.

Maas, P.; Lobão, A.; Rainer, H. 2015 *Annonaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110235>>, acesso em 12 de dezembro de 2018.

Maciel, A.G.S Preparo do microencapsulado de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) e toxicidade letal e subletal do microencapsulado a *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas, 2018.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747, 2004.

Mattos, J.R. Frutos indígenas comestíveis do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis" AP", 1978, 37p.

Menezes, C.R.; Barin, J.S.; Chicoski, A.J.; Zepka, L.Q.; Jacob-Lopes, E.; Fries, L.L.M.; Terra, N.N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciência Rural*, 2013

Miller, D.M.; Buettner, G.R.; Aust, S.D. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radicals Biology & Medicine*, 8, 95–108, 1990.

Moncada, S. e Hiyg, A. The L-arginine nitric oxid pathway. *The New England Journal of Medicine*, 129, 2007-2012, 1993.

Nascimento, M.C.B.S. Constituintes bioorgânicos de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

Niki, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515, 2010.

Niciforovic, N.; Mihailovic, V.; Maskovic, P.; Solujic, S.; Stojkovic, A.; Pavlovic Muratspahic, D. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3125-3130, 2010.

Nova, N.S.V.N. Ação leishmanicida de alcalóides e acetogeninas extraídas de Annonaceae do Estado de Ceará. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará – Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Ceará, 2008.

Nunes, C.R.; Bernardes, N.R.; Glória, L.L.; Oliveira, D.B.; Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. *Vértices*, 14(1), 38-57, 2012.

Nunes, G.L. Microencapsulação por spray drying do extrato crioconcentrado de erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill) empregando a maltodextrina como agente encapsulante. 2014. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2014.

Oroian, M.; Escriche, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36, 2015.

Pan, L.; Heebyung, C.; Kinghorn, A.D. The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochemical Letters*, 8, 1–8, 2009.

Pereira, R.J.; Cardoso, M.G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(4), 146-152, 2012.

Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042, 2000.

Poulsen, H.E.; Prieme, H.; Loft, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention, Oxford*, 7(1), 9-16, 1998.

Quiles, J. A call for caution on Antioxidant supplementation, *Science-Based Medicine*, 2018. Disponível em <https://sciencebasedmedicine.org/a-call-for-caution-on-antioxidant-supplementation/>, acesso: 28 de janeiro de 2019.

Rabêlo, S.V.; Costa, E.V.; Barison, A.; Dutra, M.L.; Nunes, X.P.; Tomaz, J.C.; Oliveira, G.G.; Lopes, N.P.; Santos, M.F.C.; Almeida, J.R.D.S. Alkaloids isolated from the leaves of atemoya (*Annona cherimola* × *Annona squamosa*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 419–421, 2015.

Ré, M.I. Microencapsulação—em busca de produtos ‘inteligentes’. *Ciência hoje*, 27(162), 24-29, 2000.

Rohenkohl, C.; Carniel, A.; Colpo, E. Antioxidants consumption during chemotherapy treatment. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 24, 107-112, 2011.

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*, 27(1), 53-60, 2007.

Rupprecht, J.K.; Hui, Y.H.; McLaughlin, J.L. Annonaceous Acetogenins: A review. *Journal of Natural Products*, 53, 237-278, 1990.

Saito, M.L.; Alvarenga, M.A. Alkaloids from *Annona cacans*. *Fitoterapia*, 65(1), 87, 1994.

Santos, A.B.; Ferreira, V.P.; Grosso, C.R.F. Microcápsulas—uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação: óleo-resina de páprica. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 16, 26-30, 2000.

Schmaltz, C.; Santos, J.V.; Guterres, S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. *Infarma*, 16, 80, 2005.

Shaidi, F.; Ho, C-T. Antioxidant measurement and applications: an overview. *ACS Symposium series*, 956, 1, 2-7, 2007.

Sousa, M.C.; Bronzatto, A.C.; González-Esquinca, A.R.; Campos, F.G.; Dalanhol, S.J.; Boaro, C.S.F.; Martins, A.L.; Almeida, J.R.G.S.; Costa, E.V.; De-la-Cruz-Chacón, I.; Ferreira, G. The production of alkaloids in *Annona cacans* seedlings is affected by the application of GA₄₊₇ + 6-Benzyladenine. *Biochemical Systematics and Ecology*, 84, 47-51, 2019.

Spera, K.D Avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e antiglicação dos extratos de folhas e frutos de espécies da família Annonaceae, dissertação mestrado, Universidade Estadual Paulista – Assis, 2014.

Suave, J.; Dall'Agnol, E.C.; Pezzin, A.P.T.; Silva, D.A.K.; Meier, M.M.; Soldi, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, 7(2), 2006.

Takahashi, L.M. Identificação de *Colletotrichum gloeosporioides* de atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), por meio de caracterização patogênica, cultural e morfológica. 2008. 46f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

Telles, M.P.C.; Valva, F.D.; Bandeira, L.F.; Coelho, A.S.G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica*, 26(1), 123-129, 2003.

Tisott, G.; Molin, D.; Colet, C.D.F. The use of medicinal plants and herbal medicines for patients in chemotherapy in na oncology center of Ijuí/RS. *O Mundo da Saúde*, 39(3), 287–298, 2013.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(4), 44–84, 2007.

Vincent, H.K.; Innes, K.E.; Vincent, K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obesity and Metabolism*, 9(6), 813-839, 2007.

Witzum, J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*. 344, 793-795, 1994.

World Cancer Research Fund, Food nutrition, physical activity and the prevention of cancer, 517p. 2007.

Wu, Y. New research and development on the formosan Annonaceous plants. *Studies in Natural Products Chemistry*, 33, 957-1023, 2006.

Woo, M.H.; Chung, S.O.; Kim, D.H. cis-Annonacin and (2,4)-cis-and-transisoannonacins: Cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona cherimolia*. *Archives of Pharmacal Research*. 22, 524-528, 1999.

Yang, H., Zhang, N., Zeng, Q., Yu, Q., Ke, S., Li, X. HPLC method for the simultaneous determination of ten annonaceous acetogenins after supercritical fluid CO₂ extraction. *International Journal of Biomedical Sciences*, 6(3), 202-7, 2010.

Yuan, S.S.; Chang, H.L.; Chen, H.W.; Yeh, Y.T.; Kao, Y.H.; Lin, K.H.; Wu, Y.C.; Su, J.H. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. *Life Science*. 72, 2853, 2003.

Zaid, M.A.; Afaq, F.; Syed, D.N.; Mukhtar, H. Botanical Antioxidants for Protection Against Damage from Sunlight. *Nutritional Cosmetics*, 1, 161-183, 2009.