

**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*"

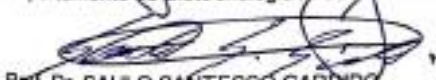
AUTORA: KAMILLE DALECK SPERA

ORIENTADOR: REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA

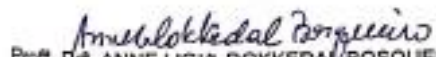
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



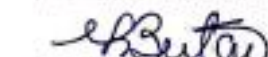
Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis



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 - Bauri



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 SANTOSSO GARRIDO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ANNE LIGIA DORRÉDAL BOSQUEDO
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 Converte 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 (cólon). 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 (cólon). Linhagem não tumoral humana: HaCaT (queratinócito).....69

FIGURA 2.11 Taxa de crescimento celular com extrato da polpa folha de *A. cacas* 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 Doxorubicina 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 Polifenois 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 (Couvreur 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; Carocho 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

Radicais 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 radicais 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 radicais livres (Figura 1). Os derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies radicais 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)

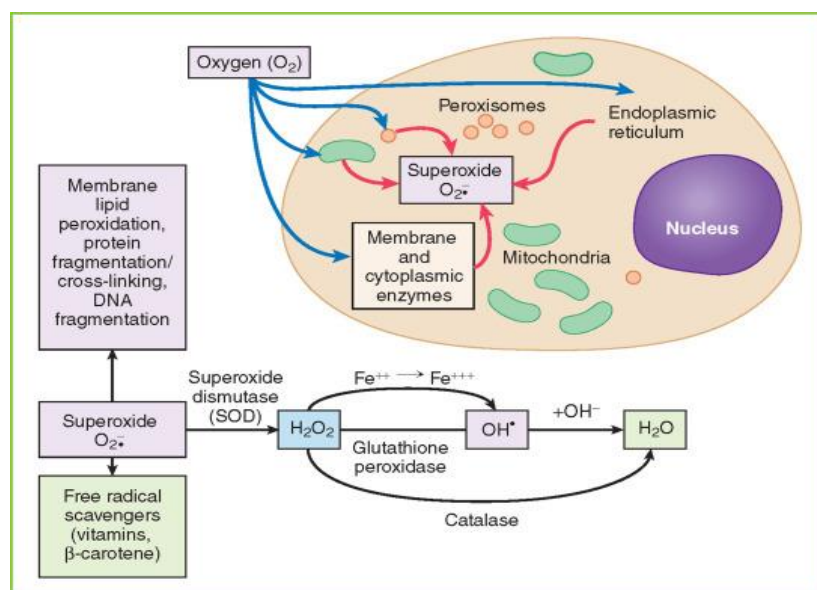


FIGURA 1. Produção de radicais livres no organismo

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; Carochio 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).

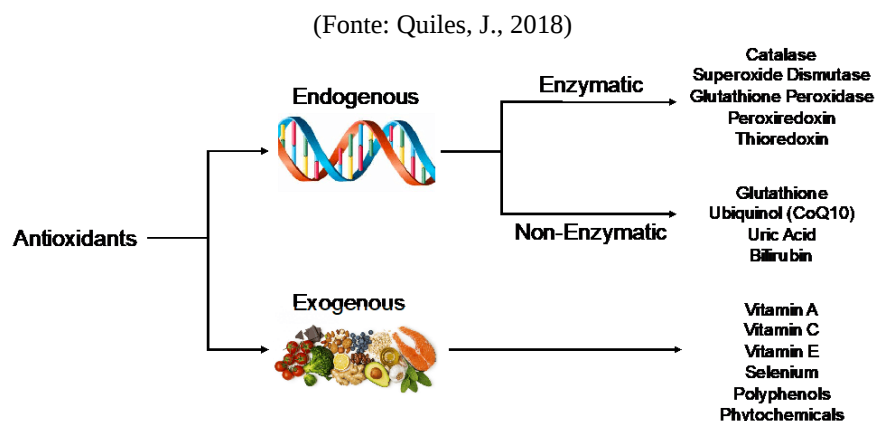


FIGURA 2. Antioxidantes endógenos e exógenos produzidos pelo organismo e obtidos na alimentação

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, vermicida, 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)

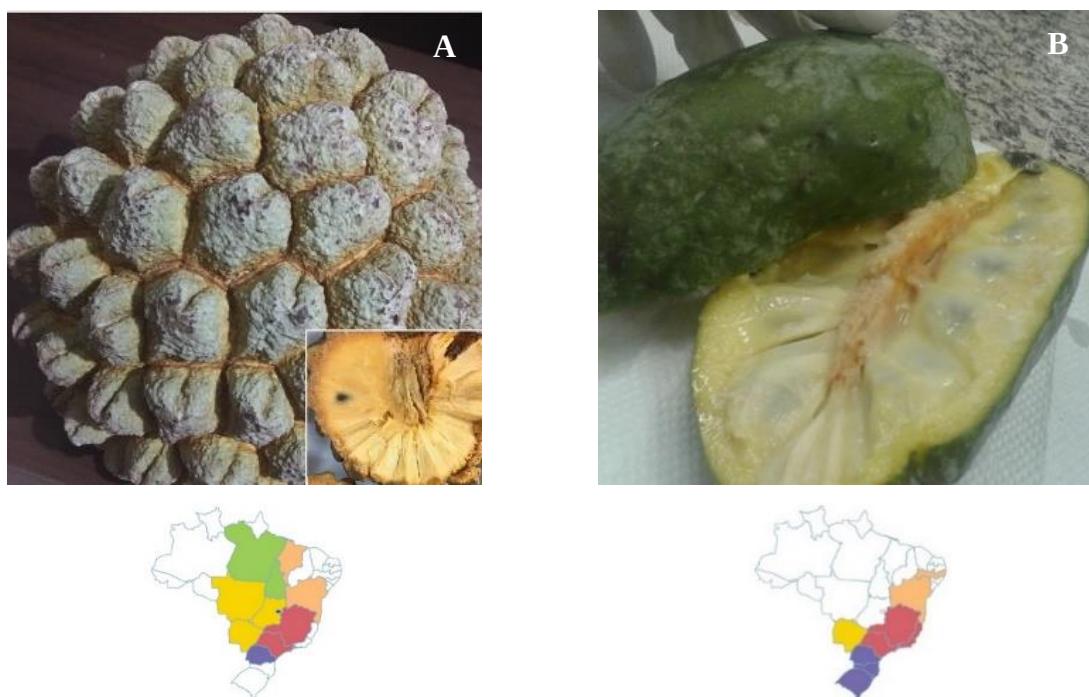


FIGURA 3 - *Annona crassiflora* (A) *Annona cacans* (B) e suas ocorrências no Brasil

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).

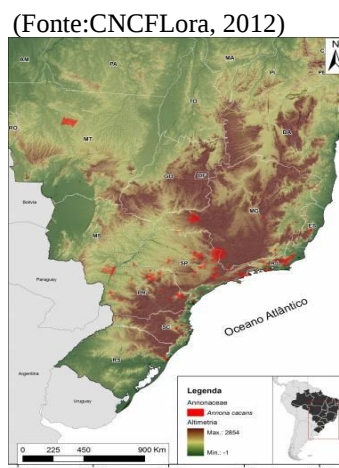


FIGURA 4. Mapa de possibilidade de extinção de *A. cacans* no Brasil

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).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil fitoquímico de *Annona crassiflora* e *Annona cacans*, avaliar a atividade antioxidante dos extratos, identificar acetogeninas e microencapsular os extratos.

3.2 Objetivos específicos

Realizar o *screening* fitoquímico de folha e polpa de *A. crassiflora* e *A. cacans*, verificando compostos de interesse, através de HPLC e Cromatografia Gasosa.

Determinar o conteúdo de fenóis e flavonoides totais dos extratos da polpa e folha de *A. crassiflora* e *A. cacans*.

Determinar a atividade antioxidante por diferentes metodologias dos extratos de polpa e folha de *A. crassiflora* e *A. cacans*.

Identificar a presença de acetogeninas nos extratos com espectrômetro de massas MS.

Determinar a atividade antiproliferativa em linhagens celulares tumorais dos extratos de polpa e folha de *A. crassiflora* e *A. cacans*

Microencapsular os extratos das folhas com Spray Dryer, otimizar o método e avaliar as microcápsulas obtidas quanto ao teor de fenóis totais.

Capítulo 1

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CARACTERIZAÇÃO, DE
***Annona crassiflora* Mart. E *Annona cacans* Warm.**

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Annona crassiflora* Mart. E *Annona cacans* Warm.

RESUMO

Em consideração a biodiversidade brasileira e a possibilidade de descobrir novos compostos bioativos que podem ser encontrados nas espécies vegetais nativas se dá a importância do presente estudo. *Annona* é um gênero bastante representativo do Cerrado brasileiro. A fruta de *Annona crassiflora* já tem seu consumo difundido, porém ainda se sabe pouco sobre a relação de suas atividades já comprovadas biológicas e seus compostos, já *Annona cacans*, tem menor ocorrência e não existem estudos aprofundados na literatura sobre seu perfil fitoquímico. Foi realizado um *screening* para verificação dos compostos majoritários nos extratos de acetato de etila da polpa e folha de *A. crassiflora* e *A. cacans*, com Cromatografia Gasosa, foi quantificado a quantidade de Fenois e Flavonoides totais, e analisado em HPLC para verificação dos principais Flavonoides, e verificado o potencial antioxidante de acordo com os testes DPPH, TBARS, FRAP, Óxido nítrico e Hemólise, para comparação dos diferentes métodos de ação antioxidante dos extratos. Os resultados demonstraram que os extratos de folha e polpa de ambas as espécies apresentam atividade antioxidante significativa, principalmente pelo método DPPH, e em baixas concentrações. Foram identificados cerca de 90 compostos em *A. crassiflora* e 270 em *A. cacans*, em sua maioria açúcares e compostos fenólicos.

Palavras-chave: Annonaceae, radicais livres, compostos, Follin, CG.

1 INTRODUÇÃO

Annonaceae é uma família botânica constituída de aproximadamente 120 gêneros, com mais de 2000 espécies, sendo 29 gêneros e cerca de 386 espécies brasileiras (Leboeuf et al., 1982, Maas et al., 2015). Estudos fitoquímicos e nutricionais já realizados com espécies desta família demonstraram a presença de carboidratos, lipídios, aminoácidos, proteínas, polifenóis, óleos essenciais, terpenos e alcaloides em diferentes partes das plantas (Leboeuf et al., 1982, González-Esquinca et al., 2014, Lúcio et al., 2015).

Estes compostos podem estar envolvidos na atividade biológica atribuída as espécies desta família, tais como a atividade antitumoral, bioinseticida, vermífida, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite, repelente de insetos tópicos, entre outras (Tissot et al., 2013, Coria-Téllez et al., 2018).

O gênero *Annona* é representado no Brasil por mais de 80 espécies, sendo 24 endêmicas (Maas et al., 2015). Entre as espécies deste gênero, algumas são conhecidas e amplamente utilizadas como alimento e na medicina popular para o tratamento de diferentes doenças, destacando-se a *Annona muricata* (graviola) e *Annona squamosa* (fruta-do-conde) que possuem inúmeros estudos científicos sobre seus constituintes e atividades biológicas exercidas em diferentes áreas (Cória-Tellez et al., 2018, Roduan et al., 2018, Sandeepa et al., 2019).

Outras espécies do gênero ainda necessitam de investigações científica mais aprofundadas, tanto sobre seus constituintes como suas potencialidades de aplicação, entre estas espécies destacam-se *Annona crassiflora* (marolo) e *Annona cacans* (araticum-cagão) ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica do território brasileiro.

Diferentes compostos ativos vegetais atuam como antioxidantes, influenciando e inibindo o aparecimento de doenças crônicas e degenerativas relacionadas ao estresse oxidativo ou diminuindo os sintomas no desequilíbrio biológico causado por agentes endógenos e/ou exógenos que proporcionam também no estresse oxidativo (Ferreira e Abreu, 2007).

Entre os compostos ativos de origem vegetal com atividade antioxidante destacam-se os flavonoides, carotenoides, esteróis, ácido ascórbico, lipídios, aminoácidos (Roesler et al., 2006; Sila e Bougategf, 2016). Estes, são descritos e caracterizados em diferentes espécies da família Annonaceae, tornando as importante alvos na busca de compostos com atividade antioxidante.

Para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais existem diferentes técnicas, que são importantes ferramentas para constatar o potencial de diferentes compostos e seus possíveis mecanismos de ação antioxidante, quais sejam sequestradores de radicais de oxigênio e nitrogênio, quelantes de metais, entre outros (Gomèz et al., 2019). A busca por antioxidantes naturais, especialmente de origem vegetal, vem aumentando nos últimos anos, principalmente por parte da indústria farmacêutica, cosmética e nutricional.

Diante do exposto o presente estudo teve por objetivo realizar pela primeira vez a caracterização dos compostos naturais de extratos das folhas e da polpa dos frutos de *Annona crassiflora* e *Annona cacans* afim de verificar a possibilidade de ocorrências de potenciais bioativos de interesse, além de determinar, por diferentes métodos, a atividade antioxidante

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal e preparação dos extratos

Os frutos e folhas de *Annona crassiflora* e *Annona cacans* foram coletados no município de Assis, São Paulo, Brasil (latitude: 22°39 '42"S, longitude: 50°24'44"W, altitude: 546m), nos meses de março e abril de 2017, nas imediações do Instituto Florestal do Estado de São Paulo e em propriedade particular no município de Platina/SP. As polpas foram congeladas (-18°C) e liofilizadas. As folhas foram secas a 40° em estufa de ar forçado até obter propriedade para pulverização.

Foram depositadas as exsicatas no Herbário Assisense HASSI da Universidade Estadual Paulista – Faculdade de ciências e Letras- campus Assis. *Annona crassiflora* VOUCHER n°: 1170 e *Annona cacans* VOUCHER n° 1171.

O extrato foi preparado com o pó obtido da secagem das folhas e da polpa, colocados em solução hidrometanólica (70:30) por 3 dias em temperatura ambiente e filtrado. O metanol foi removido e realizada a separação líquido/líquido com acetato de etila por 4x. A fração de acetato de etila foi a utilizada no trabalho.

2.2 Caracterização dos extratos de folha e polpa de *A. crassiflora* e *A. cacans*

2.2.1 Determinação de fenóis e flavonoides totais

Para a quantificação de compostos fenólicos totais foi utilizado o método *Folin-Ciocalteu*, adaptado de Wu (2006). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido gálico por g de extrato. A dosagem dos flavonoides totais foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis de acordo com a metodologia de Zhinshen et al., (1999), baseada na complexação dos flavonoides com $AlCl_3$. A absorbância mensurada a 510 nm, todas em triplicata, e os resultados obtidos expressos em mg de rutina por g de extrato.

2.2.2 Determinação flavonoides totais (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

As análises foram realizadas no laboratório de Ciências Biológicas da UNESP/Bauru. As análises cromatográficas dos extratos foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC (Jasco, Tokyo, Japan), acoplado a detector de arranjo de foto diodos (PAD), injetor automático com volume 20 μ L e forno de coluna 40°. As amostras foram monitoradas por detector PDA na região do espectro ultravioleta visível (UV-vis) na faixa de 200 a 400 nm, com coluna fase reserva Phenomenex® C18 de 250 x 4.6 mm i.d., tamanho médio de partícula: 5 μ m, 10 mg do extrato de acetato de etila foi dissolvido de 1 mL de acetonitrila (ACN) e filtrada com seringa com poro de 0,45 μ m. Os cromatogramas foram obtidos a 254 e 360 nm.

2.2.3 Determinação do conteúdo de açúcares totais

Para a determinação do conteúdo de açúcares solúveis totais etodologia descrita por Dubois et al. (1956), A leitura de absorbância da solução foi realizada em 490 nm. O cálculo foi feito de acordo com a equação: Açúcares solúveis (mg/g) = (Absorbância x K x, Fator de diluição) / Peso seco. Onde, absorbância: 490 nm, K: valor da curva padrão, Fator de diluição: 10 mL, Peso seco: 100 mg.

2.2.4 Cromatografia à gas acoplada à espectrometria de massas (CG-MS)

As análises cromatográficas por GC/ MS foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu Modelo GCMS-QP2020, equipado com detector de massa com analisador do tipo quadrupolo, empregado com coluna Shimadzu-Rtx-5MS com comprimento de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da fase estacionária. Foi realizado o processo de sililação, onde foram dissolvidos 10 mg do extrato em 200 µL de piridina em vial de 4 mL, foi adicionado 200 µL de MSTFA (*N-methyl-N(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*), homogeneizado e aquecido a 37° por 30 min, e deixado em repouso por 24 h a 5° C, e então filtrado com microfiltro de 0,22 µm e transferido para vial de 2 mL com insert de 350 µL. A análise foi realizada com temperatura do injetor de 290 °C; volume de amostra injetada de 1,0 µL com razão de split 1:50; energia de ionização por elétrons de 70 eV e faixa de aquisição dos espectros de massa, de m/z 45 a 500. O gradiente de temperatura iniciou a 100° C levando-se até 320° C, com uma taxa de aquecimento de 3° C min⁻¹. Os compostos encontrados foram identificados por comparação dos espectros de massa já existentes em biblioteca de referência do equipamento (NIST Library MS).

2.2.4.1 Análises dos Componentes Principais (PCA)

Foram realizadas análises exploratórias multivariadas e análise de componentes principais dos dados obtidos e organizadas em um gráfico onde variáveis semelhantes são agrupadas (Moita et al., 1998). A análise de componentes principais permite agrupar a maior quantidade dos dados originais em p variáveis. Cada composto identificado dos extratos, foi plotado com sua quantidade área em % e removidos os compostos que não foram identificados. As análises foram realizadas utilizando o programa Minitab 18.

2.3 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos

2.3.1 DPPH

Para a análise da atividade antioxidante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi utilizada a metodologia descrita por Blois, 1958. Os extratos reagiram com o DPPH por 30 min e lidos em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda 517 nm. O cálculo da atividade antioxidante foi realizado com a fórmula: Atividade antioxidante (%) = $[(A_{CONT} - A_{AMOSTRA}) / A_{CONT}] \times 100$, onde $A_{AMOSTRA}$ é a absorbância das amostras após 30 minutos e A_{CONT} é a absorbância do DPPH, ambos a 517 nm.

2.3.2 Poder de redução do Ferro (FRAP)

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP-Ferric Reducing Antioxidant Power) (Rufino et al., 2006), o reagente FRAP foi preparado no momento da análise. As absorvâncias foram medidas a 595 nm. Os resultados foram expressos em μM equivalente de Trolox (ET) por g de extrato seco. As análises foram realizadas em diferentes concentrações, sendo considerada para discussão a menor concentração que apresentou resultado no teste.

2.3.3 TBARS

A determinação do conteúdo de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada quantificando o nível de inibição da peroxidação lipídica de acordo com metodologia descrita por Costa et al. (2012). A gema de ovo foi usada como substrato lipídico. As absorvâncias dos sobrenadantes foram medidas a 532 nm e os resultados expressos em % de TBARS: $(A_{\text{CONT}} - A_{\text{AMOST}} \times 100 / A_{\text{CONT}})$. Onde A_{CONT} é a absorvância do AAPH sozinho e A_{AMOST} , a absorvância das amostras.

2.3.4 Sequestro do NO

A atividade de sequestro do radical NO foi determinada utilizando nitroprussiato de sódio (SNP) gerado no sistema de NO. O NO gerado pelo SNP em solução aquosa e em pH fisiológico reage com o oxigênio para produzir íons nitrito que foram mensurados pelo reagente Greiss (Marcocci et al., 1994). A absorvância dessas soluções foi medida à 540 nm e comparadas com a solução branco correspondente.

2.3.5 Método Hemolítico

2.3.5.1 Obtenção de Eritrócitos

A obtenção dos eritrócitos foi realizada conforme protocolo submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da FCL/Assis e teve início após sua aprovação (Comitê de Ética em Pesquisa FCL/Assis, nº833.386). O sangue foi coletado em heparina, de voluntários sadios por punção venosa e centrifugado (2500rpm/5min, temperatura ambiente) para obter a fração de eritrócitos, lavados 3x em Tampão PBS 10mM, pH=7,4 contendo NaCl 150mM por centrifugação (2500rpm/5min). Foi realizada diluição a 5%.

2.3.5.2 Ensaio de Hemólise induzida por AAPH

A ação dos diferentes extratos sobre os eritrócitos foi avaliada tanto na ausência de radicais livres como na presença do radical 2,22-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) de acordo com a metodologia descrita por Magalhães et al., 2009.

Para avaliação dos extratos sobre a lise de eritrócitos, 200 µl da suspensão contendo 5% de eritrócito foi incubado com 40µl dos extratos em diferentes concentrações e 160 µl tampão fosfato de sódio (10 mM/NaCl 150 mM, pH=7,4), por 150 minutos a 37° C, com agitação lenta e constante. O mesmo procedimento foi realizado com a inclusão do radical AAPH a 25 µM. Após incubação, foi realizada a centrifugação (2500 rpm/10 min) obtendo-se o sobrenadante.

Os graus de hemólise foram avaliados de acordo com a concentração de hemoglobina no sobrenadante, por absorvância em 540 nm. O grau de hemólise foi determinado pela equação: % hemólise = $100 \times \frac{\text{Abs}(\text{teste}) - \text{Abs}(\text{cont neg})}{\text{Abs}(\text{cont pos}) - \text{Abs}(\text{cont neg})}$. Onde, cont pos: 100% de hemólise (200 µl da solução de eritrócitos + 200 µl de água MiliQ); o cont neg (200 µl da solução de eritrócitos + 160 µl do tampão PBS + 40 µl de água Mili Q com 1% de DMSO).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos extratos

3.1.1 Determinação de fenóis e flavonoides totais

Foram avaliadas as quantidades de fenóis e flavonoides totais nos extratos da folha e polpa de *A. crassiflora* e *A. cacans* (Tabela 1.1). Entre os metabólitos secundários já encontrados no gênero *Annona* que possuem atividade antioxidante, destacam-se os flavonoides como quercetina, acetogeninas, isoramnetina, kaempferol e seus derivados- ou O-glicosídeos (Lage et al., 2014).

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

		FeT (mg EAG/g)	FlT (mg RE/g)
<i>A. crassiflora</i>	Folha	833.20±32.3	602.87±35.6
	Polpa	90.34±12.4	72.91±9.6
<i>A. cacans</i>	Folha	345.15±21.2	201.23±22.9
	Polpa	180.23±13.1	94.32±7.3

FeT (mg EAG/g): Resultados de Fenois Totais expressos em mg equivalente ao ácido gálico por g de extrato seco; FlT (mg RE/g): Resultados de Flavonoides Totais expressos em mg equivalente a rutina por g de extrato seco

Todos os extratos avaliados apresentaram conteúdo de Fenóis e Flavonoides para os testes utilizados (Tabela 1.1) sendo os maiores valores, para ambos, encontrado na folha de *A. crassiflora*, com Fenóis em 833,2 mgEAG/g de extrato seco de, e Flavonoides com 602,8 mgRE/g de extrato seco. Os resultados da polpa de *A. crassiflora* corroboram com o avaliado por Roesler et al. (2006) que identificaram compostos fenólicos nos extratos etanólico e aquoso na polpa, semente, e casca de *A. crassiflora*. Flavonoides foram verificados na polpa e casca do araticum (Arruda et al., 2018).

3.1.2 Determinação de flavonoides totais (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Os perfis cromatográficos por HPLC dos extratos de acetato de etila das folhas e polpa de *A. crassiflora* e *A. cacans* (Figuras 1.1 1.3 1.5 e 1.7) foram realizados com auxílio do detector PAD com varredura na faixa espectral de 200-600 nm, obteve-se espectros na região UV. Foram observados picos com bandas de absorção típicos de flavonoides, que apresentam duas bandas, uma com máximo de comprimento de onda de 240-290 nm, e a outra com máximo de comprimento de 300-390nm, atribuída ao anel-B, apresentando maior incidência do grupo das flavonas e flavonóis.

3.1.2.1 Perfis cromatográficos de folha e polpa de *Annona crassiflora*

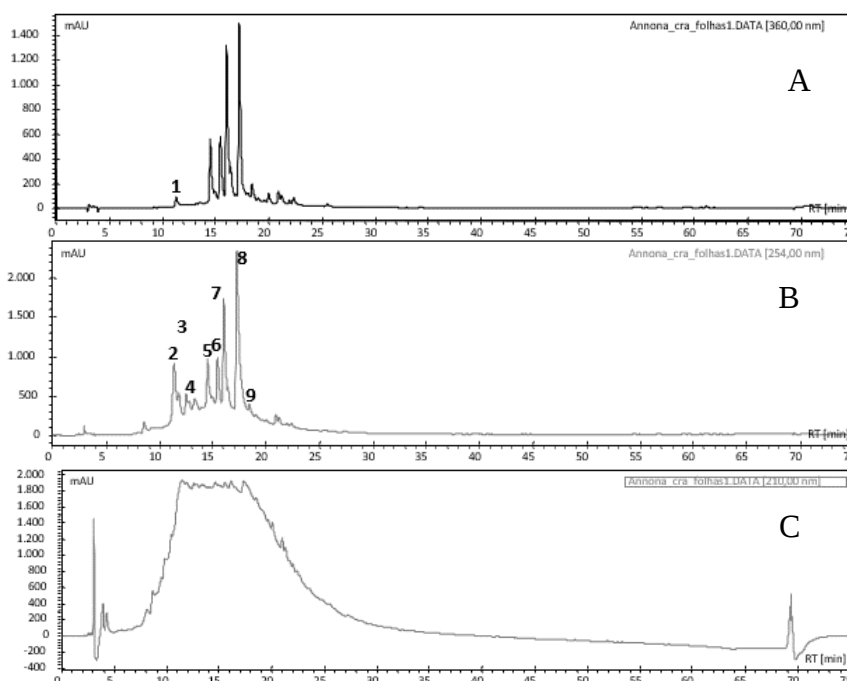


FIGURA 1.1 Perfil cromatográfico do extrato de acetato de etila da folha de *A. crassiflora* obtida por HPLC-PAD. (A) Perfil cromatográfico obtido com $\lambda=360$ nm (B) Perfil cromatográfico com $\lambda=245$ nm (C) Perfil cromatográfico com $\lambda=210$ nm. Sistema de eluição: ACN (A) e H₂O (B) acidificados (0,1 % Ác. Fórmico). Gradiente exploratório: 5-100 % de A em B em 60 min. Coluna Phenomenex C18 (250 x 4,6mm i.d. 5 μ m), fluxo 1,0 mL Volume de injeção: 20 μ L. Forno coluna: 40° C.

Nas folhas de *A. crassiflora* (Figura 1.2) foram identificados picos de possíveis catequinas, com absorção em 278 nm (1,2,3 e 4), e picos com absorção na região de flavonas e flavonóis, que tem por característica apresentar a banda II com absorção em 240-280 nm e banda I de 300-380 nm (Mabry et al.,1970). Nos picos monitorados, os espectros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9 apresentaram perfis de espectros semelhantes ao de flavanonas, que apresentam a banda II com pico de absorção entre 270-295 nm.

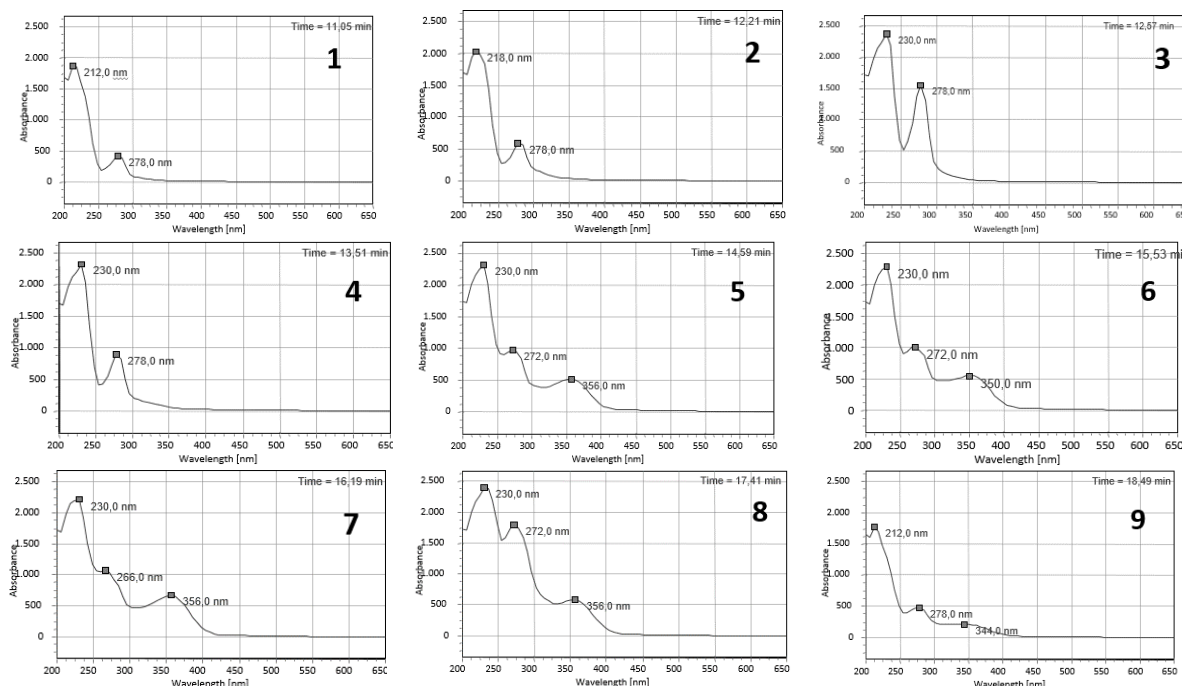


FIGURA 1.2 Espectros de banda de absorção máxima UV identificados para flavonoides na folha de *A. crassiflora*.

Os espectros com picos de absorção para possíveis flavonoides corroboram com as avaliações feitas *in vitro* para análise quantitativa de fenóis e flavonoides dos extratos de folha e polpa de *A. crassiflora*, que apresentaram resultados promissores na análise quantitativa.

Foi relatado por Lage et al. (2014) o isolamento de flavonóides como quercetina, kaempferol e epicatequina nas folhas de *A. crassiflora*. Os flavonoides podem ter diferentes aplicações farmacologicamente ativas, já foi verificada, atividade antimalárica de frações enriquecidas de flavonoides nas folhas desta espécie (Pimenta et al., 2014). A análise LC-ESI-MS / MS da casca de *A. crassiflora* mostrou a presença de vários componentes bioativos, como ácido cítrico clorogênico, catequina, procianidinas, e kaempferol, que podem ser associados a todas essas atividades biológicas verificadas *in vitro* (Justino et al., 2016).

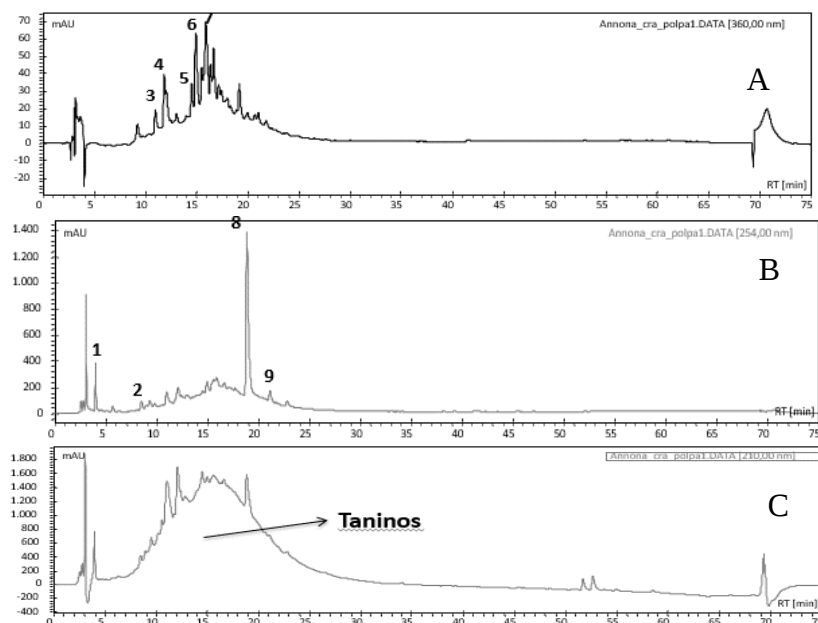


FIGURA 1.3 Perfil cromatográfico do extrato de acetato de etila da polpa de *A. crassiflora* obtida por HPLC-PAD. **(A)** Perfil cromatográfico obtido com $\lambda=360$ nm **(B)** Perfil cromatográfico com $\lambda=245$ nm **(C)** Perfil cromatográfico com $\lambda=210$ nm. Sistema de eluição: ACN (A) e H_2O (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.

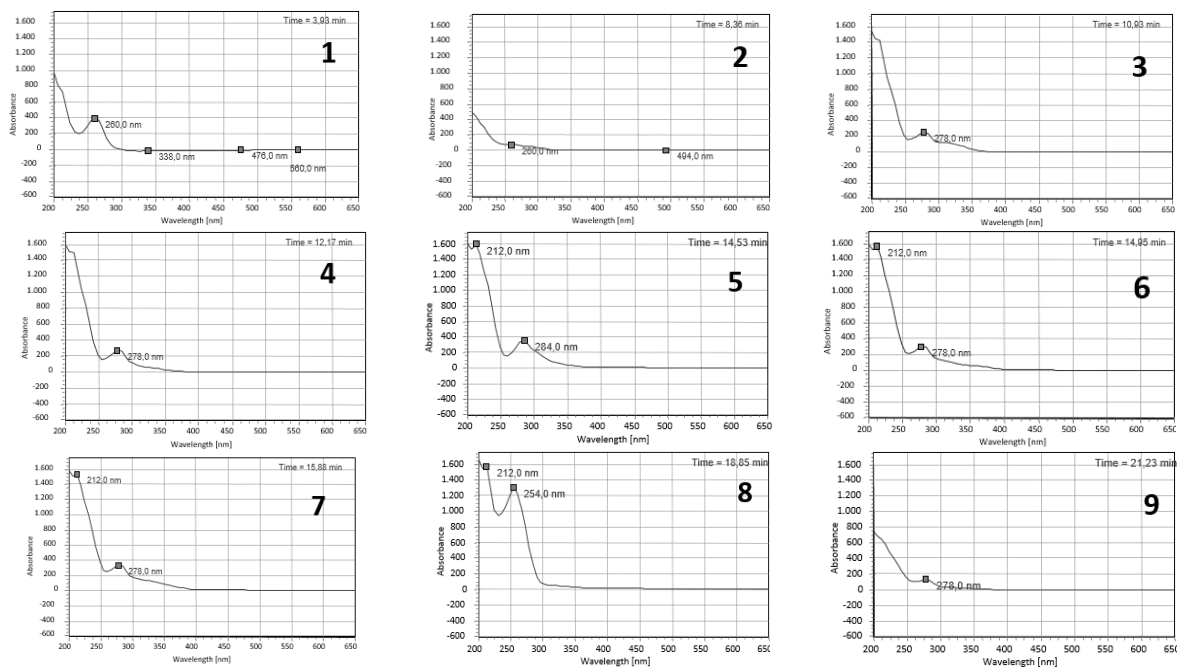


FIGURA 1.4 Espectros de banda de absorção máxima UV identificados para flavonoides na polpa de *A. crassiflora*.

Foi identificado uma área de incidência de taninos na polpa de *A. crassiflora* (Figura 1.3), possivelmente devido ao grau de maturação do fruto analisado.

Na polpa de *A. crassiflora* foram identificados 9 picos relacionados a flavonoides na Figura 1.4, o pico 2, com pico de absorção em 260 nm pode ser considerado um pico característico das isoflavonas. Arruda et al. (2018) caracterizou e quantificou cerca de dez compostos fenólicos em diferentes partes do fruto do araticum, catequina e epicatequina foram os principais da polpa e casca do araticum. Na polpa e casca apresentam-se mais flavonoides, já na semente, são ácidos fenólicos, mas em geral os fenólicos se apresentam nas formas ligada e insolúvel em todas as partes (Arruda et al., 2018).

3.1.2.2 Perfis cromatográficos de folha e polpa de *Annona cacans*

Existem poucos relatos de estudos na literatura sobre os compostos presentes em *A. cacans*, sendo portanto, as primeiras avaliações da espécie quanto a sua composição, levando em consideração os importantes compostos de interesse biológico encontrados em outras espécies do gênero *Annona*.

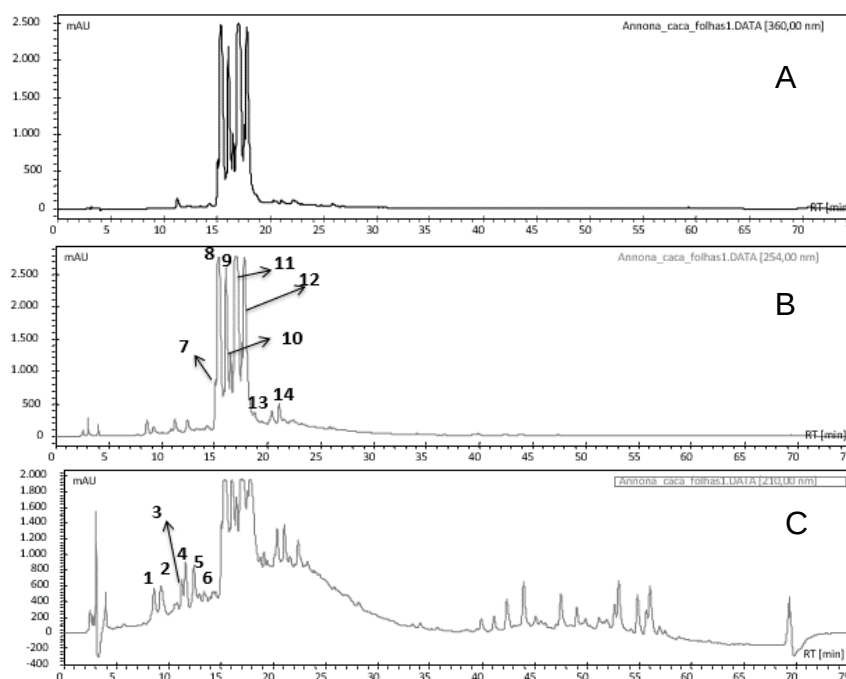


FIGURA 1.5 Perfil cromatográfico do extrato de acetato de etila da folha de *A. cacans* obtida por HPLC-PAD. **(A)** Perfil cromatográfico obtido com $\lambda=360$ nm **(B)** Perfil cromatográfico com $\lambda=245$ nm **(C)** Perfil cromatográfico com $\lambda=210$ nm. Sistema de eluição: ACN (A) e H₂O (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.

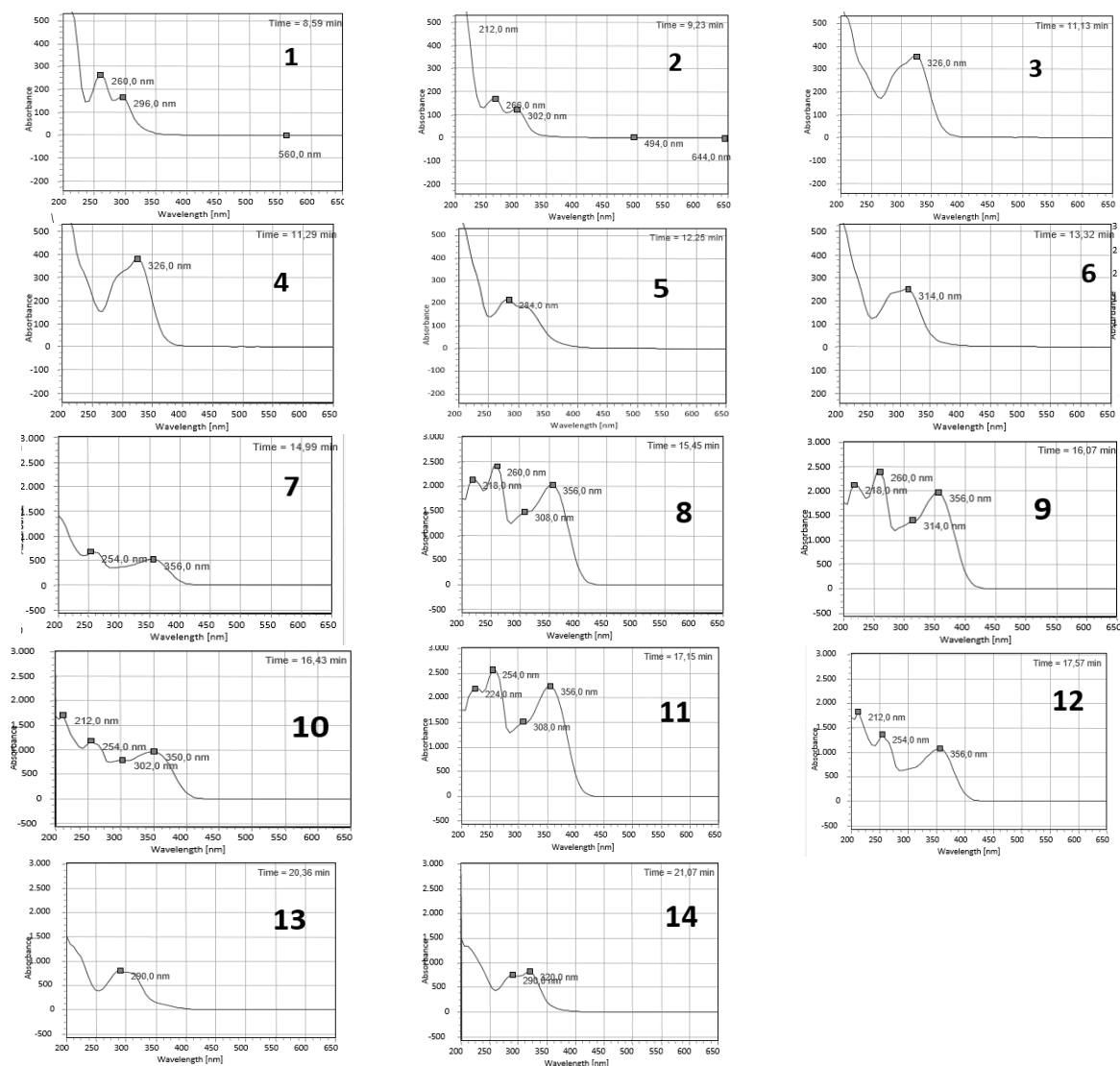


FIGURA 1.6 Espectros de banda de absorção máxima UV identificados para flavonoides na folha de *A. cacans*.

A folha de *A. cacans* também apresentou picos com duas bandas de absorção, sendo uma com incidência na região de 240-280, e outra em 300-380, como os picos 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 14, sempre com a segunda banda mais pronunciada, o que é característicos de flavonas e flavonóis. A quercetina tem por característica apresentar absorção banda I na região de 352-385 nm, padrão esse que pode ser observado nos picos encontrados na figura 1.6.

Os resultados apresentados no presente trabalho consitutum uma das primeiras avaliações para a espécie *Annona cacans* quanto a sua composição fitoquímica para avaliação de substâncias com interesse biológico.

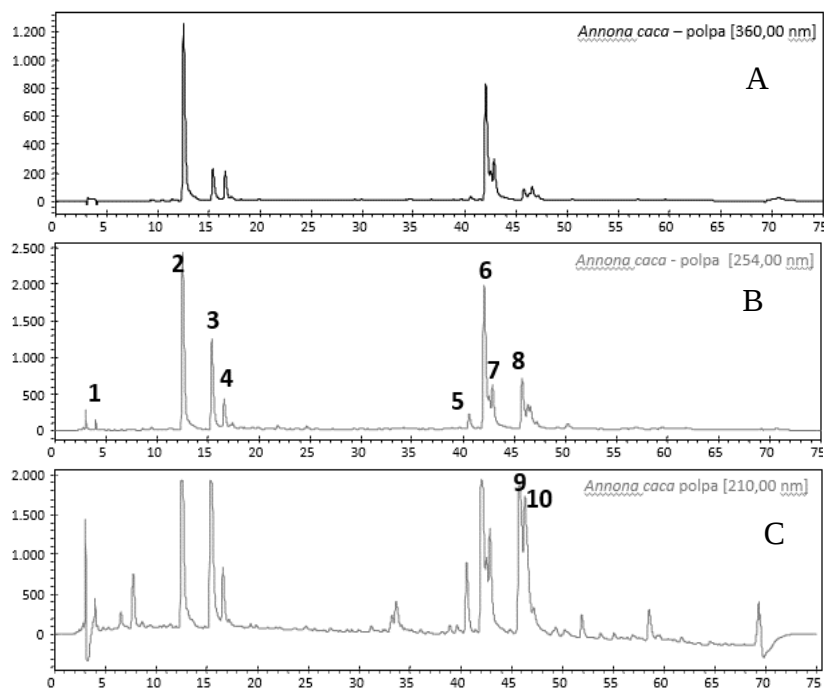


FIGURA 1.7 Perfil cromatográfico do extrato de acetato de etila da polpa de *A. cacaens* obtida por HPLC-PAD. **(A)** Perfil cromatográfico obtido com $\lambda=360$ nm **(B)** Perfil cromatográfico com $\lambda=245$ nm **(C)** Perfil cromatográfico com $\lambda=210$ nm. Sistema de eluição: ACN (A) e H₂O (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.

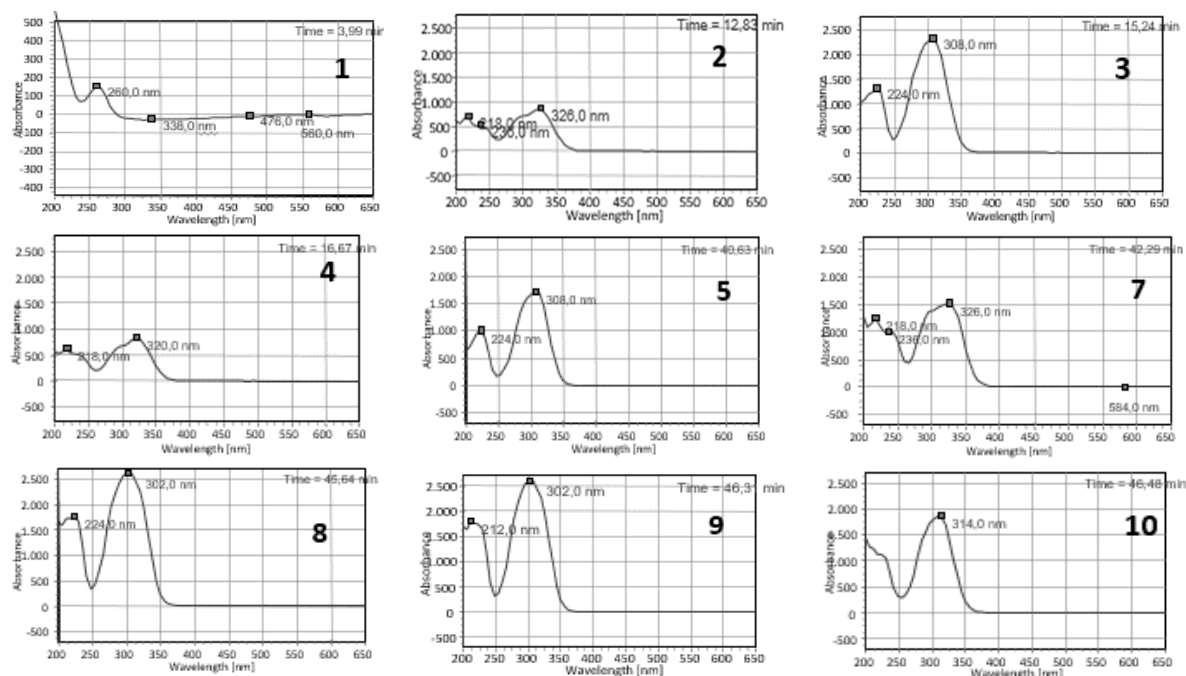


FIGURA 1.8 Espectros de banda de absorção máxima UV identificados para flavonoides na polpa de *A. cacaens*.

Na polpa de *A. cacans* foram identificados 9 possíveis flavonoides (Figura 1.8). Nas folhas, foram observados picos com absorbância em 260 nm, que indicam possíveis isoflavonas (Figura 1.6).

3.1.3 Determinação do conteúdo de açúcares totais

Na tabela 1.2 estão apresentados os resultados quanto a açúcares solúveis totais encontrados nas folhas de *A. crassiflora* e *A. cacans*, evidenciando grande quantidade e corroborando com a grande quantidade de açúcares encontrados nas análises cromatográficas.

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

	mg/g
<i>A. cacans</i>	128.42
<i>A. crassiflora</i>	50.12

3.1.4 Cromatografia à gas acoplada à espectrometria de massas CG-MS

Os compostos das folhas e polpa de *A. crassiflora* e *A. cacans* foram identificados em comparação de dados com a biblioteca NIST e estão listados nas tabelas em anexo. Em *A. crassiflora* foram identificados na biblioteca 97 compostos encontrados pela análise de Cromatografia Gasosa (Anexo 1 e 2). Já em *A. cacans*, foram mais de 250 compostos.

Os compostos se apresentam numerados de acordo com a tabela no Anexo 1 e 2. A figura 1.9 representa a análise do componente principal (PCA) identificados nas folhas e polpa de *A. crassiflora* e *A. cacans* de acordo com a classe dos compostos identificados. Um grande número de pontos se encontra na região negativa, indicando baixa incidência da classe de compostos.

Foi verificado um grande agrupamento de pontos nas figuras 1.9 (A) e (B), indicando similaridade entre a composição da polpa e folha das duas espécies. Os compostos que aparecem na região negativa possuem baixa concentração comparados uns aos outros. Quanto mais longe da linha de zero o composto aparece, maior a sua incidência da amostra avaliada.

De acordo com análise da biblioteca utilizada para comparação dos dados obtidos, os compostos identificados em *A. crassiflora* como similares foram sendo o composto -[(2-{3,4-Bis[(trimethylsilyl)oxy]phenyl}-3,5-bis[(trimethylsilyl)oxy]-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl)oxy](trimethyl)silane, (9) um isômero de Catequina, teve 31,46 % de porcentagem de área na folha, e 0,47 % na polpa, foi relacionado outra Catequina (42) como sendo 13,46 % da área total de compostos na folha; um composto possível de ser Quercetina (92) obteve 12,4 % do total nas folhas (Anexo I)

A análise indicou a possível identificação de vários compostos flavonoidicos, que vem de encontro com os outros métodos de avaliação realizados em *A. crassiflora*. Além destes foram identificados também grande quantidade de açucars, como Glucopiranose, Frutose e Ribose, o que corrobora com a análise de açucars totais realizada.

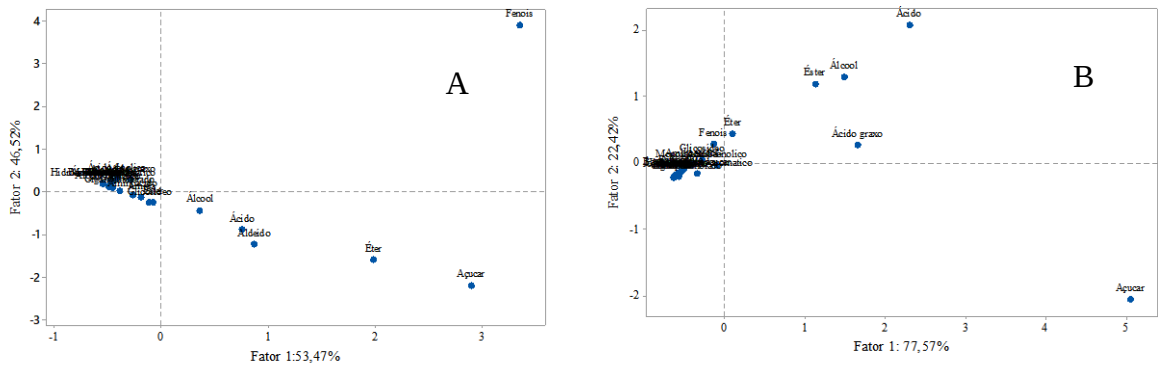


FIGURA 1.9 Componentes principais (PCA) da folha e polpa de *Annona crassiflora* (A) e *Annona cacans* (B) de acordo com a classe dos compostos.

Em *A. Cacans* os compostos que tiveram maior incidência foram os açucars (Anexo II) Talose com 10,69 % na folha e 0,52 na polpa, Sucrose 12,2 % folha e 0,78 polpa, e Talose, 10,69 na folha e 0,52 %. Outra grande incidência nos extratos foram os ácidos, como por exemplo o ácido octadenoico, que representou 7,12 % da área total de compostos identificados na polpa, e o ácido caféico com 2,55 na polpa e 1,11 na folha.

3.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

Os resultados das análises antioxidantes dos extratos de polpa e folha de *Annona crassiflora* e *Annona cacans* estão apresentados na Tabela 1.3.

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*.

		DPPH (%)	EC50	FRAP	TBARS	NO
<i>Annona crassiflora</i>	POLPA	43.63±3.95a	590.47	188.08±9.34	42.92±2.09a	5.42
	FOLHA	81.93±0.89b	111.76	68.88±3.22	64.57±2.09b	6.58
<i>Annona cacans</i>	POLPA	33.42±5.21c	761.20	158.40±7.71	73.29±2.69c	6.78
	FOLHA	28.08±2.98c	830.54	672.13±1.17	50.53±1.79d	6.34
Ácido Gálico		72.76±1.11d	43.81		-	
Trolox		-			73.85±3.64c	

DPPH: extratos: 500 µg/mL, ácido gálico 60 µg/mL; TBARS: extratos e trolox 100 µg/mL NO: 500 µg/mL expresso µmol/mL de Nitrito

3.2.1 DPPH

As substâncias antioxidantes presentes nos extratos reagem com o DPPH e converte-o em 2,2-difenil-1-picril hidrazina, o grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato (Roesler et al., 2007). Um extrato que apresenta alto potencial em sequestrar radicais livres possui baixo valor de EC50, ou seja, de inibir a oxidação do radical em 50%.

Para a avaliação da porcentagem de atividade sequestradora do radical DPPH foram analisados os resultados dos extratos em diferentes concentrações. Em *A. crassiflora* (Tabela 1) os extratos da polpa demonstraram atividade antioxidante significativa a partir da concentração de 500 µg/g de extrato seco, e EC50, que é a quantidade mínima para inibição de 50% da atividade no valor de 590.47, a folha, com EC50 de 111.76, foi o extrato que apresentou melhor resultado entre as espécies testadas.

O extrato da folha de *A. crassiflora* já foi avaliado pelo método de DPPH por Silva et al. (2016) apresentando ótimos resultados. *A. cacas* apresentou como resultados para a polpa, EC50 de 761.20 e para a folha 830.54.

3.2.2 Poder de redução do Ferro (FRAP)

Para *A. crassiflora*, a polpa apresentou 186,08 µMET/g de extrato, na concentração de 1000 µg/mL, já a folha, já na concentração de 50µg/mL apresentou 68,88. No estudo feito por Justino et al. (2016), que realizaram análises na casca de *A. crassiflora*, a fração de acetato de etila apresentou maior potencial diante do teste FRAP, perdendo apenas para a fração de butanol. *A. cacas* apresentou atividade tanto para polpa quanto para folha, na concentração de 500 µg/mL, sendo 158,40 e 672,13 µMET/g de extrato, respectivamente.

3.2.3 Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)

O teste de TBARS avalia a inibição de peroxidação lipídica em sistemas biológicos. Os extratos da folha e polpa, bem como do padrão antioxidante Trolox, foram avaliados na concentração de 250 µg/mL. Foi possível observar que a maior atividade inibidora da peroxidação lipídica foi promovida pelo extrato da polpa de *A. cacas* (79.9 %) Já para *A. crassiflora* os resultados para polpa e folha foram 57.2 % e 69.6.57 %, respectivamente. Sendo estes resultados próximos do controle positivo Trolox (79.1 %).

No processo oxidativo, ocorre a doação de um átomo de hidrogênio a partir de uma cadeia de ácidos graxos insaturados de fosfolipídios da membrana, dando origem ao processo de peroxidação lipídica onde são gerados peróxidos lipídicos e peróxidos cíclicos, que em última análise são fragmentos de aldeídos combinados como malonaldeído (Sreelatha e Padma, 2009).

Os extratos das Annonaceas testadas inibiram a quantidade de TBARS gerado pelo meio reacional AAPH, indicando um efeito protetor contra a peroxidação lipídica. Estudos realizados por Roesler (2011) demonstraram atividade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica *in vivo* (TBARS) para extratos obtidos de sementes e cascas de *A. crassiflora*.

3.2.4 Sequestro do NO

O radical nitrito em excesso pode estar envolvido no desenvolvimento de inúmeras patologias, portanto, se dá necessária a busca por substâncias capazes de sequestrar, ou seja, reduzir esse radical (Santana et al., 2013).

Na Tabela 1.3 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante pelo método sequestro do NO para os extratos na concentração de 500 µg/mL. O maior resultado foi encontrado para o extrato da polpa de *A. cacans*, com 6.78 µmol/mL de Nitrito. E o menor valor encontrado na polpa de *A. crassiflora* (5.42 µmol/mL de Nitrito).

2.1.5 Método Hemolítico

Para análise da atividade antioxidante pelo método hemolítico foi realizada a avaliação dos extratos em diferentes concentrações (Figuras 1.10 e 1.11). De acordo com os resultados, é possível observar que os extratos apresentaram potencial para sequestrar o radical livre e impossibilitar a ação hemolítica do AAPH para todas as concentrações avaliadas e seguiram uma tendência de concentração/dependente, menos em *A. cacans*. O controle positivo mostra a ocorrência de hemólise total nas amostras.

O melhor resultado para as folhas de *A. crassiflora* (Figura 1.10) foi observado na 5ª hora do tratamento com a concentração de 50 µg/mL.

Foi observado que na 6ª hora o extrato da polpa de *A. crassiflora* inibiu a hemólise em todas as concentrações, a concentração de 50 µg/mL apresentou uma atividade dose-resposta, onde a atividade antioxidante aumenta gradativamente conforme as horas, e com o melhor resultado, sendo que na 6ª hora, as amostras que foram tratadas com essa concentração de extrato, sofreram somente 4,4% de hemólise.

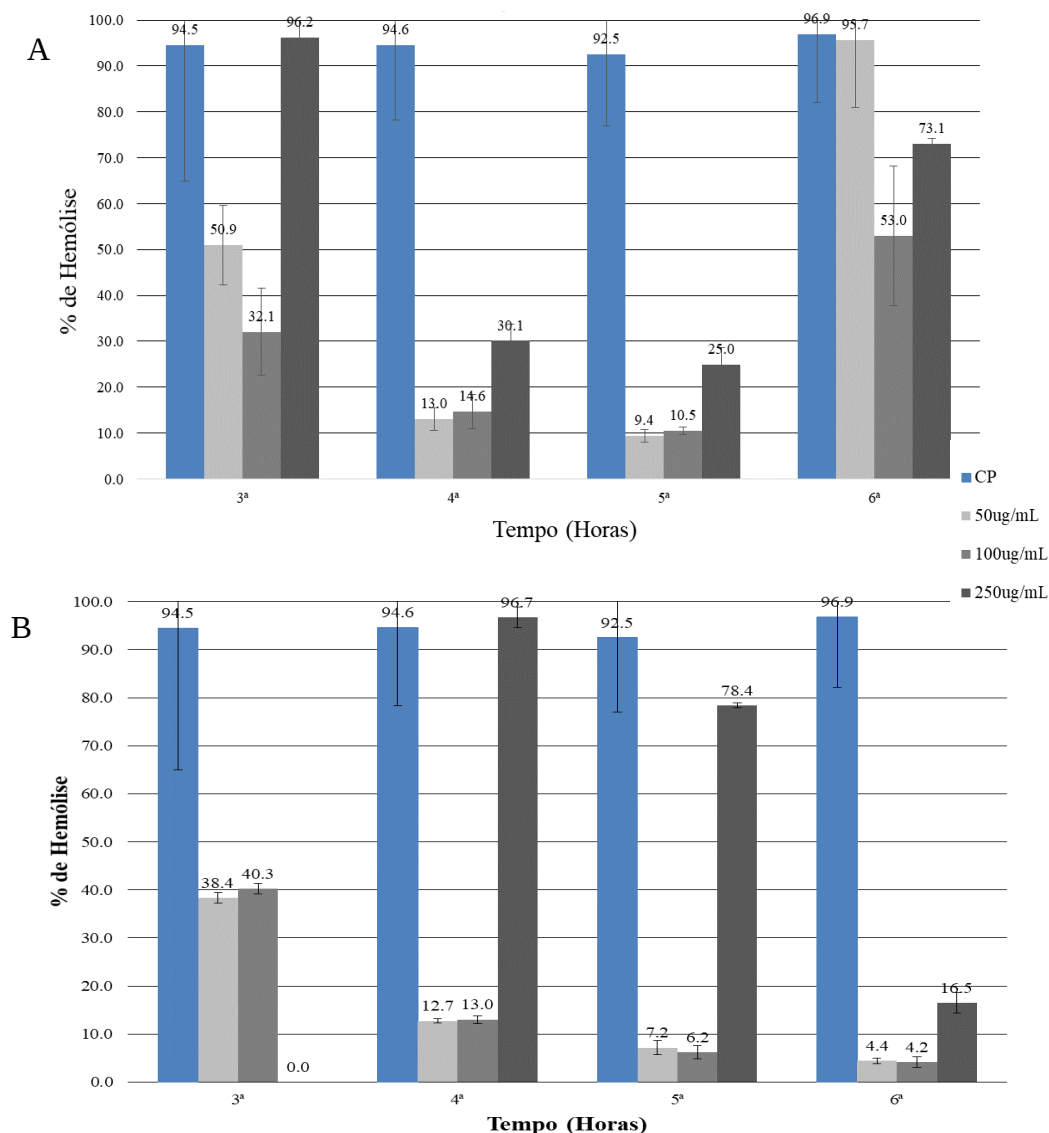


FIGURA 1.10 Atividade antioxidante pelo método de hemólise do extrato da folha (A) e polpa (B) de *A. crassiflora* durante 6 horas de incubação e mensurada a 540nm em espectrofotômetro

Em *A. cacas* os melhores resultados na polpa foram na concentração de 50µg/mL, também foi observada uma tendência dose-resposta na atividade desse extrato, atingindo um pico na 6ª hora, deixando ocorrer apenas 8,1 % de hemólise (Figura 1.11).

Sabe-se que o reagente AAPH se decompõe a 37° C em solução aquosa e gera radicais alquila que na presença do oxigênio são convertidos no radical peroxila correspondente, e esses radicais peroxila induzem a peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas dos eritrócitos levando a peroxidação lipídica (Banerjee et al., 2008).

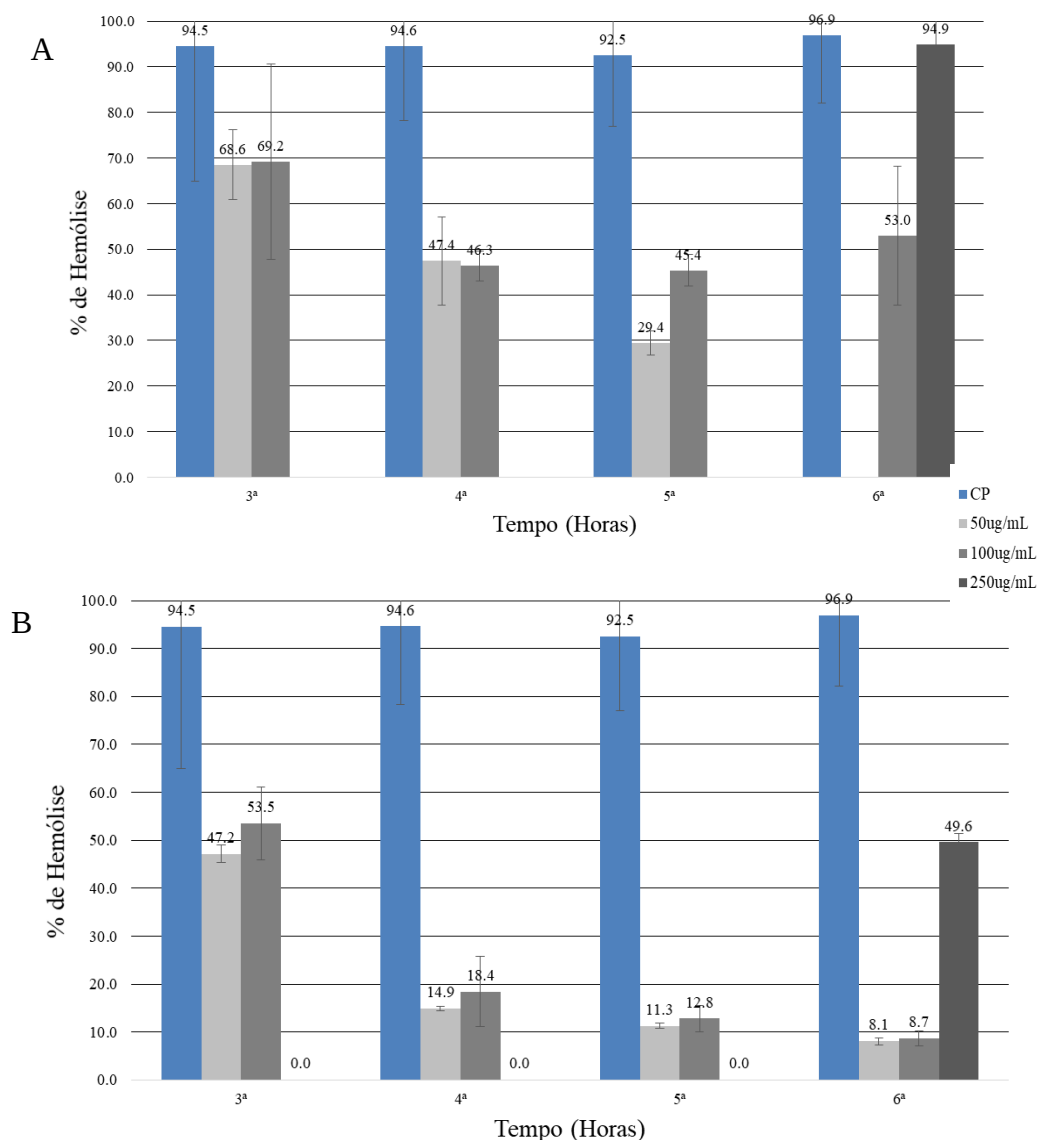


FIGURA 1.11 Atividade antioxidante pelo método de hemólise do extrato da folha (A) e polpa (B) de *A. cacans* durante 6 horas de incubação e mensurada a 540nm em espectrofotômetro

As folhas de *A. cacans* também apresentaram atividade contra a hemólise, sendo a mais significativa, a de 50 µg/mL, que na 6ª hora inibiu completamente a formação de hemólise na amostra Figura 1.11 (A). Foi observado que em ambos os extratos, polpa e folha, de *A. crassiflora* e *A. cacans*, ocorreu impedimento da hemólise nas amostras avaliadas, sendo sempre a melhor atividade verificada na concentração mais baixa analisada (50 µg/mL), sendo um resultado promissor para emprego do extrato na busca por compostos antioxidantes.

O extrato etanólico das folhas já foi avaliado como antimicrobianos, antioxidantes e larvicida e também expressou atividades antioxidante (Couto e Canniatti-Brazaca, 2010). Frações fenólicas de *A. crassiflora* apresentaram atividade sequestradora contra DPPH, ABTS e radicais peroxil (Arruda et al., 2018).

4 CONCLUSÃO

Foram caracterizadas as polpas e folha de *A. crassiflora* e *A. cacans*, e identificados diversos compostos que possuem potencial para aplicação em diferentes áreas de estudo, entre eles Catequina, Quercetina, ácidos fenólicos.

Foi observada uma grande quantidade de açúcares na composição de ambas as espécies, bem como verificada grande quantidade quando analisado o teor de açúcares totais, o que leva a serem interessantes do ponto de vista alimentar.

A. crassiflora e *A. cacans* apresentaram alto teor de fenóis e flavonoides totais, e quantidade representativa de atividade antioxidante por diferentes mecanismos de ação, verificada pelos diferentes métodos aplicados no trabalho.

REFERÊNCIAS

- 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.
- Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200, 1958.
- Cória-Téllez, V., Montalvo, Gonzalez, E., Yahia, E.M., Obledo-Vázquez, E.N. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. Arabian Journal of Chemistry, 11, 662–691, 2018.
- Costa, D. A.; Oliveira, G. A. L.; Sousa, D. P.; Freitas, R. M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 33(4), 567-575, 2012.
- Couto, M.A.L., Canniatti-Brazaca S., G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 30:15–19, 2010.
- Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e, método de sequestro de radicais DPPH. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(2): 446-452, 2006.
- Dubois, M., Giles K., Hamilton, J.K.; Rebs, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and relates substances. Anal Chemistry, 28, 350-356, 1956.
- Ferreira, I. C. F. R . R.; Abreu, R. M.V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. Bioanálise, 2, 32-39, 2007.

Gómez, L.J., Gómez, N.A., Zpata, J.E., López-García, A.C.; Alegría, A. *In-vitro* antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red tilapia (*Oreochromis spp.*) viscera hydrolysates. Food Research International, 10, 52-61, 2019.

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.

Justino, A. B., Pereira, M. N., Vilela, D. D., Peixoto, L. G., Martins, M. M., Teixeira, R. R., Miranda, N.C., da Silva, N.M., Sousa, R.M.F., Espíndola, A.O. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. Bioorganic Chemistry, 69, 167–182, 2016.

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.

Lebouef, M.; Cavé, A.; Bhaumik, K.; Mukerjee, B.; Mukerjee, R. The phytochemistry of the Annonaceae Phytochemistry, 21(12), 2783–2813, 1982.

Lúcio, A. S. S. C., Almeida, J. R. G. da S., da-Cunha, E. V. L., Tavares, J. F., & Barbosa Filho, J. M. (2015). Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. The Alkaloids: Chemistry and Biology, 233–409.

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>>.

Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M. B. The Systematic identification of flavonoids. Ed. Springer. Berlin, 41-169, 1970.

Magalhães, A. S.; Silva, B. M.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Carvalho, M. Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. Food and Chemical Toxicology, 47, 1372–1377, 2009.

Marcocci, L., Maguire, J. J., Droy-Lafaix, M. T., Packer, L. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. Biochemical and Biophysical Research Communications, 201, 748-755, 1994.

Moita neto, J.M., Moita, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. Química Nova, 21(4), 467-469, 1998.

Pimenta, L.P.S., Garcia, G.M., Gonçalves, S.G.V., Dionísio, B.L., Braga, É.M., Mosqueira, V.C.F., 2014. In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. Nat. Prod. Res. 28, 1254–1259, 2014.

Roduan M.R.M., Hamid R.A., Kqueen C.Y., Mohtarrudin N., Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* in vitro, Journal of Herbal Medicine, 2018.

Roesler, R.; Malta, L.G.; Carrasco, L.C.; Pastore, G. Evaluation of the Antioxidant Properties of the Brazilian Cerrado Fruit *Annona crassiflora* (Araticum). *Journal of Food Science*, 71(2), 102-107, 2006.

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.

Roesler, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄ -induced liver damage in rats. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(1), 93-100, 2011.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jimenez, J.; Saura-Calixto, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em Frutas pelo métodos de redução do Ferro (FRAP). Comunicado técnico: EMBRAPA, Fortaleza, CE, 2006.

Sandeepa S.B., Vinod, V., Kamalinder K.S. Antipsoriatic potential of *Annona squamosa* seed oil: An *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Phytomedicine*. 54, 265-277, 2019.

Silva, M.A.; Rosa, C.P.; Bastos, R.G.; Silva, A.F.; Silva, G.A.; Marques, M.J.; Espuri, P.F. Triagem fitoquímica, atividade antioxidante e leishmanicida do extrato hidroetanólico 70% (v/v) e das frações obtidas de *Annona crassiflora* Mart. *Fitos*, 10, 375-547, 2016.

Sila, A., Bougatef, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10–26, 2016.

Sreelatha, S.; Padma, P.R. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 2009.

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

Valle, E. M. A., Malagutti, A. R., Mazo, L. H., Machado, S. A. S. Interação de íons cobre (II) com o flavonóide quercetina: um estudo espectroscópico e eletroquímico. In *Resumos*. São Paulo: SBQ, 2007.

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

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

Anexo 1

Compostos identificados por Cromatografia Gasosa (GC/MS) dos extratos de folha e polpa de *Annona crassiflora* em % de área

	COMPOSTO	F	P
1	(1-butoxybutoxy)trimethylsilane	0	1.05
2	(R)-3-Hydroxybutyric acid, 2TMS derivative	0	0.15
3	.alpha.-D-Glucopyranose, 2-amino-3,6-anhydro-2-deoxy-1,4-bis-O-(trimethylsilyl)-	0	0.2
4	.alpha.-L-Galactopyranoside, methyl 6-deoxy-, (R,R,R,S,S)-, 3TMS derivative	0.46	0
5	.beta.-D-(+)-Talopyranose, 5TMS derivative	0	2.3
6	.beta.-D-Galactopyranoside, methyl 2,3,6-tris-O-(trimethylsilyl)-, acetate	0	0.92
7	.beta.-D-Glucopyranose, 5TMS derivative	0	2.86
8	.beta.-D-Glucopyranose, 6-O-methyl-1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	0	5.35
9	[(2-{3,4-Bis[(trimethylsilyl)oxy]phenyl}-3,5-bis[(trimethylsilyl)oxy]-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl)oxy](trimethyl)silane	31.46	0.47
10	1,2,3-Butanetriol, 3TMS derivative	0	1.34
11	1,2,4-Butanetriol, 3TMS derivative	0	0.6
12	1,3-Dioxane, 2,2-dimethyl-5-trimethylsilyloxy-	0	1.95
13	1,3-Propanediol, 2TMS derivative	0.33	0
14	1,4-Dioxane-2,5-diol, 2TMS derivative	0	4.94
15	1-[(Trimethylsilyl)oxy]propan-2-ol	0	0.14
16	1-Deoxy-d-arabitol	0	0.32
17	2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanol bis(trimethylsilyl) ether	0.29	0
18	2,3-Butanediol, 2TMS derivative	0	0.21
19	2-Hexenoic acid, (E)-, TMS derivative	0.07	0
20	2-Hydroxyisocaproic acid, 2TMS derivative	0.13	0
21	2-Oxovaleric acid, TBDMS derivative	0	0.85
22	3,5-Dimethoxymandelic amide, di-TMS	0.35	0
23	3,7,11,14,18-Pentaoxa-2,19-disilaecosane, 2,2,19,19-tetramethyl-	0	0.73
24	3-.alpha.-Mannobiose, octakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)	0.31	0
25	3-Methyl-2-furoic acid, TMS derivative	0	0.62
26	4-(Methoxycarbonyl)phenol, TMS derivative	0	0.16
27	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	0	0.11
28	5-Hydroxymethylfurfural	0	1.02
29	6-Dimethyl(trimethylsilyl)silyloxytetradecane	0	0.06
30	6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	0	0.24
31	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	0	0.08
32	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative	0.57	0
33	9-Octadecenamide, (Z)-	0	1.89
34	9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative	0	0.45
35	9-Octadecenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester, (E,E,E)-	0	0.3
36	acetic acid, 2-[[2-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]thio]-, trimethylsilyl ester	0	0.55
37	Acetin, bis-1,3-trimethylsilyl ether	0	1.03
38	Acetoin, TMS derivative	0	0.16
39	Allylamine, 2TMS derivative	0.18	0
40	Benzyl alcohol, TMS derivative	0.06	0

Capítulo 1

41	Butoxytriglycol, TMS derivative	0	1.98
42	Catechine, (2R-cis)-, 5TMS derivative	13.56	0
43	Chlorogenic acid (6TMS)	1.94	0
44	D-(-)-Fructofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)	0	0.31
45	D-(-)-Fructofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)	0	0.18
46	D-(-)-Fructose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (anti)	2.81	4.94
47	D-(-)-Tagatose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (anti)	0	1.18
48	D-(-)-Tagatose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	0	0.14
49	D-(+)-Galactopyranose, 5TMS derivative (isomer 1)	0.33	0
50	D-(+)-Glucuronic acid .gamma.-lactone, tris(trimethylsilyl) ether, methyloxime (anti)	0	3.11
51	D-(+)-Glucuronic acid .gamma.-lactone, tris(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	0	1.21
52	D-(+)-Talose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	2.05	0
53	D-(+)-Turanose, octakis(trimethylsilyl) ether	0.16	0
54	D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime	1.2	0
55	d-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime, (1E)-	0	1.57
56	d-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime, (1Z)-	0.36	0
57	Disiloxane, hexamethyl-	0.29	0
58	Divinyl sulfide	0	0.88
59	D-Mannose, 5TMS derivative	0.19	0
60	D-Psicofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)	0	0.2
61	d-Ribose, 2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime	0	4.19
62	Ethanolamine, 3TMS derivative	0.16	0
63	Gluconic acid, 2-methoxime, tetra(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	0	1.04
64	Glucose, 5TMS derivative	1.04	0
65	Glycerol, 1-tert-butyl 3-trimethylsilyl ether	0	0.9
66	Glycerol, 3TMS derivative	1.3	0
67	Glycolic acid, 2TMS derivative	0	0.12
68	Gulonic acid, .gamma.-lactone, 4TMS derivavative	0.22	0
69	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.2	0
70	Hydracrylic acid, 2TMS derivative	0	0.07
71	L-(-)-Sorbofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether	0	0.82
72	L-(-)-Sorbose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (anti)	0	1.41
73	L-(+)-Threose, tris(trimethylsilyl) ether, ethyloxime (isomer 1)	0	0.55
74	L-5-Oxoproline, , 2TMS derivative	0.24	0
75	Lactic Acid, 2TMS derivative	0.24	0.22
76	Lanreline	1.06	0
77	L-Aspartic acid, 2TMS derivative	0	1.14
78	L-Serine, 2TMS derivative	0	0.33
79	L-Threonic acid, tris(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyl ester	0.22	0
80	Melibiose, octakis(trimethylsilyl)-	0.45	0
81	Methyl .alpha.-D-glucofuranoside, 4TMS derivative	0	1.06
82	Methyl .alpha.-Lyxofuranoside, 3TMS derivative	0	1.38
83	Methyl 3,4-dihydroxybenzoate, 2TMS derivative	0.11	0
84	Methylparaben	0	0.28
85	Myo-Inositol, 6TMS derivative	3.92	0.17
86	Oleamide, TMS derivative	1.51	0

Capítulo 1

87	Oxalic acid, 2TMS derivative	0.36	0
88	Palmitic Acid, TMS derivative	0.43	0
89	Pentasiloxane, dodecamethyl-	0.29	0.1
90	Phytol, TMS derivative	0.45	0
91	Protocatechoic acid, 3TMS derivative	0.63	0
92	Quercetin (5TMS)	12.4	0
93	Shikimic acid (4TMS)	0.18	0
94	Silane, trimethyl-3-penten-2-yl-, trans	0.5	0
95	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	0	2.08
96	Thymidine, 2TMS derivative	0	0.32
97	Uridine, 3TMS derivative	0	0.19

Anexo 2

Compostos identificados por Cromatografia Gasosa (GC/MS) dos extratos de folha e polpa de *Annona cacans* em % de área

	COMPOSTO	F	P
1	1-Dimethyl(dichloromethyl)silyloxypropane	0.02	0
2	(3-Hydroxyphenyl)butyric acid, 2TMS derivative	0.72	0
3	(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester	0	0.21
4	(R)-3-Hydroxybutyric acid, 2TMS derivative	0	0.07
5	.alpha.-D-Lactose, 8TMS derivative	0	0.11
6	.alpha.-L-Galactofuranose, 6-deoxy-1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	1.3	0
7	.alpha.-L-Galactopyranoside, methyl 6-deoxy-, (R,R,R,S,S)-, 3TMS derivative	0.51	0
8	.alpha.-Linolenic acid, TMS derivative	2.27	0
9	.beta.-D-Galactofuranose, 1,2,3,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-	0	0.05
10	.beta.-D-Glucopyranose, 6-O-methyl-1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	0	0.09
11	.beta.-Gentiobiose, octakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (isomer 2)	0.12	0
12	.beta.-Lactose, 8TMS derivative	0.19	0
13	.beta.-Lyxopyranose, 4TMS derivative	0	0.02
14	.beta.-Ocimene	0	0.02
15	[(2-{3,4-Bis[(trimethylsilyl)oxy]phenyl}-3,5-bis[(trimethylsilyl)oxy]-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl)oxy](trimethyl)silane	0.49	0
16	1-(2-Methoxy-1-methylethoxy)-2-propanol, TMS derivative	1.67	0.63
17	1,1,3,3,5,5-Hexamethyl-2-thia-1,3,5-trisilacyclohexane	0.19	0
18	1,12-Dodecanediol, 2TMS derivative	0.18	0
19	1,2,3-Butanetriol, 3TMS derivative	4.9	0.02
20	1,2,4-Butanetriol, 3TMS derivative	0.09	0
21	1,2,5,6-Hexanetetrol, tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	0.23	0
22	1,3-Dioxane, 2,2-dimethyl-5-trimethylsilyloxy-	0.04	0
23	1,3-Propanediol, 2TMS derivative	0	0.03
24	1,7-Di(3-ethylphenyl)-2,2,4,4,6,6-hexamethyl-1,3,5,7-tetraoxa-2,4,6-trisilaheptane	0.04	0
25	1-[1,7-Dicarba-closo-dodecaboran-(12)-1-yl]-D-glucopyranose, 4TMS derivative	0	0.06
26	10-Nonadecenoic acid, (Z)-, TMS derivative	0.07	0
27	11-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative	0.1	0.02
28	15-Hydroxy-7-oxodehydroabietic acid, trimethylsilyl ester, 15-trimethylsilyl ether	0.88	0
29	1-Deoxypentitol, 4TMS derivative	0	0.29
30	1-Linolenoylglycerol, 2TMS derivative	0.22	0
31	1-Monolinolein, 2TMS derivative	0.14	0
32	1-Monooleoylglycerol, 2TMS derivative	0	0.41
33	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	0	0.07
34	2,3,4,5-Tetrahydroxypentanoic acid-1,4-lactone, tris(trimethylsilyl)-	0.1	0
35	2,3-Dihydroxybenzoic acid, 3TMS derivative	0.1	0
36	2,3-Dimethyl-3-hydroxyglutaric acid, 3TMS derivative	0	0.05
37	2-.alpha.-Mannobiose, octakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (isomer 1)	0	0.07
38	2-Amino-2-deoxyhexose, (R,R,S,R)-, 4TMS derivative	0	0.08
39	2-Amino-2-deoxyhexose, 5TMS derivative	0.31	0

Capítulo 1

40	2-Bromosebacic acid, 2TMS derivative	0.16	0
41	2-Deoxy-D-ribose, tris(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyloxime (isomer 1)	0	0.2
42	2'-Deoxyribolactone, 2TMS derivative	0.17	0
43	2-Deoxyribose, 3TMS derivative	1.1	0.09
44	2-Hexanol, TMS derivative	0.03	0
45	2-Hexenoic acid, (E)-, TMS derivative	0.18	0
46	2-Hydroxy-3-methylbutyric acid, 2TMS derivative	0.08	0
47	2-Hydroxyisocaproic acid, 2TMS derivative	0.11	0
48	2-Methyl-1,3-butanediol, 2TMS derivative	0	0.09
49	2-Methyl-1,4-bis(trimethylsiloxy)butane	0.1	0
50	2-Methyl-3-buten-2-ol, TMS derivative	0.23	0
51	2-Methyl-3-oxovaleric acid, O,O'-bis(trimethylsilyl)-	0.19	0
52	2-Methylbutanoic acid, 3-(t-butyltrimethylsilyloxy)-, methyl ester	0.55	0
53	2-Methyloctanoic acid, TMS derivative	0.06	0
54	2-n-Propyl-3-trimethylsilyloxy(trimethylsilyl)valerate	0	0.04
55	2-O-(2-(4-hydroxyphenyl)-ethyl)-D-glucopyranose, 5TMS	0	0.14
56	2-O-Glycerol-.alpha.-D-galactopyranoside, hexa-TMS	0.09	0
57	2-Oxiranemethanol, .alpha.,.alpha.-dimethyl-3-[1-(t-butyltrimethylsilyloxy)pentyl]-	0.1	0
58	2-Pyrrolidinone, TMS derivative	0.06	0
59	2-Trimethylsilyloxyheptanoic acid, trimethylsilyl ester	0.09	0
60	3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid, 3TMS derivative	0.1	0
61	3,6-Dioxo-2,4,5,7-tetrasilaoctane, 2,2,4,4,5,5,7,7-octamethyl-	0.08	0
62	3-.alpha.-Mannobiose, octakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)	0.15	0.02
63	3-Buten-2-one, 3-trimethylsilyloxy-	0.05	0
64	3-Butenoic acid, 3-(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester	4.21	0
65	3-Chloropropane-1,2-diol, bis(tert-butyltrimethylsilyl) ether	0	0.04
66	3-Deoxyhexitol, 5TMS derivative	0	0.27
67	3-Furanmethanol	0	0.01
68	3-hydroxy-3,7,11,15-tetramethylhexadecanoic acid, silylated	0.35	0
69	3-Hydroxyisovaleric acid, 2TMS derivative	0.03	0
70	3-Methylene-1,4-bis(trimethylsilyloxy) butane	0.69	0
71	3-Octenoic acid, TMS derivative	0.34	0
72	3-Phenyllactic acid, 2TMS derivative	0.19	0
73	3-Pyridinol, TMS derivative	0.01	0
74	3-Trimethylsilyloxyoctanoic acid, trimethylsilyl ester	0.03	0.15
75	4.beta.H,5.alpha.-Eremophil-1(10)-ene, 11-(trimethylsiloxy)-	0	0.11
76	4-Aminobutanoic acid, 3TMS derivative	0.05	0
77	4-Coumaric acid, 2TMS derivative	0.88	2.39
78	4-Hydroxy-3-methoxyphenylglycol, 3TMS derivative	0.11	0
79	4-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative	0.18	0
80	4-Methyl-1,2-bis(trimethylsilyloxy)pentane	0.13	0
81	5.beta.-Cholestane-3.alpha.,7.alpha.,12.alpha.,24.alpha.,25-pentol TMS	0.05	0.04
82	5-Methyluridine, 3TMS derivative	0.24	0
83	5-O-Coumaroyl-D-quinic acid, 5TMS	0.29	0
84	6-Hydroxyhexanoic acid, 2TMS derivative	0.12	0
85	7-Trimethylsilyloxyoctanoic acid, trimethylsilyl ester	0	0.25

Capítulo 1

86	9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-	0.04	0
87	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	0.15	0
88	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative	0.61	0.12
89	9-Hexadecenoic acid, (Z)-, TMS derivative	0	0.09
90	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	0	0.09
91	9-Octadecenamide, (Z)-	0.27	0
92	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	0	0.06
93	9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative	0	7.18
94	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	0	1.19
95	9-Tetradecenoic acid, (E)-, TMS derivative	0	0.29
96	Acenaphthylene, 1,2-bis(trimethylsilyloxy)-	0.36	0
97	Acetin, bis-1,2-trimethylsilyl ether	0.09	0.14
98	Acetin, bis-1,3-trimethylsilyl ether	0	0.1
99	Adenosine, 4TMS derivative	0	0.17
100	Adipic acid, 2TBDMS derivative	0.04	0
101	Allylamine, 2TMS derivative	0.12	0.02
102	Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	0	0.02
103	Arabino-Hexos-2-ulose, 3,4,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, bis(dimethyl acetal)	0	0.05
104	Azelaic acid, 2TMS derivative	0.03	0
105	Benzaldehyde, 3,4,5-trimethoxy-	0.04	0
106	Benzeneacetic acid, TMS derivative	0.02	0
107	Benzeneethanamine, 3-methoxy-N-[(pentafluorophenyl)methylene]-.beta.,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-	0.01	0
108	Benzoic Acid, TMS derivative	0.09	0
109	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.35	0
110	Butanedioic acid, 2TMS derivative	3.67	0.1
111	Butanoic acid, 2-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	0.22	0
112	Butoxytriglycol, TMS derivative	0.12	0
113	Caffeic acid, 3TMS derivative	1.11	2.55
114	Catechol, 2TMS derivative	0.43	0
115	Chlorogenic acid (6TMS)	0.52	0
116	Cinnamic acid, TMS derivative	0.15	0
117	Citric acid, 4TMS derivative	0	0.55
118	D-(-)-Fructofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)	0	0.16
119	D-(-)-Lyxofuranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether	0.25	0.07
120	D-(-)-Lyxose, tetrakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	0	0.06
121	D-(-)-Rhamnose, tetrakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (anti)	0	0.1
122	D-(-)-Ribofuranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)	0	0.05
123	D-(-)-Tagatofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)	2.11	0.44
124	D-(+)-Cellobiose, (isomer 1), 8TMS derivative	0.22	0.25
125	D-(+)-Cellobiose, (isomer 2), 8TMS derivative	0	0.24
126	D-(+)-Mannose, oxime (isomer 1), 6TMS derivative	0	0.13
127	D-(+)-Ribono-1,4-lactone, 3TMS derivative	0.03	0
128	D-(+)-Talose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	0.52	10.6 9
129	D-(+)-Turanose, octakis(trimethylsilyl) ether	0.72	0.16
130	D-(+)-Turanose, octakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (isomer 1)	0	0.06

Capítulo 1

131	D-Allose, oxime (isomer 1), 6TMS derivative	0	0.22
132	Decaethylene glycol, TMS derivative	0.09	0
133	Decanoic acid, TMS derivative	0.03	0.2
134	D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime	3.9	19.3 4
135	D-Fructose, 6-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.alpha.-D-glucopyranosyl]-1,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	0	0.06
136	D-Gluconic acid, 6TMS derivative	0	0.04
137	D-Glucopyranose, 5TMS derivative	0	3.85
138	Diethylene glycol, 2TMS derivative	0	0.06
139	Disiloxane, hexamethyl-	0.22	0.05
140	D-Lactose, (isomer 2), 8TMS derivative	0	0.05
141	D-Lactose, octakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (isomer 2)	0.06	0
142	Docosa-8,14-diyn-1,22-diol, (Z)-, 2TMS derivative	0.06	0
143	Dodecanoic acid, methyl ester	0	0.03
144	Dodecanoic acid, TMS derivative	0.2	0.98
145	D-Psicose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	0	0.06
146	D-Sorbitol, 6TMS derivative	0	0.75
147	Dulcitol, 6TMS derivative	0.13	0
148	Eicosanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester	0.05	0
149	Epimethendiol-diOTMS	0.16	0
150	Epizonarene	0	0.02
151	Erythrono-1,4-lactone, (Z)-, 2TMS derivative	0	0.09
152	Esculetin, 2TMS derivative	0.18	0
153	Ethanol, (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-, tris(trimethylsilyl)-	1.37	0
154	Ethanolamine, 3TMS derivative	0.17	0
155	Ferulic acid, 2TMS derivative	1.44	0
156	Gallic acid, 4TMS derivative	0.1	0
157	Genistein, O,O',O''-tri(trimethylsilyl)-	0.54	0
158	Geranyl oleate	0	0.07
159	Gluconolactone (3R,4S,5R,6R)-, 4TMS derivative	0.18	0.09
160	Glucose, 5TMS derivative	0.4	2.4
161	Glyceric acid, 3TMS derivative	0.16	0.07
162	Glycerol, 3TMS derivative	0	3.3
163	Glyceryl-glycoside TMS ether	0.29	0.02
164	Glycolic acid, 2TMS derivative	0	0.04
165	Heptadecanoic acid, TMS derivative	0.04	0
166	Heptalene, 7,7'-dihydro-6,6'-bis(trimethylsilyl)methyl-	0.08	0
167	Hexadecanoic acid, ethyl ester	0	0.03
168	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.28	0
169	Hexanedioic acid, 2TMS derivative	0	0.03
170	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	0.18	0
171	Hexanoic acid, 3-trimethylsilyloxy, trimethylsilyl ester	0.2	0.12
172	hexanoic acid, 6-[(trimethylsilyl)oxy]-, methyl ester	0	0.04
173	Hexanoic acid, TMS derivative	0.07	0.05
174	Homovanillyl alcohol, 2TMS derivative	0.45	0
175	Hydracrylic acid, 2TMS derivative	0	0.05

Capítulo 1

176	Hymexazole, tert-butyldimethylsilyl ether	0.16	0
177	Isoferulic acid, 2TMS derivative	0	0.02
178	Isorhamnetin (4TMS)	0.79	0
179	L-5-Oxoproline, , 2TMS derivative	0.18	0
180	Lactic Acid, 2TMS derivative	1.4	0.16
181	Lactose, 8TMS derivative	1.62	0
182	L-Aspartic acid, 3TMS derivative	0.11	0
183	L-Fucitol, 5TMS derivative	0	0.13
184	Linalool, TMS derivative	0	0.03
185	Linolool oxide, TMS derivative	0.17	0
186	L-Proline, 2TMS derivative	0.27	0.07
187	L-Proline, TMS derivative	0.18	0
188	L-Threitol, 4TMS derivative	0.55	0.11
189	L-Threonic acid, tris(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyl ester	0.09	0.07
190	L-Valine, 2TBDMS derivative	0.46	0.01
191	Malic acid 1-ethyl ester, 2TMS	0.07	0
192	Malic acid, 3TMS derivative	0.33	0.57
193	Malonic acid, bis(2-trimethylsilylethyl ester	0.17	0
194	Maltose, 8TMS derivative	0	0.05
195	Maltose, 8TMS derivative , isomer 1	0	0.12
196	Maltose, 8TMS derivative , isomer 2	0.14	0
197	Maltose, octakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (isomer 1)	0	0.56
198	Melibiose, octakis(trimethylsilyl)-	0.2	0
199	Methyl 18-oxidanyloctadeca-9,12-dienoate, TMS derivative	0.05	0
200	Methyl 2,4-dihydroxybenzoate, 2TMS derivative	0.14	0
201	Methyl 3,4-dihydroxybenzoate, 2TMS derivative	0.29	0
202	Methyl caffeate, 2TMS derivative	0.18	0
203	Methyl galactoside (1R,2S,3S,4R,5R)-, 4TMS derivative	0.3	0.12
204	Methyl galactoside (1S,2R,3S,4R,5R)-, 4TMS derivative	0.71	0.5
205	Methyl stearate	0.01	0
206	Methyl tetradecanoate	0	0.04
207	Methyl xylopyranoside, 3TMS derivative	0.08	0
208	Myo-Inositol, 6TMS derivative	1.19	0.74
209	Myristic acid, TMS derivative	0	0.65
210	Niacin, TMS derivative	0.05	0
211	Nonanoic acid, TMS derivative	0.03	0
212	Octanoic acid, TMS derivative	0.03	0.32
213	Oleamide, TMS derivative	1.03	0.2
214	Oleic Acid, (Z)-, TMS derivative	0.17	0
215	Oxalic acid, 2TMS derivative	0.44	0
216	Palmitic Acid, TMS derivative	2.03	2.06
217	Pentanedioic acid, 2TMS derivative	0.13	0
218	Pentanedioic acid, 3-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]-, bis(trimethylsilyl) ester	0.13	0
219	Pentanoic acid, 3-methyl-2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	0.04	0
220	Pentenoic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	0.13	0
221	Phloretic acid, 2TMS derivative	0.18	0

Capítulo 1

222	Phloroglucinic acid, 4TMS	0.07	0
223	Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl) 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	0	0.03
224	Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl)monomethyl ester	0.02	0.05
225	Phytol, TMS derivative	0.77	0
226	Propanetriol, 2-methyl-, tris-O-(trimethylsilyl)-	0	0.14
227	Propanoic acid, 2-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	0.1	0
228	propanoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-2,2-bis[[trimethylsilyl)oxy]methyl]-, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-2,2-bis[[trimethylsilyl	0.12	0
229	Propylene glycol, 2TMS derivative	0.31	0
230	Protocatechoic acid, 3TMS derivative	1.03	0
231	Pyridoxine, 3TMS derivative	0.09	0
232	Quercetin (5TMS)	0.57	0
233	Quininic acid (5TMS)	0.96	0.24
234	Ribonic acid, 2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	0	0.03
235	Sebacic acid, 2TMS derivative	0.15	0
236	Shikimic acid (4TMS)	0.61	0
237	Silane, [(1-methoxy-1,3-propanediyl)bis(oxy)]bis[trimethyl-	0.08	0.03
238	Sinapinic acid, 2TMS derivative	0.04	0
239	Stearic acid, TMS derivative	0.35	0.18
240	Stigmast-5-ene, 3.beta.-(trimethylsiloxy)-, (24S)-	0.12	0
241	Suberic acid, 2TMS derivative	0.1	0
242	Succinic acid, monoethyl ester-, (TMS)	0.09	0
243	Sucrose, 8TMS derivative	0.78	12.2 3
244	Terephthalic acid, pentyl tridec-2-yn-1-yl ester	0.33	0
245	Thymol-.beta.-d-glucopyranoside, tetrakis(O-trimethylsilyl)-	0.1	0.03
246	Tridecanoic acid, TMS derivative	0.17	0
247	Trimethylsilyl 3,5-bis(trimethylsilyloxy)-3-methylvalerate	0.15	0
248	Tyrosol, 2TMS derivative	0.61	0
249	Undecanedioic acid, 2TMS derivative	0.19	0
250	Uracil, 2TMS derivative	0.39	0
251	Uridine, 3TMS derivative	0	0.08
252	Vanillic Acid, 2TMS derivative	0.26	0
253	Vinclozolin M2, trimethylsilyl ether	0.06	0
254	Xanthopterin, 3TMS derivative	0.05	0
255	Xylitol, 5TMS derivative	0.11	0.03

Capítulo 2

IDENTIFICAÇÃO DE ACETOGENINAS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Annona crassiflora* Mart. E *Annona cacans* Warm.

IDENTIFICAÇÃO DE ACETOGENINAS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Annona crassiflora* Mart. E *Annona cacans* Warm.

RESUMO

O gênero *Annona* é composto por inúmeras espécies que já tiveram suas propriedades farmacológicas como antioxidante, parasitaria, pesticida e antibacteriana avaliadas, e por isso tem a investigação de seus compostos cada vez mais difundida nas pesquisas. Já foram identificados metabólitos como esteroides, flavonoides, alcaloides e tiveram seus mecanismos de ação relacionados com as propriedades relacionadas as suas espécies vegetais. Entre os metabolitos pertencentes as anonáceas estão as acetogeninas, compostos derivados de ácido graxo de cadeia longa, que tem como principal ação, a atividade antitumoral e citotóxica. A potencialidade e o modo de ação das acetogeninas está sendo investigado, mas entre o principal está a ação nas enzimas presentes em células tumorais. *Annona crassiflora* e *Annona cacans* são duas espécies pertencentes a família das Annonaceae que tem suas características químicas a atividades biológicas pouco avaliadas. O presente estudo teve por objetivo identificar a presença de acetogeninas através de espectrometria de massas de acordo com a similaridade de massas dos compostos e seu perfil de fragmentação e avaliar a atividade citotóxica dos extratos de polpa e folha de *A. crassiflora* e *A. cacans* pela atividade antiproliferativa em células de linhagem tumoral afim de tornar as espécies alvo de utilização para futuras avaliações no auxílio do tratamento do câncer. Foram identificados possíveis picos de acetogeninas nas folhas de ambas as espécies, com destaque para os compostos das folhas de *A. cacans* que apresentaram perfil de fragmentação compatível com a molécula de interesse. As folhas e polpa de *A. crassiflora* e *A. cacans* apresentaram atividade antiproliferativa quando em contato com diferentes linhagens de células tumorais em baixa concentração, tornando assim os extratos viáveis para possíveis aplicações futuras contra essas células.

Palavras-chave: massas, ácidos graxos, antitumoral, Annonaceae.

1 INTRODUÇÃO

A família Annonaceae é constituída por aproximadamente 136 gêneros e 2500 espécies (Leboeuf et al., 1982, Chatrou et al., 2004). Dentre estes, o gênero *Annona* destaca-se pelo fato de que suas espécies são amplamente utilizadas na medicina popular, devido às diferentes propriedades medicinais já evidenciadas (Silva et al., 2016).

Avaliações fitoquímicas em espécies do gênero, demonstraram metabolismos de diferentes compostos, tais como esteroides, flavonoides, peptídeos, diterpenos, alcaloides e acetogeninas (González-Esquinca et al., 2014). As acetogeninas são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa, estes compostos ativos são detentores de importantes atividades biológicas, tais como atividades citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana, com destaque ação antitumoral (Ragasa et al., 2012, Roduan et al., 2018).

Um interesse crescente tem sido despertado devido ao potencial deste composto em

inibir células resistentes a múltiplos fármacos, principalmente na terapia do câncer (Santos, 2008). O principal alvo de ação conhecido das acetogeninas é a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, ou complexo I da cadeia respiratória, com ação específica na enzima NADH-ubiquinona-oxidoreductase, inibindo a NADH-oxidase ligada a ubiquinona, presente nas membranas de células tumorais (Wu, 2006).

Considerando a utilização popular das *Annonas* e estudos científicos realizados com *Annona muricata* (graviola) *Annona squamosa* (fruta-do-conde) e *Annona dioica* (condeça), principalmente quanto seus os efeitos sobre o câncer, estudos tem se intensificado a procura de novas espécies de anonas passíveis de metabolizar diferentes acetogeninas com maior citotoxicidade seletiva em células cancerígenas (Santos, 2008).

Assim duas espécies de anonas a *Annona crassiflora* e *Annona cacans* demonstram serem passíveis de metabolizar compostos de interesse e com ação anticâncer, principalmente a relatos de sua utilização na medicina popular e estudos prévios realizados com outras espécies do mesmo gênero e família botânica (Ko et al. 2011, González-Esquinca et al., 2014). O que vem motivando as pesquisas em busca de acetogeninas ativas em espécies da família Annonaceae, voltadas principalmente ao gênero *Annona* são os efeitos citotóxicos e antitumorais dessas substâncias (Liaw et al., 2016).

Annona crassiflora, conhecida popularmente como marolo e/u araticum, caracteriza-se por possuir porte arbóreo, tronco geralmente tortuoso com casca áspera e corticosa, folhas alternas simples; flores axilares com pétalas engrossadas e carnosas (Lorenzi, 2002). Os frutos são arredondados, com casca na cor marrom claro e polpa creme amarelada firme e grande quantidade de sementes (Almeida et al., 1998). No Brasil está espécie ocorre predominantemente no bioma Cerrado (Maas et al., 2015). Os frutos desta espécie apresentam em sua composição nutricional ácido ascórbico e carotenoides (Botrel et al., 2016) e são amplamente consumidos e utilizados na preparação de doces, geleias, licores, refrigerantes, sorvetes e sucos, destacando-se principalmente pelo sabor, aroma e cor (Luzia e Jorge, 2013).

No entanto, o consumo deste fruto é menor que os das outras espécies de anonas. Esta espécie possui também compostos antioxidantes e fornecem fibras alimentares que beneficiam a saúde (Corrêa et al., 2011). A capacidade antioxidante e a estabilidade oxidativa é influenciada 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)

Annona cacans é conhecida popularmente como Araticum cagão. Tem distribuição em áreas do bioma Cerrado e Mata Atlântica Brasileira (CNCFlora, 2012). A espécie é constituída por árvores de 7 a 20 m de altura, folha cartácea, flor branca, fruto ovoide verde com polpa amarelada (Maas et al., 2001). O fruto não é consumido pois possui atividade diarreica, porém sua polpa é adocicada e aromática (Carvalho, 2003). Esta espécie de annonaceae é pouco estudada, mas foram identificados alcaloides em extratos do caule (Saito e Alvarenga, 1994).

Diante do exposto presente estudo teve por objetivo utilizar a espectrometria de massas para investigar e possivelmente identificar acetogeninas comparando as massas encontradas nos compostos dos extratos das folhas e polpa dos frutos de *A. crassiflora* e *A. cacans* em comparação com acetogeninas já identificadas na literatura e seus padrões de fragmentação, assim como avaliar o potencial citotóxico em diferentes linhagens de células tumorais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análise química para investigação de acetogeninas - Espectrometria de massas de infusão direta (baixa e alta resolução)

As análises foram realizadas no laboratório de Espectrometria de Massas no NUBBE no Instituto de Química da UNESP/Araraquara

As amostras foram preparadas por dissolução em metanol e diluição para concentração $\times$ em metanol:água (1:1) com 0,1 %v/v de ácido fórmico. Posteriormente foram injetadas por infusão direta no espectrômetro de massas Bruker® Amazon, com configuração ESI-IT-MS. Os espectros foram adquiridos no modo positivo e negativo sendo que as condições gerais da operação durante as análises foram: voltagem da fonte de ionização: 4500 V. As amostras diluídas foram injetadas por uma bomba de injeção automática com um fluxo contínuo de 240 μ L/h. Os espectros de ESI/MS foram adquiridos na faixa de 50 a 1500 m/z. Após previa verificação de possíveis compostos passíveis de análise, o extrato bruto da folha de *A. cacans* foi preparado e injetado por infusão direta no espectrômetro de massas. Os espectros foram adquiridos em modo positivo no equipamento Bruker® Maxis Impact, com configuração ESI-QqTOF-MS. As condições gerais da operação durante as análises foram: voltagem da fonte de ionização: 4500 V. A amostra diluída foi injetada por uma bomba de injeção automática com um fluxo contínuo de 180 μ L/h. Os espectros de ESI/MS foram adquiridos na faixa de 50 a 1500 m/z.

2.3 Avaliação da citotoxicidade

2.3.1 Atividade antiproliferativa em cultura de células

Para avaliação da atividade antiproliferativa em cultura de células do extrato hidrometanólico de folhas e polpa de *A. crassiflora* e *A. cacas* foi realizado o teste em linhagens celulares tumorais e não tumorais. As linhagens de células tumorais humanas foram cedidas pelo NCI (National Cancer Institute, Frederick-MA, EUA). A linhagem celular de queratinócito humano (HaCaT, CLS Cell Line Service) foi gentilmente cedida pelo prof. Dr. Ricardo Della Coletta (FOP/UNICAMP).

Os experimentos de atividade antiproliferativa foram realizados segundo o protocolo descrito por Monks et al. (1991). O crescimento celular foi determinado por espectrofotometria, utilizando-se o corante proteico sulforrodamina B (SRB, Sigma-Aldrich®) e as análises foram baseadas na metodologia de triagem in vitro para drogas anticâncer realizada pelo NCI, EUA, que utiliza um painel de 60 linhagens tumorais humanas (Monks et al., 1991; Shoemaker, 2006; Monteiro et al., 2017).

2.3.1.1 Cultivo e preparo das suspensões celulares

As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² (Corning®) com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB, Gibco®) e com solução de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 10 mL/L RPMI 1640, Vitrocell®) (denominado meio completo) e mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Para linhagens aderidas, o desprendimento celular foi realizado mediante ação enzimática da tripsina. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado, o frasco lavado com 500 µL de tampão fosfato salina (PBS 0,2 mM, pH 7,0) para eliminar resíduos de meio de cultura e, após aspiração do tampão, foram adicionados 500 µL de solução tripsina/EDTA 2,5 g/L (Vitrocell®), a 37°C, até que as células se soltassem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada por meio da adição de meio de cultura completo. No primeiro dia de experimento, as suspensões celulares foram preparadas com meio completo, em suas respectivas densidades de inoculação. Foram inoculados 100 µL/compartimento de cada suspensão celular em placas de 96 compartimentos (Corning®), que foram incubadas por 24 horas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Da mesma forma, preparou-se uma placa controle (placa T0), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

2.3.1.2 Preparo e aplicação das amostras

Alíquotas da amostra do extrato foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®) na concentração de 0,1g/mL. Para adição à cultura de células, esta solução foi diluída pelo menos 400 vezes em meio completo, o que evitou a toxicidade do DMSO. A amostra do extrato foi adicionada às microplacas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata e, a seguir, foram incubadas por 48 h a 37° C em atmosfera de 5 % de CO₂ e ambiente úmido. Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina (cloridrato de doxorrubicina, Eurofarma) nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL (100 µL/compartimento), em triplicata.

No momento de adição da amostra, as células inoculadas na placa controle T0 foram fixadas com a adição de 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA, SigmaAldrich®) a 50 % para determinação da quantidade de células presentes no momento em que a amostra foi aplicada, sendo este o valor basal no tempo 0. Após 48 h de tratamento, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético a 50 % e incubadas por 1 hora, a 4° C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas em água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após isso, foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após a secagem, foram adicionados 50 µL/compartimento do corante proteico sulforrodamina B (SRB, Sigma-Aldrich®) a 0,4% (p/v) dissolvido em ácido acético a 1% (v/v) e, a seguir, as placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 10 min. As placas foram então lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% (v/v) e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de Trizma Base (10 mM, pH 10,5, Sigma-Aldrich®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540nm (Molecular Devices® , modelo VersaMax).

2.3.1.3 Análise dos resultados

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor dos respectivos brancos e, determinado o crescimento celular (%) de cada linhagem celular em função das concentrações da amostra. Se $T > T_1$, a amostra estimulou o crescimento. Se $T_0 \leq T < T_1$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$. Se $T < T_0$, a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T- T_0)/(T_0)]$. Sendo T a média das absorbâncias das células tratadas, T1 a média das absorbâncias das células não tratadas ao final do tempo de exposição e T0 a média das absorbâncias das células no tempo 0 (início do tempo de exposição).

Os resultados foram expressos em curvas de crescimento celular para cada linhagem em função da concentração da amostra e, a partir deles, foi calculada a concentração efetiva GI50 (concentração necessária para inibição de 50% da viabilidade celular), através de regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se software Origin 8.0 (OriginLab Corporation).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise química para investigação de acetogeninas - Espectrometria de massas de infusão direta (baixa e alta resolução)

A análise dos extratos das folhas em espectrômetro de massas (MS) foi realizada para conhecer o perfil dos picos de compostos das espécies e verificar se existiu a ocorrência de áreas de incidência de íons característicos de acetogeninas.

Os espectros de massas *fullscan* foram obtidos no modo positivo e negativo de ionização. As moléculas protonadas $[M+H]^+$ e desprotonadas foram utilizadas para a dedução dos compostos. Nas figuras 2.1 e 2.2 encontram-se os espectros *fullscan* dos extratos de folha e polpa de *A. crassiflora* e *A. cacas*.

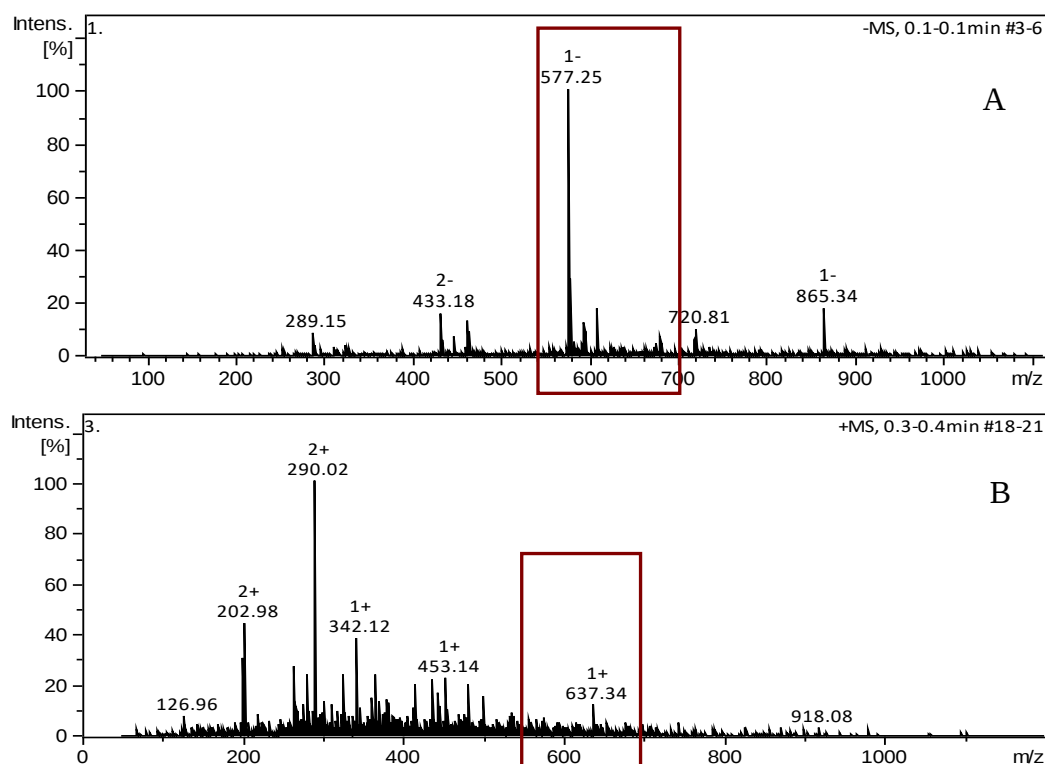


FIGURA 2.1 – *Fullscan* do extrato bruto em 10ppm das folhas em modo negativo (A) e polpa em modo positivo (B) de *A. crassiflora* por MS.

A região de incidência das acetogeninas ocorre entre m/z 550 a 700 (Bruginski, 2016), e mesmo levando em consideração ser um extrato bruto e com uma variedade grande de compostos ainda foi possível ser observado nessa região picos de íons com intensidade considerável no extrato das folhas de ambas as espécies como pode ser observar nas figuras 2.1 (A) e 2.2 (A).

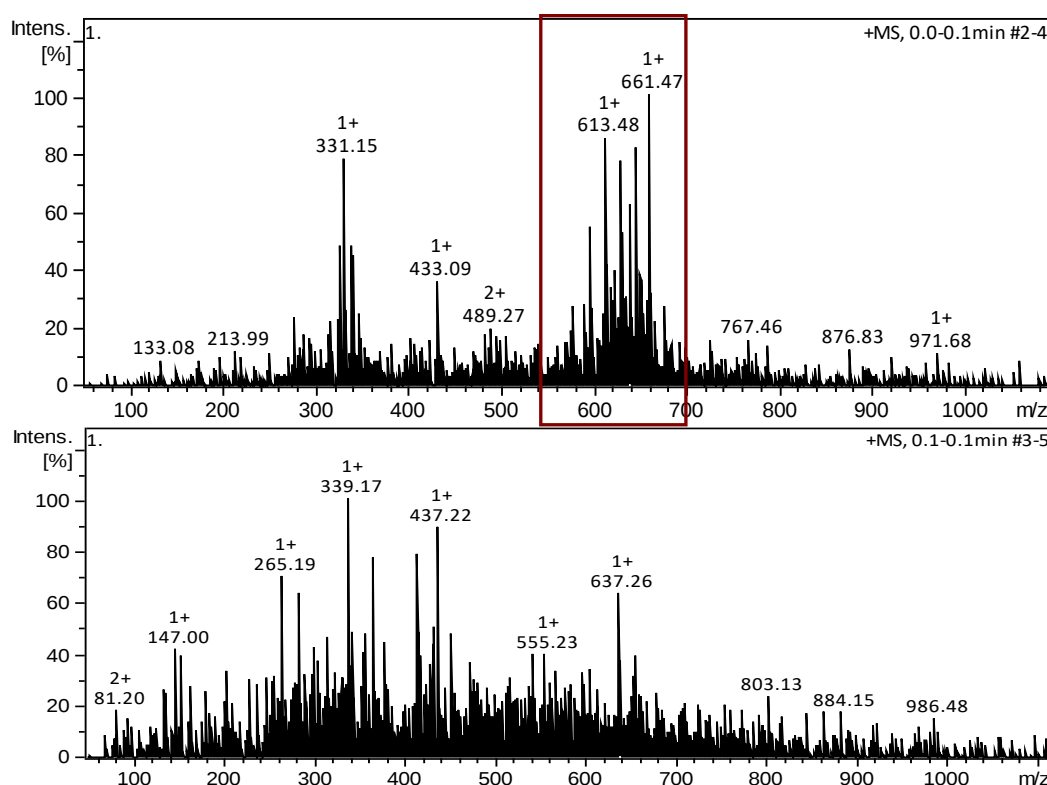


FIGURA 2.2 – Fullscan do extrato bruto em 10ppm das folhas (A) e polpa (B) de *A. cacans* por MS (Modo positivo)

No espectro de ambas as polpas não foram identificadas áreas com incidência considerável da região de absorção das acetogeninas e então foram realizados experimentos de fragmentação das moléculas.

Quando foram abertos os picos que apresentaram possibilidade de serem acetogeninas foram identificados íons característicos nas folhas de *A. cacans* (Tabela 2.1), como foi relatado por Gu et al., (1997), são picos que possuem perdas neutras de água, monóxido e dióxido de carbono e pode perder uma γ -lactona terminal, que é comum nas acetogeninas que possuem uma hidroxila no carbono 4.

TABELA 2.1 Identificação de picos de acetogeninas nos extratos da folha de *A. crassiflora* e *A. cacans* e seu comportamento de fragmentação

Fig	M+	[M+H] ⁺	[M+H-H ₂ O] ⁺	[M+H-2H ₂ O] ⁺	[M+H-3H ₂ O] ⁺	[M+H-4H ₂ O] ⁺	[M+H-5H ₂ O] ⁺	[M+H-6H ₂ O] ⁺	[M+H-6H ₂ O-112] ⁺	[M+H-6H ₂ O-112-112] ⁺
2.3	596	597	579	561	543	525	507			
2.4	612	613	595	577	559	541	523	505	393	281
2.5	622	623	605	587	569	551	533			
2.6	628	629	611	593	575	557	539	521		
2.7	638	639	621	603	585	567	549	531		

Chang e Wu (2001) identificaram 7 novas acetogeninas nas sementes de *Annona muricata*, e entre elas, descreveu a acetogenina Muricin C, como tendo peso de m/z 597 [MH]⁺ e apresentando fragmentos em FABMS de m/z 579, 561, 543, e 525, sugerindo a presença de quatro grupos hidroxilas, pico com padrão semelhante foi verificado na Figura 2.3.

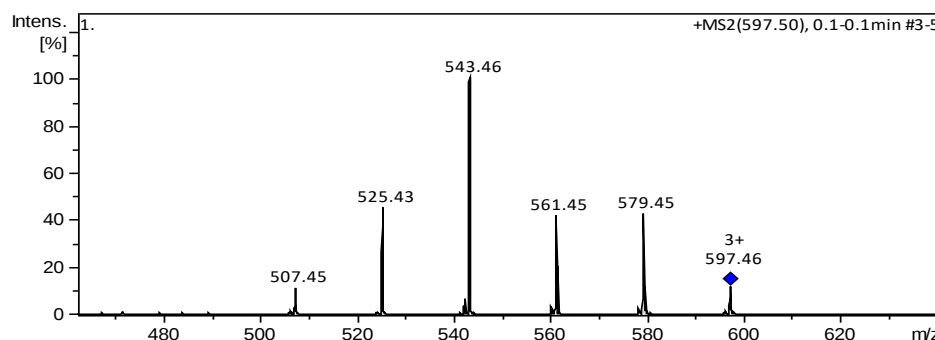


FIGURA 2.3 – Fragmentação do íon aduto 597 [M+H]⁺ identificado nas folhas de *A. cacans* 10ppm HPLC/Ms (Modo positivo)

A Figura 2.4 apresenta o fragmento do íon 613 [M+H]⁺, também com perda de moléculas de água. Fragmentos de moléculas semelhantes foram relatados por Wu et al. (1995) em folhas de *A. muricata* e em folhas e galhos de *Annona montana* por Colom et al. (2009), como sendo acetogeninas, tornando, portanto o espectro obtido como candidato.

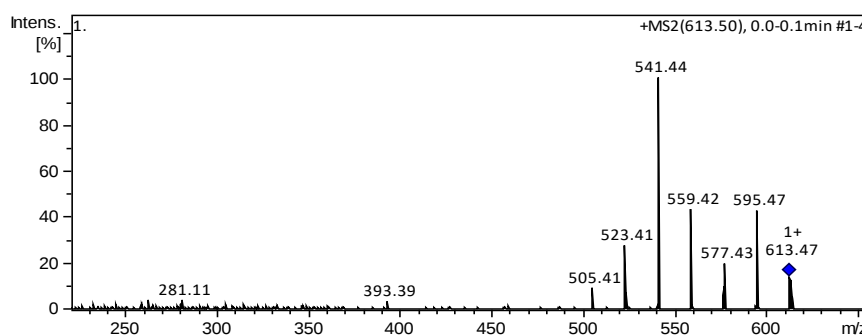


FIGURA 2.4 – Fragmentação do íon aduto 613 [M+H]⁺ identificado nas folhas de *A. cacans* 10ppm HPLC/Ms (Modo positivo)

Foram identificadas diversas acetogeninas com peso molecular de m/z 623, portanto sendo necessária maior exploração para confirmar a sua identificação. (Chang et al., 1999; Lima et al., 2008; Miao et al., 2015).

Os trabalhos de maneira geral, identificam, isolam e relacionam a presença das acetogeninas com a atividade contra células tumorais, como o que foi realizado por Sun et al. (2016), que isolou acetogeninas com peso m/z de 623 nos frutos de graviola (*A. muricata*) e relacionou a presença dos mesmo com a atividade antiproliferativa em câncer de próstata PC-3 da espécie.

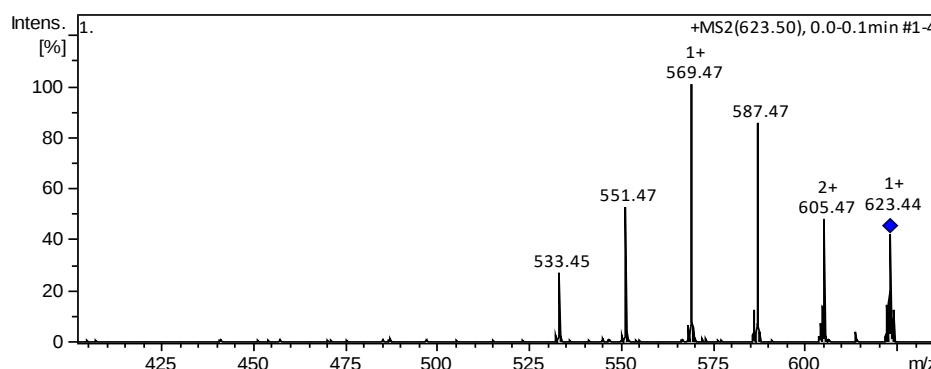


FIGURA 2.5 – Fragmentação do íon aduto 623 $[M+H]^+$ identificado nas folhas de *A. cacans* 10ppm HPLC/Ms (Modo positivo)

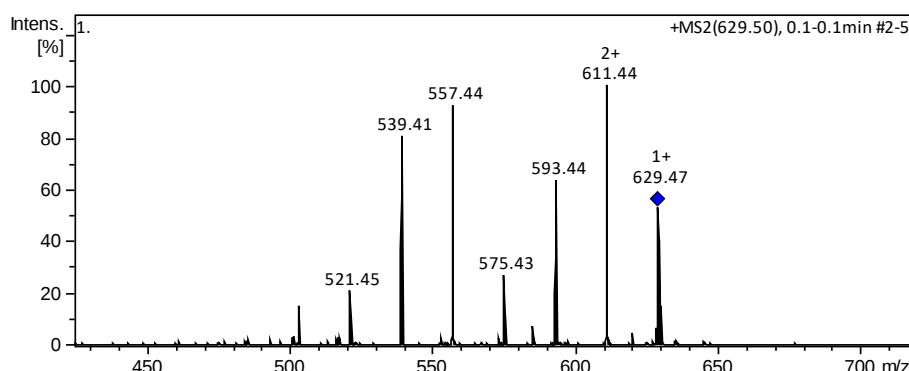


FIGURA 2.6 – Fragmentação do íon aduto 629 $[M+H]^+$ identificado nas folhas de *A. cacans* 10ppm HPLC/Ms (Modo positivo)

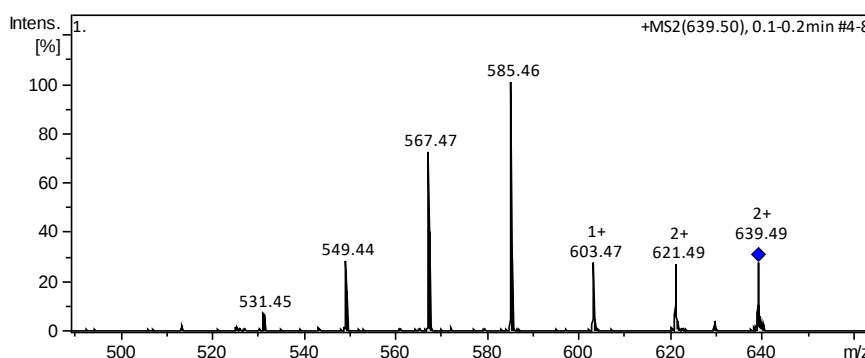


FIGURA 2.7 – Fragmentação do íon aduto 639 $[M+H]^+$ identificado nas folhas de *A. cacans* 10ppm HPLC/Ms (Modo positivo)

Foram identificados picos com massa molecular e padrões de fragmentação que levam a possibilidade dos compostos serem acetogeninas, porém, sendo esta, uma análise exploratória a identificação foi parcial, comprovando somente a classe dos metabólitos. As acetogeninas apresentam muitos isômeros para a mesma forma molecular, sendo assim necessário outras técnicas para a identificação exata destas substâncias.

Levando em consideração a identificação de picos com massa de possíveis acetogeninas nas folhas de *Annona cacans* foi realizada a análise em espectrômetro de alta resolução afim de visualizar os compostos com maior número de casas decimais e assim conseguir aproximar melhor a hipótese de serem acetogeninas.

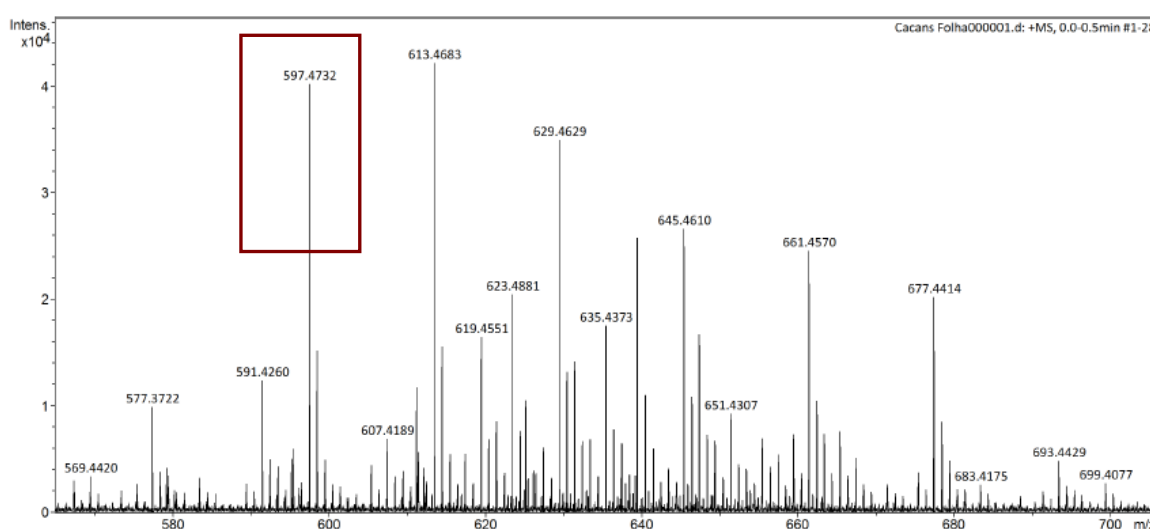


FIGURA 2.8 Fullscan do extrato bruto em 10ppm das folhas de *A. cacans* em modo positivo por MS de alta resolução.

A análise por MS de alta resolução demonstrou que o pico m/z 597 $[M+H]^+$ relatado por Chang e Wu (2001) se trata do mesmo composto acetogenina, já que o número de casas depois da vírgula levou a grande similaridade com o composto identificado por eles.

3.3 Avaliação da atividade antiproliferativa em cultura de células.

O estudo da atividade citotóxica do extrato foi realizado em linhagens tumorais humanas (glioma, mama, ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, rim, pulmão-tipo não pequenas células, próstata, ovário e cólon), e com linhagem não-tumoral humana (queratinócito). Foi utilizado como padrão positivo a doxorrubicina, fármaco antineoplásico utilizado em tratamentos quimioterápicos e o controle negativo, recebeu a mesma quantidade de DMSO. Os extratos foram testados em diluição seriada, em triplicata.

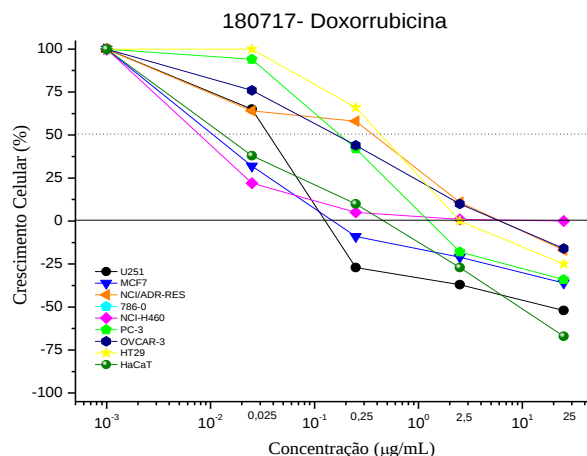


FIGURA 2.9 – Taxa de crescimento celular com doxorrubicina em linhagens celulares tumorais e em queratinócitos. Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-O (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3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

Os resultados para os extratos de folha e polpa de *A. crassiflora* e *A. cacas* frente as diferentes linhagens de célula tumoral estão apresentadas na Tabela 2.2 quanto a concentração necessária para atingir 50% de atividade.

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

	2	M	A	7	4	P	O	H	Q
Doxorrubicina	0,026	<0,025	0,16	<0,025	<0,025	0,23	0,14	0,26	<0,025
<i>A. cacas</i> folhas	198,30	62,43	29,94	*	*	56,18	51,50	*	76,10
<i>A. cacas</i> polpa	28,70	24,61	1,92	1,76	26,79	26,24	23,96	31,78	25,07
<i>A. crassiflora</i> polpa	*	11,98	15,74	*	157,33	*	15,71	*	68,41
<i>A. crassiflora</i> folha	30,52	24,88	1,85	31,66	32,25	22,56	9,49	90,76	10,97

Linhagens tumorais humanas: 2 = U251 (glioma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7 = 786-O (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-03 (ovário); h = HT-29 (côlon). Linhagem não tumoral humana: q = HaCaT (queratinócito). GI₅₀: Growth Inhibition 50 – concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular.

* GI₅₀ > 250 µg/mL

Um dos problemas dos tratamentos contra câncer são as atividades toxicas dos medicamentos que tem ação não somente nas células tumorais, mas também em células normais, como pode ser observado na ação da Doxorrubicina sobre os queratinócitos.

A polpa de *A. crassiflora* demonstrou melhor atividade antiproliferativa sobre células da linhagem MCF-7 (mama), sendo necessária a concentração de 11,98µg/mL para inibir em 50% a proliferação celular. Salientando que a o GI₅₀ para queratinócitos se espera que seja maior, como o que aconteceu, que foi de 68,41µg/mL

Já a folha da mesma espécie apresentou comportamento antiproliferativo eficaz em outra linhagem de célula tumoral, a do ovário com fenótipo de resistência, e foi necessária apenas 1,85µg/mL para inibir 50% do crescimento, e tendo a ação sobre os queratinócitos, com GI50 de 10,97µg/mL

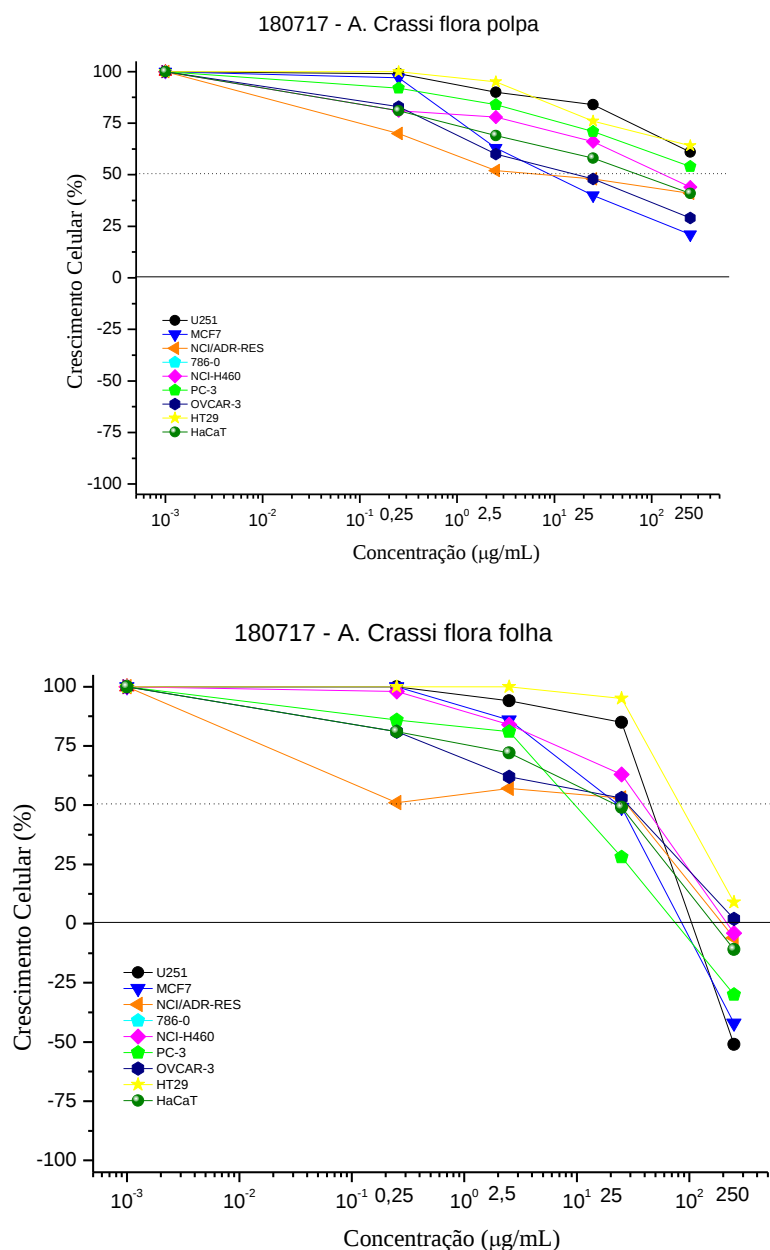


FIGURA 2.10 Taxa de crescimento celular com extrato da polpa e folha de *A. crassiflora* em linhagens celulares tumorais e em queratinócitos. Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-O (rim); NCI-H460 (pulmão,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

A polpa de *A. cacas*, foi a espécie que apresentou melhores resultados para o teste, com baixa concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular nas linhagens de ovários e rim, com respectivamente 1,92 e 1,76 μ g/mL de extrato. A folha apresentou melhor GI50 também para a linhagem de ovários com 29,94 μ g/mL, e para as células não tumorais de 76,1 μ g/mL.

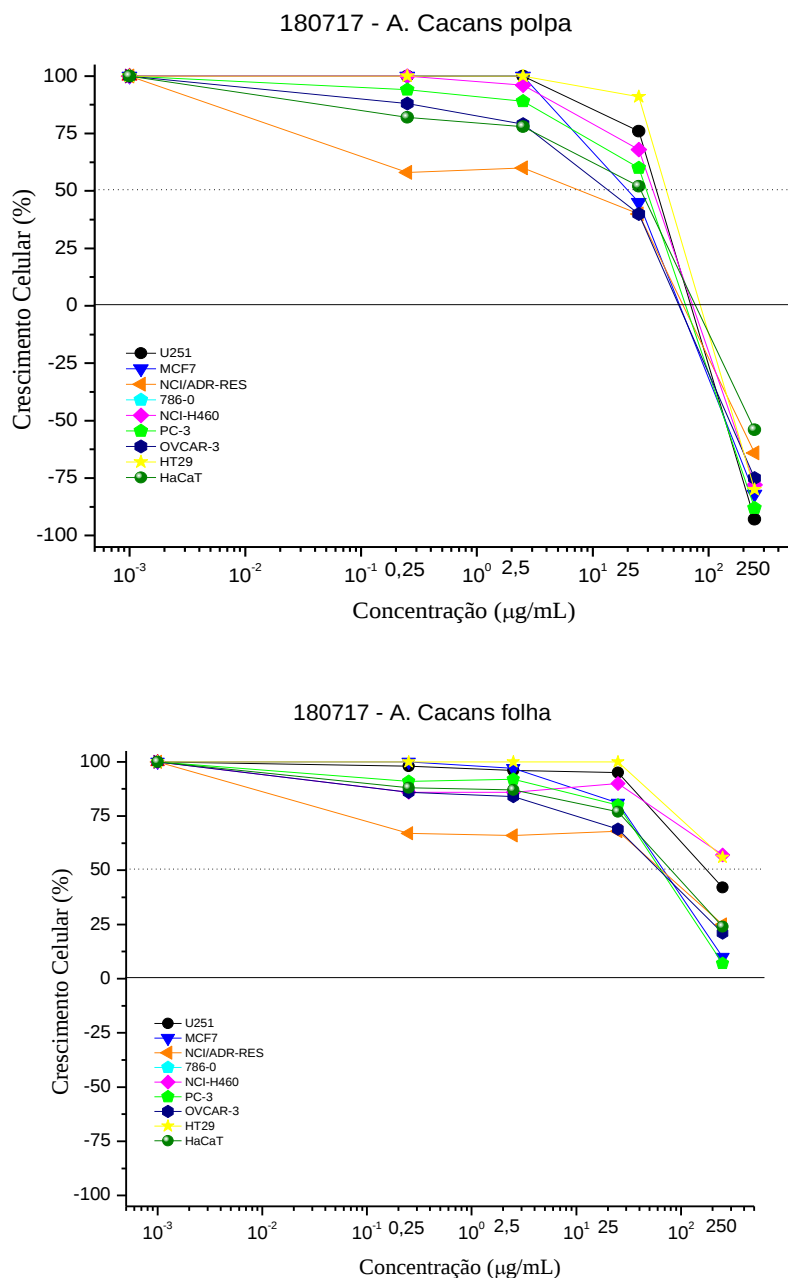


FIGURA 2.11 Taxa de crescimento celular com extrato da polpa e folha de *A. cacas* em linhagens celulares tumorais e em queratinócitos. Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-O (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não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

Todos os GI50 das espécies avaliadas para as diferentes linhagens de células tumorais estão apresentados na Tabela 2.2. Além dos melhores resultados apresentados acima nas figuras, outras ações em linhagens podem ser melhores elucidadas, devido ao fato de que os extratos estão em baixas concentrações.

4 CONCLUSÃO

Foram identificados picos de possíveis acetogeninas nas folhas de *A. crassiflora* e *A. cacans*, sendo necessárias futuras análises para melhor elucidação dos picos e identificação dos compostos de acordo com a sua massa.

Os picos identificados nas folhas de *A. cacans* já foram definidos como acetogeninas, porém é necessária a elucidação da molécula para confirmação.

Todos os extratos de polpa e folha de ambas as espécies apresentaram potencial antitumoral de acordo com as avaliações da atividade antiproliferativa em células tumorais, em especial a polpa de *A. cacans*, que apresentou potencial em todas as linhagens avaliadas pelo trabalho, e com o seu extrato em baixas concentrações.

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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
- Carvalho, P. E. R. Araticum-cagão. Circular Técnica Embrapa. 2003.
- Centro Nacional de Conservação da Flora – CNCFLORA. Lista Vermelha da flora brasileira: versão 2012.2. 2012. Disponível em < <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/listavermelha/> >
- Chang, F.R.; Chen, J.I.; Lin, C.Y.; Chiu, H.F.; Wu, M.J.; Wu, Y.C. Bioactive acetogeninas from the seeds of *Annona atemoya*. Phytochemistry, 51(7), 883-889, 1999.
- Chang, F.R.; Wu, Y.C.. Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. Journal of Natural Products, 64(7), 925–931, 2001.
- Chatrou, L.W., Rainer, H.; Maas, P.J.M. Annonaceae. In: Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson, A.; Stevenson, D.W.; Heald, S.V (Ed.). Flowering plants of the neotropics. New York: Princeton University Press, 2004. p.18-20.

Colom, O.A.; Neske, A.; Chahboune, N.; Zafra-Polo, M.C.; Bardón, A. Tucupentol, a novel mono-tetradhydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as potent inhibitor of mitochondrial complex I. *Chemistry & Biodiversity*, 6, 335-340, 2009.

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.

Gu, Z-M.; Zhou, D.; Wu, J.; Shi, G.; Zeng, L.; McLaughlin, J.L. Screening for Annonaceous Acetogenins in Bioactive Plant Extracts by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of natural products*, 60, 242-248, 1997.

Ko, Y.M., Wu, T.Y., Wu, Y.C., Chang, F.R., Guh, J.Y., Chuang, Y., 2011. 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.

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.

Lima, L.; Pimenta, L.; Boaventura, M. Two new adjacent bis-tetradhydrofuran annonaceous acetogenins from seeds of *Annona cornifolia*. *Planta medica*, 75(01), 80-83, 2008.

Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. *Plantas Medicinais do Brasil Nativas e Exóticas*. Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., Nova Odessa, 60-61, 2002.

Luzia, Débora M.M.; Jorge, Neuza. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. *Industrial Crops and Products*, v. 42, n. 1, p. 231-235, 2013.

Maas, P.J.; Kamer, H.M.D.; Junikka, L.; Mello-Silva, R.D.; Rainer, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, 52(80), 65-98, 2001.

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>>.

Miao, Y.; Xu, X.; Yuan, F.; Shi, Y.; Chen, Y.; Chen, J.; Li, X. Four cytotoxic annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Natural Product Research*, 30(11), 1273-1279.

Pandey, N. Barve, D. Phytochemical and pharmacological review on *Annona squamosa* Linn International. *Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2011

Ragasa, C. Geneveve, S., Torres, O.B., Ming-Jaw, D., Chien-Chang, S. Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacognosy journal*, 32(4), 32-37, 2012.

Roduan MRM, Hamid RA, Kqueen CY, Mohtarrudin N, Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* in vitro, *Journal of Herbal Medicine* (2018),

Saito, M.L., Alvarenga, M.A. Chemical Composition of *Annona cacans* Warming Lecta-Usf, 12(1), 135-140, 1994.

Silva, M.A.;Rosa, C.P.; Bastos, R.G.; Silva, A.F.; Silva, G.A.; Marques, M.J.; Espuri, P.F. Triagem fitoquímica, atividade antioxidante e leishmanicida do extrato hidroetanólico 70% (v/v) e das frações obtidas de *Annona crassiflora* Mart. *Fitos*, 10, 375-547, 2016.

Wu, F.E.; Zeng, L.; Zhe-ming, G.; Zhao, G.X.; Zhang, Y.; Schwedler, J.T.; McLaughlin, J.L. New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenin, annomuricin C and muricatocin C, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 58(6), 909-915, 1995.

Capítulo 3

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE EXTRATOS
DE FOLHAS DE *Annona crassiflora* Mart. E *Annona cacans* Warm.**

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Annona crassiflora* Mart. E *Annona cacans* Warm.

Resumo

A microencapsulação é uma técnica que vem sempre empregada na indústria para diversas funcionalidades como a proteção de agentes ativos e a possibilidade de monitoramento de liberação nos locais de ação. O material utilizado para produzir as microcápsulas deve ser previamente analisado para identificar o seu comportamento com o composto de interesse que será encapsulado, bem como sua possível atividade no mecanismo de ação pretendido com o produto final. A indústria utiliza essa metodologia para melhorar o processamento das atividades dos produtos, bem como aumentar seu tempo de prateleira, ou proteger a manipulação quando são compostos de origem tóxica, como por exemplo em caso de produtos agrícolas para pragas. Já são conhecidos compostos fenólicos nas Annonaceae, e suas atividades já foram relacionadas com a prevenção de diversas doenças e prevenção de envelhecimento celular. A maltodextrina é muito utilizada na produção de microencapsulados por ter fácil aplicabilidade em diversas áreas industriais. Sendo assim, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de um processo de microencapsulação em extratos de folha de *A. crassiflora* e *A. cacans*, onde seria possível manter os extratos com compostos fenólicos identificados em microcápsulas com maltodextrina, e avaliar essas microcápsulas para futura aplicação em produtos finais industriais.

Palavras-chave: Spray dryer, maltodextrina, Annonaceae.

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de microencapsulação se apresentam como uma alternativa na melhoria da estabilidade dos compostos presentes no extrato vegetais contendo compostos de interesse para as diferentes áreas industriais (Carocho et al., 2018). Esta tecnologia consiste no empacotamento de partículas, por meio da utilização de um agente encapsulante, com o intuito de proteger e prolongar sua funcionalidade, sendo também uma alternativa para modificar as características de um produto e melhorar sua aparência (Menezes et al., 2013).

As microcápsulas formadas são constituídas de um núcleo com o agente ativo recoberto por uma camada de polímero de espessura variável (Fib, 2013). A técnica permite o desenvolvimento de fórmulas com liberação controlada de compostos ativos em locais e meios onde devem agir e/ou onde serão absorvidos (Santos et al., 2000; Suave, 2006). O princípio ativo protegido é liberado gradativamente com estímulos adequados, como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução, entre outros (GIBBS *et al.*, 1999).

Diversos agentes encapsulantes estão disponíveis, como goma arábica, algumas proteínas e maltodextrina em diferentes graus de dextrose equivalente (DE) (Ré, 2000, Ding e Shah, 2009). Esta última possui alta solubilidade em água, baixa viscosidade, além de produzir soluções incolores, sendo um ingrediente útil na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (Gharsallaou et al, 2007). A maltodextrina sozinha ou combinada com gomas são os agentes que normalmente são mais utilizados no processo de secagem e obtenção de produtos microencapsulados (Ding e Shah, 2009).

Espécies da família Annonaceae são largamente empregadas na medicina popular devido as suas diferentes propriedades farmacológicas, atribuídas principalmente aos alcaloides e, mais recentemente, a acetogeninas e flavonoides, principais constituintes bioativos encontrados em gêneros específicos das anonáceas (González-Esquinca et al., 2014).

Estudos da literatura relatam atividades como anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária e inseticida (Coria-Téllez et al., 2018). Sendo que para esta última atividade, estudo recente demonstrou o aumento da eficácia na mortalidade de pragas, após encapsulamento dos extratos das sementes de *Annona squamosa*, permitindo desenvolver assim uma metodologia de encapsulação e de liberação controlada do agente tóxicos a inseto, diminuindo o risco de intoxicação do manipulador do produto e do meio ambiente (Hirech et al., 2003).

Os produtos de microencapsulação têm aplicação direta na indústria farmacêutica, de alimento, cosméticos e agrícola, sendo assim, o trabalho teve por objetivo a avaliação do processo de microencapsulação com maltodextrina por Spray-dryer de extratos de folhas de *Annona crassiflora* e *Annona cacans*, e a avaliação das suas propriedades antioxidantes e composição fenólica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação dos extratos

Os extratos das folhas de *A. crassiflora* e *A. cacans* foram preparados na proporção de 1:10 deixados em agitação por 3 dias e então filtrados. A análise prévia foi realizada com diferentes variações de solvente para verificação da mais efetiva para continuação das análises, sendo elas água 100%, água:etanol (70:30) e água: metanol (70:30).

2.1 Avaliação do conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante dos extratos.

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de *Folin-Ciocalteu*, adaptado de Wu (2006). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido gálico por g de extrato.

Para a análise da atividade antioxidante dos extratos, foram utilizados os métodos de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), metodologia descrita por Blois, (1958) o método de sequestro de radical ABTS (Re et al., 1999). Para o DPPH, os resultados foram expressos com a fórmula: Atividade antioxidante (%) = $[(A_{CONT} - A_{AMOSTRA}) / A_{CONT}] \times 100$, onde $A_{AMOSTRA}$ é a absorbância das amostras após 30min e A_{CONT} é a absorbância do DPPH, ambos a 517nm, e para o ABTS foi utilizada uma curva de calibração usando Trolox como padrão, e os resultados foram expressos em mg Trolox equivalente por g de microcápsula seca (mgTrolox /g).

2.2 Secagem por atomização do extrato em Spray dryer

A secagem por atomização dos extratos da folha de *A. crassiflora* e *A. cacas* foi realizada usando um Spray Dryer Mini Büchi B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suíça). Os valores de temperatura de entrada, fluxo de alimentação, taxa de aspiração e quantidade de maltodextrina foram utilizados de acordo com variação encontrada por análise experimental de variáveis utilizando o design experimental fatorial Box-Behnken.

O extrato foi diluído em agitação com Maltodextrina nas concentrações definidas pelo design com variação de 10, 30 e 50%. O equipamento foi operado com água deionizada por 10min antes e após cada experimento. As micropartículas foram armazenadas em recipientes escuros e fechados durante o processo.

2.3 Caracterização das microcápsulas

2.3.1 Rendimento de processo de encapsulação e Rendimento de secagem

O pó foi deixado em estufa por 12 horas para remoção da água presente, e então foi calculado seu rendimento de processo encapsulação, definido com a fórmula: $100 - (P_{\text{INICIAL}} - P_{\text{FINAL}} / P_{\text{INICIAL}}) * 100$, onde P_{INICIAL} é o extrato utilizado no processo somado a maltodextrina em gramas, P_{FINAL} é o peso em gramas do pó após secagem em estufa e remoção da água.

2.3.2. Índice de solubilidade (IS), índice de absorção (IA) e atividade (AA) de água.

O Índice de solubilidade em água (IS) e índice de absorção de água (IA) foram determinados de acordo com Ahmed et al., (2010), dissolvendo 1 g de produto em 12 mL de água. IS e IA foram calculados de acordo com as equações:

IS: $PS_{\text{SOBR}} / PS_{\text{AMOSTRA}} * 100$, onde PS_{SOBR} é o peso do sobrenadante removido após centrifugação e PS_{AMOSTRA} o peso inicial de pó das microcápsulas utilizados na análise,

IA: $PS_{\text{CENTR}} / PS_{\text{AMOSTRA}}$, sendo PS_{CENTR} o peso remanescente após centrifugação

A atividade de água foi medida com Medidor portátil de atividade de água HP23-AW-A.

2.3.3 Total de polifenóis totais encapsulados

Polifenóis totais foram extraídos das microcápsulas de acordo com Robert et al., 2010, com uma solução de 50% de metanol, 8% de ácido acético e 42% de água (v/v/v). Os polifenóis totais encapsulados foram quantificados pelo método de *Folin Ciocalteu* de acordo com Aliakbarian et al., (2015). A curva de calibração foi preparada usando ácido gálico como padrão, e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por g de microcápsula seca (mgGAE /g).

2.3.4 Atividade antioxidante das microcápsulas

A atividade antioxidante das microcápsulas (AA) foi determinada pelo método de sequestro de radical ABTS (Re et al., 1999). Foi utilizada curva de calibração usando Trolox como padrão, e os resultados foram expressos em mg Trolox equivalente por g de microcápsula seca (mgTrolox /g).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante dos extratos.

Foram realizados extratos com as folhas de *A. crassiflora* e *A. cacans* em diferentes condições, Água 100%, Água 70:30 Etanol e Água 70:30 Metanol, para verificar se a diferença no conteúdo de fenóis totais era significativa na extração de acordo com alteração do solvente.

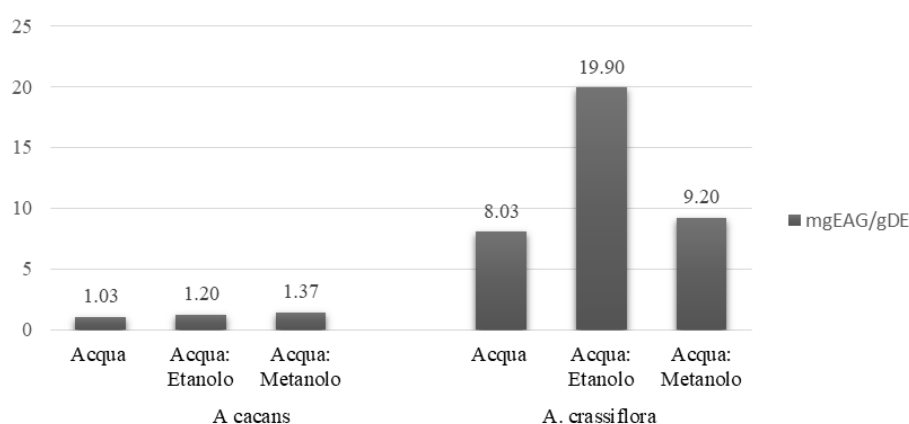


FIGURA 3.1 Quantificação de fenóis totais pelo método de *Follin ciocateau* dos extratos em diferentes condições de extração

Em *A. cacans* os extratos apresentaram conteúdos de fenóis totais semelhantes mesmo com a alteração do solvente de extração. Já para *A. crassiflora* a extração com água 70:30 etanol se mostrou mais efetiva para os fenóis, apresentando 19,9mgEAG/g de extrato seco. Os resultados para atividade antioxidante de acordo com o método DPPH estão demonstrados na Tabela 3.1

O melhor EC50 obtido para DPPH nos extratos de *A. crassiflora* foi na extração água:etanol com 4,66µL/mL de extrato necessário para obter 50% de atividade antioxidante por este método, já *A. cacans* foi melhor no extrato com metanol, apresentando EC50 de 142µL/mL.

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

	<i>A. crassiflora</i>		<i>A. cacans</i>	
$\mu\text{L/mL}$	água: etanol (70:30)	água: metanol (70:30)	água: etanol (70:30)	água: metanol (70:30)
1	24.6 $\pm$ 3.2	20.0 $\pm$ 1.7	nd	nd
5	53.3 $\pm$ 0.2	41.7 $\pm$ 0.2	nd	nd
10	85.6 $\pm$ 0.2	76.0 $\pm$ 1.0	nd	nd
50	nd	nd	20.3 $\pm$ 0.3	22.2 $\pm$ 1.3
100	nd	nd	29.1 $\pm$ 2.1	44.9 $\pm$ 0.1
250	nd	nd	48.8 $\pm$ 0.7	75.7 $\pm$ 0.3
500	nd	nd	78.9 $\pm$ 0.6	nd
EC50	4,6 $\mu\text{L/mL}$	5,99 $\mu\text{L/mL}$	268,4 $\mu\text{L/mL}$	142,7 $\mu\text{L/mL}$

nd: concentração não teve atividade detectada de acordo com o teste

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

$\mu\text{g/mL}$	<i>A. crassiflora</i>	<i>A. cacans</i>
1	nd	1.571 $\pm$ 0.06
2	nd	1.703 $\pm$ 0.02
10	nd	1.430 $\pm$ 0.03
20	nd	0.984 $\pm$ 0.03
50	nd	0.541 $\pm$ 0.06
100	1.886 $\pm$ 0.01	0.483 $\pm$ 0.13
200	1.766 $\pm$ 0.02	nd
1000	0.679 $\pm$ 0.02	nd

Os resultados estão expressos em $\mu\text{gTE/Lextrato}$. nd: concentração não teve atividade detectada de acordo com o teste

3.2 Microencapsulação e caracterização das microcápsulas

Entre as vantagens da encapsulação com materiais não tóxicos está o aumento na eficiência dos produtos, a redução da fotodegradação, maior segurança no manuseio, redução de riscos de toxicidade ao homem e contaminação do meio ambiente, além da possibilidade de liberação de princípios ativos de maneira controlada (Maciel et al., 2019).

Foram utilizados somente os extratos água: etanol (70:30) para as posteriores análises. As variações combinatórias obtidas pelo design experimental Box-Behnken estão demonstradas na Tabela 3.3, foram selecionadas três variáveis, INLET (Temperatura de entrada) com mínimo de 120°C e máximo de 180°C, MD (Maltodextrina), nas concentrações mínima de 10 e máxima de 50%, e FFR(fluxo de alimentação), variando de 8 ao máximo de 42%. A amostragem rendeu 15 diferentes combinações de condição.

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*

	Condições			<i>A. crassiflora</i>	<i>A. cacans</i>
	INLET	MD	FFR	rendimento de processo	
1	120	10	25	83.24	83.02
2	180	10	25	99.41	99.14
3	120	50	25	67.72	67.68
4	180	50	25	50.27	50.24
5	120	30	8	66.19	66.12
6	180	30	8	83.31	83.23
7	120	30	42	43.51	43.47
8	180	30	42	57.68	57.62
9	150	10	8	94.96	94.71
10	150	50	8	83.77	83.72
11	150	10	42	95.44	95.19
12	150	50	42	29.32	29.30
13	150	30	25	62.12	62.06
14	150	30	25	71.00	70.93
15	150	30	25	82.17	82.09

INLET (Temperatura de entrada em °C); MD (Maltodextrina utilizada no preparo %); FFR(Fluxo de bombeamento do aparelho %); rendimento de processo (%)

Os resultados obtidos quanto ao rendimento e as demais análises foram submetidos ao software para verificar qual a condição de análise mais eficiente quanto ao rendimento de processo, atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos, tendo assim, a condição mais favorável entre o design para obter resultados mais significativos para todas as análises realizadas.

3.1.1 Índice de solubilidade em água (IA) e índice de absorção de água (IA) e atividade de água (AA)

Os índices em solubilidade em água e absorção em água são importantes para verificar se o pó possui capacidade de se manter armazenado sem ocorrer o acúmulo de água, e a solubilidade para verificar como vai ser empregado seu uso futuramente na indústria.

A atividade de água fala sobre como o produto vai se comportar no caso, por exemplo, do crescimento de microorganismos. Silva et al. (2013) obteve atividade de água (0,25 a 0,39) em microencapsulados própolis e avaliou importância do material de parede na diminuição da atividade de água, enfatizando a importância da AA na manutenção da estabilidade microbiológica e físico-química do produto.

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*.

	<i>Annona crassiflora</i>				<i>Annona cacans</i>			
	IS	IA	AA	Temp	IS	IA	AA	Temp
1	79.96	0.80	0.345	20.96	91.16	0.91	0.240	21.50
2	79.42	0.79	0.274	21.05	99.39	0.99	0.346	21.64
3	87.44	0.87	0.354	21.12	33.19	0.33	0.196	21.82
4	48.41	0.48	0.266	21.15	91.07	0.91	0.348	21.85
5	84.41	0.84	0.235	21.20	87.91	0.88	0.181	21.90
6	86.99	0.87	0.273	21.23	92.89	0.93	0.207	21.99
7	89.87	0.90	0.287	21.26	76.25	0.76	0.351	22.08
8	85.49	0.85	0.325	21.23	88.59	0.89	0.354	22.08
9	80.94	0.81	0.310	21.24	92.24	0.92	0.247	22.12
10	85.79	0.86	0.196	21.23	86.82	0.87	0.107	22.13
11	80.95	0.81	0.336	21.35	82.83	0.83	0.290	22.15
12	81.27	0.81	0.214	21.34	86.38	0.86	0.177	23.02
13	82.32	0.82	0.319	21.36	81.83	0.82	0.154	23.34
14	84.93	0.85	0.217	21.52	82.93	0.83	0.204	23.36
15	86.65	0.87	0.298	21.56	87.78	0.88	0.155	23.40

IS: g/100g de extrato seco; IA: g/g de extrato seco; Temp: °C

3.2.2 Total de polifenóis totais encapsulados**TABELA 3.5** Quantificação de Polifenóis totais, superficiais e microencapsulados nas microcápsulas de extratos de *A. crassiflora* e *A. cacans*.

		<i>Annona crassiflora</i>			<i>Annona cacans</i>			
		Total	Superficial	Polifenóis	Conc	Total	Superficial	Polifenóis
				encapsulados				Encapsulados
1	60	141.13	20.35	51.12	10	166.17	7.92	158.25
2	60	148.00	13.60	128.86	10	186.19	12.17	174.02
3	40	33.58	0.82	31.06	10	125.45	1.75	123.70
4	40	36.92	1.14	33.86	10	89.88	6.90	82.98
5	40	57.83	2.34	52.92	10	116.51	6.08	110.43
6	40	115.67	2.75	107.80	10	150.83	7.00	143.83
7	40	58.17	0.99	55.21	10	71.35	4.48	66.87
8	40	55.08	3.75	51.08	10	106.46	4.73	101.73
9	60	109.75	18.54	88.74	10	226.01	13.71	212.30
10	40	42.25	0.68	39.81	10	188.35	8.31	180.03
11	60	121.50	14.42	103.10	10	214.13	12.25	201.88
12	40	47.58	1.03	44.79	10	62.72	2.08	60.64
13	40	57.17	1.62	53.88	10	128.14	2.90	125.24
14	40	57.17	1.63	53.93	10	131.39	3.17	128.22
15	40	58.50	1.77	55.14	10	139.57	3.15	136.43

Resultados expressos em mgGAE/gcps, concentração em µg/mL

Maciel et al., (2019) obteve eficiência na microencapsulação de *A. muricata*, semelhante ao extrato hexânico, e relatou as vantagens da aplicação na indústria agrícola.

3.2.3 Atividade antioxidante das microcápsulas

Foi avaliada a atividade antioxidante das microcápsulas de acordo com o método ABTS. O melhor resultado obtido foi na Condição 9 do extrato de *A. crassiflora*, que obteve 0.954 µgTE/Lextrato em comparação com a quantidade de 1,886µgTE/Lextrato obtida com o extrato 100µg/mL sem encapsular. A condição 1 de *A. cacans*, apresentou 0.996µgTE/Lextrato, tendo o seu extrato bruto sem encapsular a 10µg/mL, o valor de 1,430µgTE/Lextrato, como foi apresentado na Tabela 3.2.

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

Cond	<i>A. crassiflora</i>	<i>A. cacans</i>
1	0.424	0.996
2	0.397	0.547
3	0.340	0.217
4	0.504	0.172
5	0.434	0.309
6	0.394	0.263
7	0.369	0.334
8	0.517	0.308
9	0.895	0.476
10	0.415	0.242
11	0.954	0.545
12	0.431	0.276
13	0.565	0.339
14	0.489	0.250
15	0.306	0.306

Resultados expressos em µgTE/Lextrato

4 CONCLUSÃO

O extrato hidroetanolicos das folhas de *A. crassiflora* e *A. cacans* tiveram boas condições de processo de encapsulamento com maltodextrina em Spray dryer, mantiveram a atividade antioxidante e os fenólicos totais que foram encontrados no extrato sem encapsular, obtiveram baixa atividade de água e boa solubilidade e absorção de água. Sendo assim espécies considerados promissoras para o processamento na produção de microcápsulas com aplicação em áreas da indústria, como por exemplo farmacêutica, de alimentos e cosmética.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, M., Akter, M. S., Lee, J. C., & Eun, J. B. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWTeFood Science and Technology*, 43, 1307-1312, 2010.
- Aliakbarian B., Paini M., Casazza A.A., Perego P. Effect of encapsulating agent on physical-chemical characteristics of olive pomace polyphenols-rich extracts, *Chemical Engineering Transactions*, 43, 97-102, 2015.
- Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199- 1200, 1958.
- 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.
- Coria-Téllez, A.V., Montalvo-González, E., Yahia, E.M., Obledo-Vázquez, E.N. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity *Arabian Journal of Chemistry*, 11, 662–691, 2018.
- 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. A microencapsulação a serviço da indústria alimentícia. São Paulo: Insumos, n. 25, p.30-36, 2013.
- 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*, v.50, p.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.
- Hirech, K., Payan, S., Carnelle, G., Brujes, L., & Legrand, J. Microencapsulation of an Insecticide by Interfacial Polymerization. *Powder Technology*, 130(1-3), 324-330, 2003.
- Maciel, A.G.S., Trindade, R.C.P. Basílio-Junior, I.D. Euzébio, A., Silva, J.P., Santos, L.A.T. Silva, E.S., Freitas, J.D., Nascimento, T.G. Microencapsulation of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) seed extract and lethal toxicity to *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) *Industrial Crops and Products*, 127, 251-259, 2019.
- 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.
- Ré, M.I. Microencapsulação—em busca de produtos ‘inteligentes’. *Ciência hoje*, 27(162), 24-29, 2000.

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*, v. 16, p. 26-30, 2000.

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

Silva, M.L.C., Costa, R.S., Santana, A.S., Koblitiz, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais, *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 31(3), 669-682, 2010

Silva, F.C ; Fonseca, C.R.; Alencar, S.M ; Thomazini, M. ; Balieiro, J.C.C.; Pittia, P. Favaro-trindade, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food and bioproducts processing*. v. 9, n. 1, p. 28–36, 2013.

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

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. Annoglabin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annonontacin 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.
- Couvreux, 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 Agrônômicas, 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.