

KAMILLE DALECK SPERA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, FOTOPROTETORA
E ANTIGLIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FRUTOS DE
ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANNONACEAE**

**ASSIS
2014**

KAMILLE DALECK SPERA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, FOTOPROTETORA
E ANTIGLIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FRUTOS DE
ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANNONACEAE**

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

Orientador(a): Prof^o Dr^o Regildo Márcio Gonçalves da Silva

ASSIS

2014

“Quanto maior for o obstáculo, maior será a glória de tê-lo superado.” (Jean Molière)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e clarear os caminhos.

Ao meu orientador Prof^o Dr^o Regildo Marcio Gonçalves da Silva, que desde o primeiro contato demonstrou confiança no meu trabalho, e com a sua dedicação e segurança, fez do nosso laboratório, nossa segunda casa.

Aos meus amigos de mestrado Pamela, Gustavo, Vanessa e Larissa, por estarmos juntos desde o primeiro momento, dividindo as angústias e alegrias, e principalmente as dúvidas e descobertas, especialmente à Patrícia Aparecida Figueiredo, por não medir esforços em compartilhar seus conhecimentos; minhas realizações são compostas por um pouco de cada um deles.

Ao pessoal do Fitolab, Valter, Gustavo Martins, Aníbal, Amábile, por ajudar sempre que possível e pela amizade durante a realização dos trabalhos.

Ao Prof^o Dr^o Rondinelli Donizetti Herculano, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras da UNESP de Assis pela liberação do seu laboratório para utilização sempre que necessário.

À Prof^a Dr^a Wilma Aparecida Spinosa, do Laboratório de Análise de Alimentos do DCTA e a Universidade Estadual de Londrina, pela disponibilidade da utilização do espectrofluorímetro.

Ao Prof^o Dr^o Vitório dos Santos Junior, Prof^o Dr^o André de Oliveira Dorini e Prof^a Dr^a Lucineia dos Santos que durante a graduação, foram os primeiros a me mostrar que a certeza do sucesso profissional e acadêmico se dá com esforço e dedicação, e me dedicaram sua ajuda sempre que possível.

Aos funcionários e pesquisadores da Floresta Estadual de Assis, pelo auxílio nas coletas, em especial a Dr. Elaine Akiko Honda, pela orientação, e por permitir que eu, acompanhando o seu trabalho sempre muito dedicada dentro da pesquisa, decidisse seguir pela carreira acadêmica.

Aos meus pais Julio e Katia, e ao meu irmão Allain, que são a minha razão, todos os meus passos dados, são por eles, e todas minhas conquistas são deles. Porque “enquanto houver vocês do outro lado, aqui do outro, eu consigo me orientar”.

Aos meus amigos, que durante esses dois anos sempre estiveram do meu lado, com paciência, ouviram muitas vezes ‘não’, suportaram minha angústia, sempre tentando tirar um sorriso do meu rosto, aos que restaram firmes e fortes comigo nessa caminhada, meu muito obrigada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro e institucional, concedido ao projeto 2012/22836-0.

Spera, Kamille Daleck; Silva, Regildo Márcio Gonçalves. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, FOTOPROTETORA E ANTIGLIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FRUTOS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANNONACEAE**. 2014. 55f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

RESUMO

O efeito oxidante provocado por radicais livres provenientes do metabolismo do O₂, ocorre naturalmente no organismo. O estresse oxidativo, aumento dessa condição, está correlacionado ao aparecimento de doenças, e pode ser intensificado devido à exposição a fatores externos, como a radiação solar, causando assim danos celulares significativos, que podem levar ao envelhecimento acelerado das células. Estudos com extratos vegetais têm demonstrado que os mesmos contêm compostos de interesse farmacológico para tratar e/ou prevenir os danos celulares causados pelo estresse oxidativo, resultando em uma ação fotoprotetora e antiglicante. Entre as espécies vegetais, a família Annonaceae possui representantes que apresentam compostos bioativos com diferentes atividades farmacológicas, tornando-as importantes para a análise de sua capacidade antioxidante e a relação com o potencial fotoprotetor e antiglicante. Partindo desse pressuposto, este estudo tem por objetivo avaliar o potencial antioxidante, fotoprotetor e antiglicante com ensaios *in vitro*, além de quantificar fenóis e flavonoides totais presentes nas amostras, e também realizar a caracterização por cromatografia de camada delgada para flavonoides, terpenoides e alcaloides dos extratos. Os resultados obtidos mostraram que *A. crassiflora* e *A. cacans* apresentaram os melhores valores na maioria dos testes de avaliação da capacidade antioxidante e entre os tipos de extratos avaliados, bem como para potencial fotoprotetor. O extrato da folha de *A. crassiflora* apresentou os melhores resultados para teste antiglicação, bem como para quantificação de fenóis. Dentre as polpas *A. muricata* que obteve o melhor resultado antiglicação. Para flavonoides tanto na quantificação, quanto na CCD, os melhores resultados foram encontrados na folha de *A. squamosa* e na polpa de *A. cacans*.

Palavras chave: Annonaceae; Antioxidantes; Fator de Proteção Solar (FPS); Araticum.

Spera, Kamille Daleck; Silva, Regildo Márcio Gonçalves. **EVALUATION OF ANTIOXIDANT, PHOTOPROTECTIVE AND ANTIGLYCATION ACTIVITY OF LEAFS AND FRUITS EXTRACTS IN SPECIES OF THE ANNONACEAE FAMILY.** 2014. 55f. Dissertation (Master in Bioscience). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

ABSTRACT

The oxidative effect caused by free radicals derived from O₂ metabolism occurs naturally in the human body. The oxidative stress, the increase of this condition, is correlated with the disease's appearance and can be intensified by the exposure of external factors, like solar radiation, thus causing significant cellular damage and also may cause faster aging of cells. Researches with plant extracts have shown that they may have compounds with pharmacological interesting to healing and/or preventing cellular damages caused by oxidative stress, those may results a photoprotective and antiglycation activity. Among the plant species, the Annonaceae family has representatives that contain bioactive compounds with different pharmacological activities, making them important to the study of antioxidative capacity and its relation with photoprotective and antiglycation potential. Then, this project is designed to measure the oxidative, photoprotective and antiglycation potential in in vitro assays, and also to quantify the total phenols, flavonoids and condensed tannins in the samples. Another target is also to characterize by phytochemistry the extracts with higher antioxidant activity. The results showed that *A. crassiflora* and *A. cacans* are best in most tests of antioxidant capacity and between types of extracts evaluated, as well as potential sunscreen. The leaf extract of *A. crassiflora* showed the best results for anti-glycation test, as well as quantification of phenols. Among the pulps *A. muricata* we got the best anti-glycation result. To quantify both the flavonoids, as in CCD, the best results were found in the leaf of *A. cacans*, and in the pulp of *A. squamosa*.

Keywords: Annonaceae; Antioxidants; Sun protection factor (FPS); Araticum.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 8 |
| REFERÊNCIAS | 16 |
| Capítulo 1 - Atividade antioxidante e fotoprotetora de espécies de Annonaceae | |
| 1 Introdução | 24 |
| 2 Materiais e métodos | 25 |
| 3 Resultados e discussão..... | 27 |
| 4 Conclusões | 33 |
| Capítulo 2 – Potencial antiglicante de extratos de espécies da família Annonaceae. | |
| 1 Introdução | 38 |
| 2 Materiais e métodos | 39 |
| 3 Resultados e discussão..... | 42 |
| 4 Conclusões | 51 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 55 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Estresse oxidativo e antioxidantes

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades celulares (ROESLER et al., 2007), entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também desencadeia a produção de radicais livres (POURMORAD et al., 2006; NAGMOTI et al., 2012), que 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 (GONÇALVES, 2008). Porém, o acúmulo desses radicais, chamado estresse oxidativo, tem sido associado ao desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas e Alzheimer (AMES et al., 1993, 1995; DIAZ, 1997; LANG e LOZANO, 1998; CHRISTEN, 2000).

Os antioxidantes são enzimas ou substâncias orgânicas capazes de agir contra os danos da oxidação (GONÇALVES, 2008; NIKI, 2010). Os mecanismos de ação antioxidante incluem: suprimir a formação de espécies reativas de oxigênio, ou pela inibição enzimática ou por quelar elementos envolvidos na produção de radicais livres; eliminar espécies reativas de oxigênio, ou apenas manter o mecanismo de defesa antioxidante regulado e protegido (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1998; ANDALLU et al., 2014).

1.2 Atividade fotoprotetora

O estresse oxidativo pode afetar o DNA em consequência da exposição à radiação ultravioleta (UV) (SHAAL et al., 2011) pois induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo peróxido de hidrogênio e radicais superóxido, proteínas e membranas celulares. Esse estresse é considerado a essência da mutagênese por radiação UVA, porém, pode ser causado também por UVB e luz visível (DAR e FRIDOVICH, 1994; RUNGER e KAPPES, 2008).

Como consequência deste processo ocorre um aumento na síntese de melanina e da peroxidação lipídica da célula. Além de iniciar a ativação de matrizes metaloproteinases (MMP) e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, esse aumento altera o colágeno e a elastina presente na matriz extracelular, o que culmina na degradação da integridade estrutural da pele (KULLAVANIJAYA e LIM, 2005; CHEN et al., 2012; JANSEN et al., 2013).

A radiação proveniente da luz solar é dividida em UVC (270-290nm), que não atinge a superfície da Terra, pois é filtrada pela camada de ozônio, UVB (290-320nm) e UVA, subdividida em UVA1 (340-400nm) e UVA2 (320-340nm) (KULLAVANIJAYA e LIM, 2005). Os filtros solares são substâncias com capacidade de refletir e/ou absorver as radiações ultravioletas que atingem a pele, podendo ser químicos, físicos ou de origem natural (VIOLANTE et al., 2008). Há uma necessidade crescente da utilização desses compostos como com capacidade de filtrar e proteger contra os danos provocados por esta exposição.

1.3 Envelhecimento e a formação de AGES

A pele expressa de forma visível a ação de fatores intrínsecos e/ou extrínsecos. Os fatores extrínsecos são os estímulos ambientais ou aqueles introduzidos pelo próprio indivíduo, entre eles, a exposição à radiação (PEREIRA, 2008; LANDAU, 2007). Já o envelhecimento intrínseco da pele, é o resultado de alterações biomoleculares no decorrer da vida biológica do indivíduo, como exemplo, o dano às fibras colágenas (MONTAGNER e COSTA, 2009).

A glicação ocorre com a adição enzimática de açúcares redutores e/ou seus produtos degradados reativos em grupos de proteínas (MAILLARD, 1912; THORNALLEY et al., 1999). É composta por dois diferentes estágios: no primeiro, o grupo amino da proteína reage com o grupo aldeído do açúcar fisiológico para iniciar a formação da base Schiff, que, com o tempo, é rearranjado, e forma os chamados produtos Amadori (HO et al., 2010). O segundo estágio, conhecido como estágio avançado da glicação, baseia-se na transformação dos

produtos Amadori em dicarbonil intermediários reativos, como metilglioxal (MGO) (HO et al., 2010).

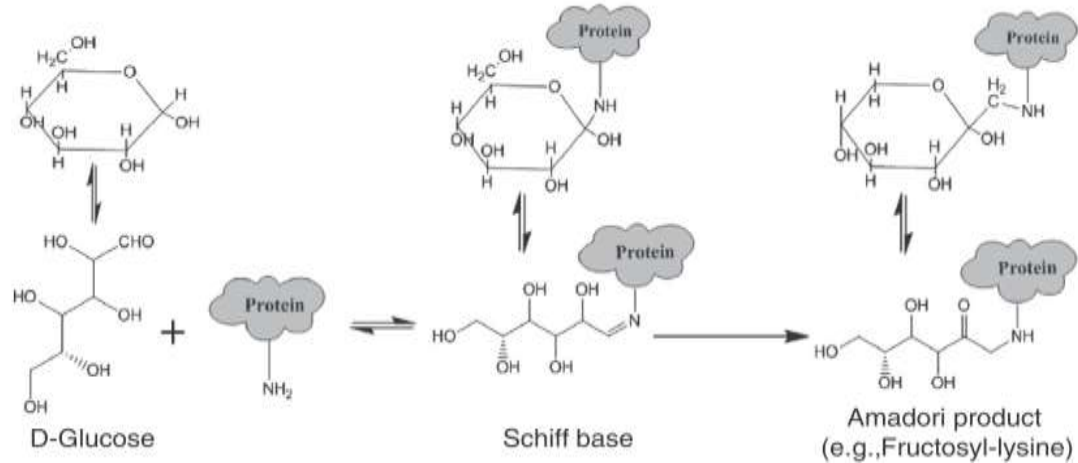


FIGURA 1. Representação do primeiro estágio de glicação (ANGUIZOLA et al., 2013).

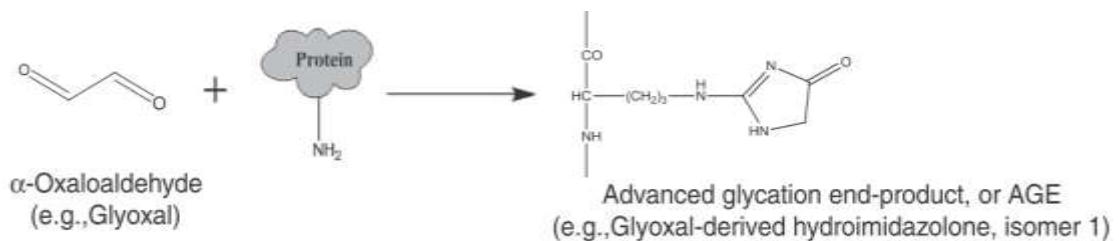


FIGURA 2. Representação do estágio avançado de glicação (ANGUIZOLA et al., 2013).

Os AGES causam modificações nos sítios de adesão celular (REKHTER, 1999), e essas alterações envolvendo aminoácidos provocam mudanças no perfil de distribuição de carga e nas interações dependentes de ligações eletrostáticas, como a fibrinogênese do colágeno (PROCKOP e FERTALA, 1998). Essas modificações químicas e estruturais, sendo reações com as cadeias laterais dos aminoácidos arginina, lisina e o aspartato, presentes no colágeno tipo I, e resultam na redução da renovação das células, promovendo e/ou acelerando o processo de envelhecimento (CHAPMAN et al., 1990; REISER et al., 1992).

Compostos bioativos provenientes de vegetais, podem auxiliar na prevenção e tratamento de doenças degenerativas, principalmente às correlacionadas com o envelhecimento, pois exercem ações específicas em alvos biológicos, incluindo a atividade

antioxidante, fotoprotetora e antiglicante (BOUSOVA et al., 2005; LUNCEFORD e GUGLIUCCI, 2005).

O envelhecimento é um processo natural e inevitável de todos os seres vivos. As pesquisas podem contribuir significativamente com a descoberta de novos compostos ativos capazes de minimizar ou retardar este processo natural (COSTA et al., 2012), principalmente quando o mesmo é acelerado e/ou agravado por fatores extrínsecos.

1.4 Compostos naturais bioativos

Extratos vegetais podem ser considerados antioxidantes naturais (ANDALLU et al., 2014), e possuem aplicabilidade principalmente devido ao potencial antioxidante proporcionado pelos flavonoides (ROSA et al., 2008; ZAID et al., 2009), e sua capacidade de sequestrar radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio, e quelante de metais (RICE-EVANS et al., 1996; GONZALO e ALONSO, 2002). Os flavonoides agem como protetores de células vegetais por sequestrar espécies reativas de oxigênio produzidas pela radiação UV necessária à fotossíntese (PIETTA, 2000).

Outros compostos naturais que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, tocoferóis, fosfolipídios e esteróis (ROESLER, 2007). Compostos com capacidade antioxidante, como polifenóis, tem sua ação fotoprotetora comprovada em análises fisiológicas (KIM e KIM, 2003; RUDNICKI et al., 2007; HUANG et al., 2008);

A analogia entre princípios ativos naturais e fotoprotetores sintéticos, apontando uma possível ação de filtro solar, foi comprovada, e partindo desse pressuposto, Violante et al. (2008) propuseram que os mesmos podem agir em sinergismo com filtros solares sintéticos, potencializando seu efeito e assim evitar e/ou amenizar os impactos dos raios UV sobre o

DNA, que além do fotoenvelhecimento, podem desenvolver potencial cancerígeno ((RAMOS et al., 1996; WULF et al., 2004).

Compostos vegetais também apresentam propriedades antioxidantes e hipoglicemiantes, no qual pode estar baseado sua atividade antiglicante (HSIEH et al., 2005, 2007). As investigações de compostos naturais, principalmente de origem vegetal, já consagrados na literatura científica pelo seu potencial terapêutico, podem auxiliar significativamente nesse processo, fornecendo meios de evitar o envelhecimento precoce e/ou minimizar os danos provocados pela idade, além da possível descoberta de novos compostos antioxidantes e fotoprotetores (ROESLER et al., 2007).

1.5 Annonaceae

A família Annonaceae é uma família pantropical de árvores, arbustos e lianas, que desempenham um papel ecológico importante em termos de diversidade de espécies, principalmente em ecossistemas de floresta tropical (COUVREUR et al., 2012). Até o momento são validamente 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, distribuídos predominantemente na Amazônia, e secundariamente na Mata Atlântica (LOBÃO et al., 2005).

Economicamente a família é de importância considerável, como fonte de frutos comestíveis (LEBOUEF et al., 1982) sendo as mais exploradas *Annona muricata* L. (graviola), *Annona squamosa* Delile (fruta-do-conde), *Annona reticulata* Sieber ex A.DC. (condessa), *Annona crassiflora* Mart. (marolo), e o híbrido atemoia (*A. cherimola* x *A. squamosa*) (TELLES et al., 2003), devido às propriedades nutricionais dos frutos que são consumidos *in natura*, e ao fato de apresentarem como característica, sabor adocicado e perfume característico (LORENZI e MATOS, 2002; 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 relevante ao mercado são bem conhecidas em comunidades locais.

Cerca de 320 produtos naturais secundários provenientes de 150 espécies pertencentes a 41 gêneros foram catalogados (LEBOUEF et al., 1982). Na formação da biodiversidade de substâncias químicas das Annonaceae estão: substâncias aromáticas, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, substâncias benzênicas, catequinas, proantocianidinas, óleos essenciais, terpenos, esteroides, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, vitaminas, carotenos, saponinas, entre outros (LUNA, 2006; LIMA, 2007; REIS, 2011).

Flavonoides encontrados no gênero *Annona* foram flavonas (luteonina) e flavonóis (canferol, quercetina, ramnetina, rutina e isorramnetina) (RINALDI, 2007). Na China, algumas Annonaceae são amplamente cultivadas e utilizadas como inseticidas e parasiticidas (CHEN et al., 2004). Existem comprovadas atividades anti-helmíntica, antimalárica, antimicrobiana, antiprotozoária, pesticida e antioxidante devido às acetogeninas (ALALI et al., 1999; JULIÁN-LOAEZA et al., 2010).

Estudos farmacológicos utilizando espécies de anonáceas se intensificaram, em grande parte, devido à descoberta das acetogeninas, classe de compostos naturais com grande variedade de atividades biológicas (RUPPRECHT et al., 1990). Foi detectada citotoxicidade seletiva das acetogeninas especificamente em células cancerosas (WU, 2006), e caracterizadas como promissoras no potencial leishmanicida (NOVA, 2008). As acetogeninas atuam como potentes inibidoras da respiração mitocondrial e, interferindo na produção de ATP induzem a apoptose (ZENG et al., 1996, YANG et al., 2009).

1.5.1 *Annona muricata*

A. muricata, ou graviola, tem sua importância principalmente devido a diversos compostos aromáticos voláteis, particularmente ricos, em sua polpa formada por 80-81% de

água, e açúcares, sendo cerca de 67,2-69,9% de sólidos totais presentes (SÁNCHEZ-NIEVA, 1970), além de vitaminas, pectina, potássio, sódio, cloreto de cálcio e citrato (BADRIE e SCHAUSS, 2009).

Devido ao sabor adocicado, é amplamente comercializada na forma de sucos (AWAN et al., 1990). *A. muricata* demonstrou atividade farmacológica em suas diferentes partes (SÓLIS-FUENTES et al., 2011); a decocção das folhas é utilizada para matar piolhos e percevejos; o chá, é bem conhecido por ter propriedades sedativas; a polpa utilizada como antiespasmódico, emético, e sudorífico, e o suco da fruta, administrado por via oral para hematuria, problemas no fígado e uretrite (PADMA et al., 1997, 2001).

1.5.2 *Annona squamosa*

Popularmente conhecida como fruta-do-conde, não é nativa brasileira e sim, das ilhas do Caribe, onde era chamada de “*anón*” pelos espanhóis que se encantaram com a sua polpa no século XVI (BRITO et al., 2008), devido ao fato de apresentar aroma agradável e doce, o que a tornou atrativa para a industrialização e apropriada para elaboração de bebidas fermentadas, além de muito aceita na fabricação de sorvetes (KAVATI et al., 1997). Alguns trabalhos relatam que na polpa da fruta e sementes há a presença de açúcares, ácidos orgânicos e ácido ascórbico, sendo a maioria dos compostos monoterpenos e sesquiterpenos (ANDRADE et al., 2001). Nas sementes, uma concentração muito alta de óleos voláteis foi encontrada (ANSARI et al., 1985), identificados e isolados 6 componentes desses óleos com comprovada atividade antimicrobiana (CHAVAN et al., 2006; RAHMAN et al., 2005).

1.5.3 *Annona crassiflora*

O Marolo (*A. crassiflora*) (Figura 3) apresenta grande apelo sensorial, tais como cor, aroma e sabor, além de ser muito eficiente nutricionalmente, apresentando altos níveis de

vitaminas do complexo B, como a tiamina (0,04mg/100g) e riboflavina (0,07mg/100g), bem como ácido ascórbico (21mg/100g) e carotenoides (5,9µg/g) (AGOSTINI et al., 1995).



FIGURA 3. Frutos de *A. crassiflora* (SPERA, 2013)

Apesar destas características, o marolo fresco na fase maduro ainda é pouco consumido, porém já comprovado que apresenta características físico-químicas adequadas para a utilização como ingrediente alimentar nas preparações de sucos, doces e sorvetes, promovendo a sua disponibilidade para uma parcela maior de pessoas (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).

1.5.4 *Annona cacans*

Na alimentação humana, o fruto do araticum-cagão (Figura 4) não é muito apreciado *in natura*, por ter efeito diarreico (SAITO et al., 1994). No entanto, são aromáticos, com polpa doce e abundante (MATTOS, 1978). Os frutos são saborosos, mas a ação pode ser tão drástica, que essa propriedade específica lhe ficou consagrada até na denominação popular como na botânica (KUHLMANN e KUHN, 1947).



FIGURA 4. Frutos de *A. cacans* (SPERA, 2013)

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial antioxidante nos extratos da polpa do fruto e folhas de *Annona crassiflora* M., *Annona muricata* L., *Annona squamosa* L. e *Annona cacans* W. por meio dos testes DPPH, FRAP, (TBARS), e avaliar *in vitro* a capacidade fotoprotetora, de acordo com análise espectrofotométrica. Ainda é objetivo deste trabalho, avaliar o potencial antiglicação pelos testes (BSA)/glicose e pelo teste de mobilidade reativa de proteínas por eletroforese (MRE); realizar a quantificação de fenóis e flavonoides totais, e a análise cromatográfica quanto à flavonoides, alcaloides e terpenoides dos extratos que apresentarem melhores resultados.

3. REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, T. D.; CECCHI, H. M.; BARRERA, A. D. Chemical characterization of the oil and pulp of marolo (*Annona coriaceae*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 45, p. 237-241, 1995.
- ALALI, F. Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n.3, p. 504-540, 1999.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 7915-7922, 1993.

AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILET, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 5258-5265, 1995.

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**, v. 4, p. 10-17, 2014.

ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. D. G. B.; MAIA, G. S.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the amazon. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 2, p. 227-232, 2001.

ANGUIZOLA, J.; MATSUDA, R.; BARNABY, O. S.; HOY, K. S.; XA, C.; DEBOLT, E., KOKE, M.; HAGE, D.S. Glycation of human serum albumin. **Clinica Chimica Acta**, v. 425, p. 64-79, 2013.

ANSARI, M. H.; AFAQUE, S.; AHMAD, M. Isoricinoleic acid in *Annona squamosa* seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 62, n. 10, p. 1514, 1985.

AWAN, J. A.; KAR, A.; UDOUDOH, P. J. Preliminary studies on the seeds of *Annona muricata* Linn. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 30, p. 163-168, 1980.

BADRIE, N.; SCHAUSS, A. G. Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, Nutritional Value, Medicinal Uses, and Toxicology In : WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. (eds.). **Bioactive Foods in Promoting Health**. Academic Press, Oxford. p.621-643, 2009.

BAILEY, A. J.; PAUL, R. G.; KNOT, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 106, n. 12, p. 1-56, 1998.

BOUSOVA, I.; MARTIN, J.; JAHODAR, L.; DUŠEK, J.; PALIČKA, V.; DRŠATA, J. Evaluation of *in vitro* effects of natural substances of plant origin using a model of protein glycosylation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 937-957, 2005.

BRITO, H. O.; NORONHA, E. P.; FRANÇA, L. M.; BRITO, L. M. O.; PRADO, M. S. A. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 3, p. 180-184, 2008.

BROWNLEE, M. Negative consequences of glycation. **Metabolism**, v. 49, n.1, p. 9-13, 2000.

CHAPMAN, J. A.; TZAPHLIDOU, M.; MEEK, K. M. The collagen fibril: a model system for studing the staining and fixation of a protein. **Electron Microscope Review**, Oxford, v. 3, n.1, p. 143-182, 1990.

CHAVAN, M. J.; SHINDE, D. B.; NIRMAL, S. A. Major volatile constituents of *Annona squamosa* L. **Natural Products Research**, v. 8, p. 754-757, 2006.

CHEN, C. H.; HSIEH, T. J.; LIU, T. Z.; CHERN, C. L.; HSIEH, P. Y.; CHEN, C. Y. Annoglabayin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annomontacin from the fruits of *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, n. 67, p. 1942-1946, 2004.

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, p. 1013-1024, 2012.

CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer's disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 621S-629S, 2000.

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**, v. 44, p. 2385-2390, 2011.

COSTA, D. A.; OLIVEIRA, G. A. L.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do compost ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 567-575, 2012.

COUVREUR, T. L. P.; MAAS, P. J. M.; MEINKE, S.; JOHNSON, D. M.; KESSLER, P. J. A. Keys to the genera of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, p. 74-83. 2012.

DARR, D.; FRIDOVICH, I. Free radicals in cutaneous biology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 671-675, 1994.

DIAZ, M. N.; FREI, B.; KEANEY, J. F. Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease . **The new England Journal of Medicine**, v. 337, n. 6, p. 408-416, 1997.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de ciências farmacêuticas - Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, São Paulo, 2008.

GONZALO, J. C. R.; ALONSO, M. G. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. **Alimentación, Nutrición y Salud**, v.9, n.2, p.31-38, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford: Oxford University Press**, Londres, 1998.

HO, S. C.; WU, S. P.; LIN, S. M.; TANG, Y. L. Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. **Food Chemistry**, v. 122, p. 768-774, 2010.

HSIEH, C. L.; LIN, Y. C.; KO, W. S.; PENG, C. H.; HUANG, C. N.; PENG, R. Y. Inhibitory effect of some selected nutraceutical herbs on LDL glycation induced by glucose and glyoxal. **Journal of Etnopharmacology**, p.102-357, 2005.

HSIEH, C. L.; PENG, C. H.; CHYAU, C. C.; LIN, Y. C.; WANG, H. E.; PENG, R. Y. Low-densitylipoprotein, collagen, and thrombin models reveal that *Rosemarinus officinalis* L. exhibits potent antiglycative effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 2855-2884, 2007.

HUANG, S. M.; CHUANG, H. C.; WU, C. H.; YEN, G. C. Cytoprotective effects of phenolic acids on methylglyoxal-induced apoptosis in Neuro-2A cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, p. 932-940, 2008.

JANSEN, R.; WANG, S. Q.; BURNETT, M.; OSTERWALDER, U.; LIM, H. W. Photoprotection : Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agentes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, p. 853e1-853e12, 2013.

JOLY, A. B. **Botânica, introdução a taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1979. 550p.

- JULIÁN-LOAEZA, 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**, v. 34, n. 2, p. 1262-1268, 2010.
- KAVATI, R. Melhoria em fruta-do-conde. In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H. **Anonáceas-Produção e mercado**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia: Vitória da Conquista, 1997, p.47-54.
- KIM, H.Y.; KIM, K. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1551-1586, 2003.
- KUHLMANN, M.; KUHN, E. **A flora do Distrito de Ibiti**. 221p. São Paulo: Instituto de Botânica, 1947.
- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 937-958, 2005.
- 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**, 2014.
- LANDAU, M. Exogenous factors in skin aging. **Current Problems in Dermatology**, v. 35, p. 1-13, 2007.
- LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 16, p. 111-114, 1998
- LEBOUEF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, K.; MUKERJEE, B.; MUKERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, pp. 2783-2813, 1982.
- LI, H.; NAKAMURA, S.; MORITA, T.; SUZUKI, M.; PISCHETSRIEDER, M.; NIWA, T. N²-carboxyethyl-2'-deoxyguanosine, a DNA glycation marker, in kidneys and aortas of diabetic and uremic patients. **Kidney International**, v. 69, p. 388-392, 2006.
- LOBÃO, A. Q.; ARAUJO, D. S. D.; KURTZ, B.C. Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 85-96, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002, 544 p.
- LIMA, M. D. **Perfil cromatográfico dos extratos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência**. 2007. 102f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2007.
- LUNA, J. S. **Estudo de Plantas Bioativas**. 2006. 254f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2006.
- LUNCEFORD N.; GUGLIUCCI A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, p. 419-431, 2005.

- MAILLARD, L.C. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 154, p. 66–68, 1912.
- MATTOS, J.R. **Frutos indígenas comestíveis do Rio Grande do Sul**. 37p. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis" AP", 1978.
- MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p.263-269, 2009.
- NAGMOTI, D. M.; KHATRI, D. K.; JUVEKAR, P. R.; JUVEKAR, A. R. Antioxidant activity and free radical-scavenging potential of *Pithecellobium dulce* Benth. Seed extracts. **Free radicals and antioxidants**, v.2, n.2, 2012.
- NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 503-515, 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.; BÉRNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; OLIVEIRA, D. B.; Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **Vértices**, v. 14, n. 1, p. 38-57, 2012.
- PADMA, P.; CHANSOURIA, J. P. N.; KHOSA, R. L. Effect of alcohol extract of *Annona muricata* on cold immobilization stress induced tissue lipid peroxidation. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 326–327, 1997.
- PADMA, P., CHANSAURIA, J. P. N., KHOSA, R. L.; RAY, A. K. Effect of *Annona muricata* and *Polyalthia ceradoides* on brain neurotransmitters and enzyme monoamine oxidase following cold immobilization stress. **Journal of Natural Remedies**, v. 1, p. 144–146, 2001.
- PEREIRA, S. Dermatoses no idoso. In: ROTTA, O. **Guia de Dermatologia: clinica, cirurgica e cosmetica**. São Paulo: Manole, p. 567-591, 2008.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- POURMORAD, F.; HOSSEINIMEHR, S. J.; SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n. 11, p. 1142-1145, 2006.
- PROCKOP, D.J.; FERTALA, A. Inhibition of the self-assembly of collagen into fibrils with synthetic peptides. Demonstration that assembly is driven by specific binding sites on the monomers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15598-15604, 1998.
- RAHMAN, M. M.; PARVIN, S.; HAQUE, M. E.; ISLAM, M. E.; MOSADDIK, M. A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seed of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 484-489, 2005.
- RAMOS, M. F.; SANTOS, E. P.; BIZARRI, C. H.; MATTOS, H. A.; PADILHA, M. R.; DUARTE, H. M. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 18, p. 87-101, 1996.

REIS, C. N. *Annona muricata: análise química e biológica dos frutos de gravioleira*. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2011.

REISER, K. M.; AMIGABLE, M. A.; LAST, J. A. Nonenzymatic glycation of type I collagen: the effects of aging on preferential glycation sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 34, p. 24207-24216, 1992.

REKHTER, M. D. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. **Cardiovascular Research**, v. 41, n. 2, p. 376-384, 1999.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RINALDI, M. V. N. *Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de Annona hypoglauca Mart.* São Paulo, 125p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ROESLER, L.G.; MALTA, L.C.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de Frutas do Cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p. 53-60, 2007.

ROSA, M. B.; OLIVEIRA, T. G.; CARVALHO, C. A.; SILVA, F. D.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; PERES, R. L. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea var. capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum runderale* (Jacq.) cass e *Sonchus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 1, p. 101-110, 2008.

RUDNICKI, A. M; OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. V.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, p.100-719, 2007.

RUNGER, T. M.; KAPPES, U. P. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 24, p. 2-10, 2008.k

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: A review. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 237-278, 1990.

SAITO, M. L.; ALVARENGA, M. A. Alkaloids from *Annona cacans*. **Fitoterapia**, v. 65, n. 1, p. 87, 1994.

SÁNCHEZ-NIEVA, F. Frozen soursop puree. **Journal of Agriculture University**, Puerto Rico, v. 54, p. 220–226, 1970.

SHAAL, L. Al.; SHEGOKAR, R.; MÜLLER, R. R.; Production and characterization of antioxidant apigenin nanocrystals as a novel UV skin protective formulation **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, pp 133-140, 2011.

SÓLIS-FUENTES, J. A. S.; HERNÁNDEZ-MEDEL, M. R.; DURÁN-DE-BAZUÁ M. C. Soursop(*Annona muricata* L.) Seeds, therapeutic and possible food potential. **Nuts and seeds in health and disease prevent**, p. 1045-1052, 2011.

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**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

THORNALLEY, P. J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **Biochemical Journal**, v. 344, p. 109–116, 1999.

VIOLANTE, I. M. P.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F. S.; SANTOS, R. A. N.; FERRARI, M. Estudo preliminar da atividade fotoprotetora *in vitro* de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 3, p. 175-179, 2008.

WIDMER, R.; ZIAJA, I.; GRUNE, T. Protein oxidation and degradation during aging: Role in skin aging and neurodegeneration. **Free Radical Research**, v. 40, n. 12, p. 1259-1268, 2006.

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

WULF, H. C.; SANDBY-MOLLER, J.; KOBAYASI, T.; GNIADOCKI, R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v. 35, p. 185-91, 2004.

YANG, B.; YANG, H.; LI, X.; TANG, Y.; ZHANG, N.; CHEN, J. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC-DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 49, n. 1, p.140-144, 2009.

ZAID, M. A.; AFAQ, F.; SYED, D. N.; MUKHTAR, H. Botanical Antioxidants for Protection Against Damage from Sunlight. **Nutritional Cosmetics**, p. 161-183, 2009.

ZENG, L.; WU, F. E.; OBERLIES, N. H.; MCLAUGHLIN, L. Five New Monotetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 1035-1042, 1996.

CAPÍTULO I

Atividade antioxidante e fotoprotetora de espécies de Annonaceae

Kamille D. Spera^a, Regildo M. G. Silva^a

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

RESUMO

O estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação. A radiação ultravioleta é uma das responsáveis por causar danos cumulativos à pele podendo evoluir para patologias mais severas como, por exemplo, o câncer de pele. Estudos com extratos vegetais têm demonstrado que estes podem conter metabólitos capazes de tratar e/ou prevenir esses danos provocados pela exposição crônica a radiação ultravioleta e ao aumento do número de radicais livres. A família Annonaceae possui representantes que apresentam compostos bioativos com diferentes propriedades farmacológicas. No presente trabalho foi determinada a capacidade antioxidante, por meio dos testes de Sequestro do radical livre DPPH, Redução do Ferro (FRAP) e Inibição da peroxidação lipídica (TBARS), e realizada a análise da capacidade fotoprotetora, com a varredura dos extratos em espectrofotômetro no comprimento de onda de incidência da região UVB (290-320), de extratos hidroetanólicos e etanólicos de folhas e polpa do fruto de *Annona crassiflora*, *Annona squamosa*, *Annona muricata*, *Annona cacans*. Os resultados obtidos mostraram que *A. crassiflora* e *A. cacans* apresentaram os melhores valores na maioria dos testes de avaliação da capacidade antioxidante e entre os tipos de extratos avaliados, bem como para potencial fotoprotetor.

Palavras Chave: DPPH; FRAP; TBARS; radicais livres; UVB; *Annona*.

1 Introdução

A família Annonaceae compreende cerca de 128 gêneros e 2.300 espécies, sendo *Annona* o gênero mais representativo, com cerca de 120 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Joly, 1979; Maas et al., 2001; Lorenzi e Matos, 2002). É considerada economicamente importante, devido espécies como *Annona muricata* (graviola) e *Annona squamosa* (fruta-do-conde) terem seus frutos consumidos *in natura* (Telles et al., 2003; Araya, 2003). Além destas, espécies silvestres menos conhecidas como *Annona crassiflora* (marolo) e *Annona cacans* (araticum cagão) (Lorenzi e Matos, 2002) apresentam possível potencial nutricional e farmacológico para serem empregadas na busca de compostos ativos.

Estudos fitoquímicos da família Annonaceae já catalogaram cerca de 320 produtos secundários, das mais variadas partes da planta, oriundos de 150 espécies desta família (Alali et al., 1999). Os principais grupos de compostos químicos presentes em extratos preparados de cascas (Chen et al., 2000), folhas e frutos (Chang et al., 1998) são acetogeninas, alcaloides isoquinolínicos e os diterpenos (Oliveira et al., 2002).

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades celulares (Roesler et al., 2007). Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais livres (Ferreira e Matsubara, 1997, Pourmorad et al., 2006; Nagmoti et al., 2012). O estresse oxidativo, aumento do número desses radicais, está diretamente relacionado a doenças degenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, porém em sistemas biológicos existe um equilíbrio entre os fatores que promovem a oxidação e os mecanismos antioxidantes de defesa (Roesler et al., 2007; Gonçalves, 2008).

A radiação solar, proveniente principalmente da luz solar, é dividida em UVC (270-290nm), UVB (290-320nm) e UVA - UVA1 (340-400nm) e UVA2 (320-340nm) (Kullavanijaya e Lim, 2005). Os danos do estresse oxidativo ocorrem principalmente na membrana celular, e podem afetar o DNA também através da exposição à radiação UVA e UVB (Ferelli e Dedalo, 2006). Para evitar e/ou amenizar os impactos da exposição, que além do foto-envelhecimento, pode ocasionar câncer de pele, é recomendado a utilização de filtros solares, para evitar que estes tipos de radiações sejam absorvidos pela pele (Wulf et al., 2004).

Devido à eficiência incompleta do sistema de defesa endógeno humano, a influência de fatores externos, tais como, a poluição, a radiação UV, o fumo, bem como, a existência de alguns processos fisiopatológicos (envelhecimento, obesidade), se dá a importância de compostos bioativos oriundos das plantas, que podem ajudar a superar tais deficiências e

também promover a proteção, a prevenção ou redução dos efeitos causados pelo estresse oxidativo (Pietta, 2000; Huang et al, 2005).

Estudos *in vivo* confirmam o potencial antifotocarcinogênico em polifenóis e foi verificada diminuição em eritemas, induzidos por UV, em mulheres que consomem chá-verde (Katiyar e Elmets, 2001; Katiyar, 2003; Heinrich et al., 2011). O consumo humano do chocolate, por ser rico em flavonoides, também mostrou proteção contra raios ultravioletas (Williams et al., 2009; Jansen et al., 2013).

Este trabalho teve por objetivo avaliar extratos da polpa do fruto e folhas de *A. crassiflora*, *A. muricata*, *A. squamosa* e *A. cacans*, quanto ao seu potencial antioxidante por meio dos testes de Sequestro de radical livre estável DPPH, Método de Redução do Ferro (FRAP) e TBARS, e avaliar *in vitro* a capacidade fotoprotetora, de acordo com análise espectrofotométrica.

2 Materiais e Métodos

2.1 Coleta e preparação do material vegetal

As folhas e frutos de *Annona crassiflora* M., *Annona muricata* L., *Annona squamosa* L. e *Annona cacans* W. foram coletadas no município de Assis/São Paulo/Brasil (latitude: 22°39 '42"S, longitude: 50°24'44"W, altitude: 546m), com colaboração do Instituto Florestal do Estado de São Paulo, localizado na cidade de Assis/SP. As folhas das espécies avaliadas foram submetidas a secagem em estufa de ar circulante ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), logo após pulverizado em moinho de facas. Os frutos foram despolpados e as polpas congeladas a -18°C e liofilizadas.

2.2 Preparação dos Extratos

Os extratos hidroetanólicos (70%) e etanólicos foram preparados na proporção de 1:10 (p/v) em água destilada, submetidos à agitação mecânica por um período de 24 horas em temperatura ambiente. O resíduo vegetal foi retirado por filtragem a vácuo e reextraído por duas vezes. Os extratos obtidos foram levados ao rotaevaporador para eliminação completa do álcool. Para o preparo do extrato hidroetanólico, a solução aquosa resultante foi congelada e posteriormente liofilizado para obtenção do extrato seco. Ambos foram armazenados em frasco de vidro âmbar, protegidos da luz.

2.3 Atividade Antioxidante

2.3.1 Capacidade sequestradora de radicais livres DPPH

A atividade antioxidante dos extratos para o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) utilizaram metodologia descrita por Maniam et al., 2008. Os experimentos foram realizados em triplicata para fins estatísticos, utilizando a solução de 1mL de tampão acetato (pH 5,5 e 100mM), 1,25mL de etanol P.A., 250µL de solução de DPPH (500µM) e 50µL das amostras. Os extratos reagiram com o radical DPPH por um período de 30 minutos em ambiente de pouca luminosidade e em seguida foram submetidos ao espectrofotômetro UV-Vis a um comprimento de onda de 517nm. O cálculo da atividade antioxidante foi realizado de acordo com a fórmula: Atividade antioxidante (%)= $[(A_{\text{CONTROLE}} - A_{\text{AMOSTRA}}) / A_{\text{CONTROLE}}] \times 100$, onde A_{AMOSTRA} é a absorbância das amostras após 30 minutos e A_{CONTROLE} é a absorbância do DPPH, ambos a 517nm.

2.3.2 Capacidade 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, por meio da mistura na concentração de 10:1:1 de tampão acetato (300mM, pH 3,6), solução TPTZ (10mM TPTZ em 40mM HCl) e FeCl₃ (20mM) em solução aquosa, respectivamente. Uma alíquota de 90µl da solução de extrato foi adicionado a 270µl de água destilada e 2,7mL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo a 595nm e o espectrofotômetro zerado com o reagente FRAP. Os resultados foram expressos em µM equivalente de Trolox (ET) por g de extrato seco.

2.3.3 Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)

A determinação do conteúdo de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Esterbauer e Cheeseman, 1990), foi realizada para quantificar o nível de inibição da peroxidação lipídica de acordo com metodologia descrita por Costa et al. (2012). Gema de ovo foi usada como substrato rico em lipídios (Guimarães et al., 2010), foi homogeneizada (1%, w/v) em tampão fosfato 50mM (pH 7,4). Deste homogenato, 0,5mL foi sonicado e com 0,1mL dos extratos (1000 µg/mL) ou controle positivo (Trolox 140 µg/mL). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH; 0,12 M), durante 30 min a 37°C. Após o resfriamento, foi adicionado 0,5mL de ácido tricloroacético (15%) e 0,5mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecida a 97°C por 15 minutos para obtenção da cor rosa. As amostras foram centrifugadas com 1mL de n-butanol a 1200 rpm durante 10 min. Após o resfriamento, as absorbâncias dos sobrenadantes dos tubos

foram medidas a 532 nm utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS: $(A_{\text{CONTROLE}} - A_{\text{AMOSTRA}} \times 100 / A_{\text{CONTROLE}})$. Onde A_{CONTROLE} é a absorbância obtida apenas com AAPH sozinho e A_{AMOSTRA} , a absorbância das amostras com extrato ou com controle positivo.

2.4 Atividade Fotoprotetora

2.4.1 Determinação do comprimento de onda máximo (λ max.) e da absorbância máxima (A max.) dos extratos de folhas e polpa das espécies

Para determinação do comprimento de onda máximo (λ max.) e da absorbância máxima (A max.), os extratos secos foram diluídos em álcool etílico absoluto PA na concentração de 1000 μ g/mL e foi realizada a varredura entre os comprimentos de onda de 290 a 320nm com intervalos de 5nm em espectrofotômetro com cubeta de quartzo (1,0cm caminho óptico), para verificar a absorção na região ultravioleta B (UVB).

Foi utilizado álcool etílico absoluto PA como branco. Logo após foi realizada a análise das áreas sob as curvas encontradas na varredura dos extratos em comparação com área de varredura do filtro padrão (Metoxicinamato de Octila, Sigma[®]) de acordo com o descrito por Rosa et al. (2008) e Velasco et al. (2011).

3 Resultados e Discussão

3.1 Avaliação antioxidante

3.1.1 Sequestro do radical livre estável DPPH

Para a avaliação da porcentagem de atividade sequestradora do radical DPPH (Tabela 1) foram analisados os resultados dos extratos na concentração de 250 μ g/mL.

Em *A. muricata*, a maior atividade foi apresentada em ambos os extratos hidroetanólicos, tendo como resultado o da polpa, 5,29%, e o da folha, 6,52%, considerada baixa atividade antioxidante como já havia sido relatada por Luna et al. (s.d.). Quanto à *A. squamosa*, esta, apresentou melhores atividades nos extratos hidroetanólico da polpa, com 20,74%, sendo o melhor resultado apresentado entre as polpas das espécies avaliadas, e hidroetanólico da folha, 13,95%.

Em *A. crassiflora*, o extrato hidroetanólico da polpa apresentou melhor resultado, com 11,70%, e a etanólico da folha, com resultado de 78,48%, foi o extrato que apresentou melhor resultado entre as espécies testadas, não diferindo estatisticamente do resultado do padrão ácido gálico (80%), corroborando com o relatado por Lage (2011), que mostrou que extratos de folha de *A. crassiflora* apresentaram atividade antioxidante utilizando os métodos de

DPPH e β -caroteno. Entre os metabólitos secundários já encontrados ou detectados no gênero que possuem atividade antioxidante, destacam-se os flavonoides, tais como a quercetina, as acetogeninas, isoramnetina, canferol e seus derivados C- ou O- glicosídeos (Lage, 2014).

A. cacans teve como melhor potencial antioxidante ambos os extratos etanólicos, tendo a polpa apresentado 16,01% e a folha 27,04%. O extrato hidroetanólico da polpa de *A. cacans* não mostrou atividade detectada pelo teste.

TABELA 1. Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH (%) dos extratos hidroetanólico e etanólico da polpa de *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. crassiflora* e *A. cacans*. (média e desvio padrão)

| | | <i>A. muricata</i> | <i>A. squamosa</i> | <i>A. crassiflora</i> | <i>A. cacans</i> |
|-----------------------|----------------|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------|
| Polpa | Hidroetanólico | 5,29±0,45 | 20,74±2,06 | 11,70±0,84 | nd |
| | Etanólico | 2,07±0,71 | 6,33±0,78 | 4,62±0,27 | 16,01±2,70 |
| Folha | Hidroetanólico | 5,15±0,79 | 13,95±2,13 | 76,81±1,81 | 11,48±0,73 |
| | Etanólico | 6,52±1,20 | 10,95±0,27 | 78,48±0,56 | 27,04±1,54 |
| Ácido gálico (padrão) | | 80,00±1,61 | 80,00±1,61 | 80,00±1,61 | 80,00±1,61 |

nd=atividade não detectada pelo teste até a concentração máxima utilizada.

Substâncias antioxidantes presentes nos extratos reagem com o DPPH, que é um radical estável, e converte-o em 2,2-difenil-1-picril hidrazina. O grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato. 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% (Roesler et al., 2007). Com o cálculo do EC50 a partir da equação da reta de cada extrato, os extratos que apresentaram menor valor de EC50 entre as amostras analisadas (Tabela 2), de cada espécie, foram os extratos hidroetanólico da folha de *A. crassiflora* (EC50= 151,80), e entre as polpas, etanólico de *A. cacans* (EC50=1202,40), sendo o valor do padrão de referência Trolox (EC50= 118,37).

TABELA 2. Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH (EC50) dos extratos hidroetanólicos e etanólicos da polpa e folhas de *A. crassiflora*, *A. squamosa*, *A. muricata* e *A. cacans* e do padrão Ácido Gálico.

| | | <i>A. muricata</i> | <i>A. squamosa</i> | <i>A. crassiflora</i> | <i>A. cacans</i> |
|-----------------------|----------------|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------|
| Polpa | Hidroetanólico | 3197,71 | 1940,18 | 2061,05 | * |
| | Etanólico | * | * | 3478,83 | 1202,40 |
| Folha | Hidroetanólico | 3411,16 | 668,63 | 151,80 | 857,11 |
| | Etanólico | 2723,88 | 851,04 | 144,57 | 793,28 |
| Ácido Gálico (padrão) | | | 43,81 | | |
| Trolox (padrão) | | | 118,37 | | |

* O extrato não apresentou atividade mínima necessária para cálculo do EC50.

Os extratos etanólicos das polpas de *A. muricata* e *A. squamosa* e o hidroetanólico da polpa de *A. cacans* não apresentaram atividade antioxidante mínima de 50% para o teste

DPPH, portanto não foi possível a realização do cálculo do EC50. Os demais extratos das quatro espécies analisadas apresentaram valores de EC50 superiores ao padrão ácido gálico.

3.1.2 Capacidade de redução do Ferro (FRAP)

Em *A. muricata* nenhum dos extratos da polpa apresentou resultado, e o melhor resultado para a folha foi no extrato etanólico, de 66,04µM ET/g de extrato (Tabela 3). Já para *A. squamosa*, os melhores resultados foram em ambos os extratos hidroetanólicos, polpa (23,44µM ET/g de extrato) e folha (122,52µM ET/g de extrato). Em *A. crassiflora*, nenhum dos extratos da polpa apresentou resultados para o teste, e para a folha o melhor resultado foi de 144,00µM ET/g de extrato, sendo o melhor entre todos os extratos avaliados. Para *A. cacans* o maior potencial de redução do Fe³⁺ foi em ambos os extratos etanólicos, sendo o da polpa 94,00µM ET/g de extrato, e o da folha 134,37µM ET/g de extrato).

TABELA 3. Atividade antioxidante pelo método de redução do Ferro FRAP dos extratos hidroetanólicos e etanólicos da polpa e folhas de *A. crassiflora*, *A. squamosa*, *A. muricata* e *A. cacans*

| | | <i>A. muricata</i> | <i>A. squamosa</i> | <i>A. crassiflora</i> | <i>A. cacans</i> |
|-------|----------------|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------|
| Polpa | Hidroetanólico | nd | 23,44 | nd | nd |
| | Etanólico | nd | nd | nd | 94,00 |
| Folha | Hidroetanólico | 43,07 | 122,52 | 144,00 | 131,41 |
| | Etanólico | 66,04 | 113,26 | 142,70 | 134,37 |

Resultados expressos em µM ET/g de extrato. nd=atividade não detectada pelo teste até a concentração máxima utilizada.

3.1.3 Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)

O teste de TBARS avalia a inibição de peroxidação lipídica em sistemas biológicos (Costa et al., 2012). Os extratos foram utilizados na concentração de 1000µg/mL (Figura 1).

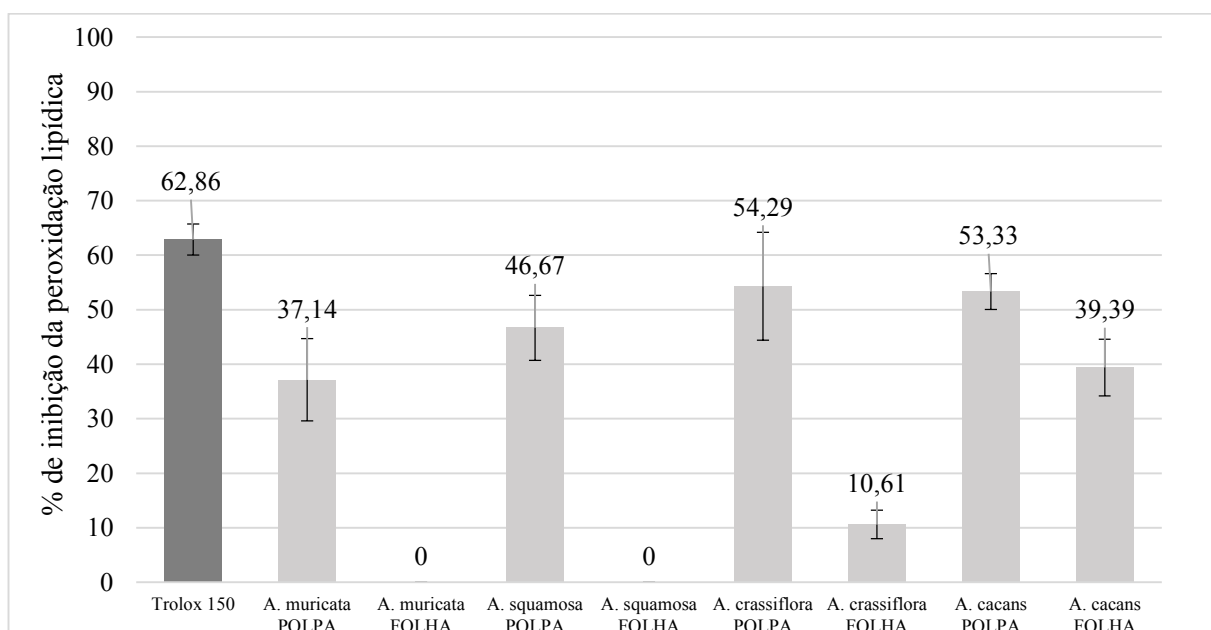


FIGURA 1. Inibição da formação de TBARS in vitro pelos extratos e controle positivo (Trolox -150µg/mL). (*A. muricata*-Polpa-Hidroetanólico, *A. muricata*- Folha-Etanólico; *A. squamosa*-Polpa-Hidroetanólico, *A. squamosa*-Folha-Hidroetanólico; *A. crassiflora*-Polpa-Hidroetanólico, *A. crassiflora*-Folha-Etanólico; *A. cacans*-Polpa-Etanólico, *A. cacans*-Folha-Etanólico)

Obteve-se que a polpa de *A. muricata* o valor de 37,14% de inibição (Figura 1). Em *A. squamosa* a polpa apresentou 46,67%. Já para *A. crassiflora* os resultados para polpa e folha foram 54,29% e 10,61%, respectivamente. *A. cacans* apresentou os melhores valores sendo 53,33% para a polpa e 39,39% na polpa. Os extratos das folhas de *A. muricata* e *A. squamosa* não apresentaram resultados detectados pelo teste na concentração utilizada. Sendo os resultados mais próximos do controle positivo Trolox (62,86%) os extratos de polpa de *A. crassiflora*, e de folha de *A. cacans*.

De acordo com Sreelatha e Padma, (2009), durante o processo oxidativo, ocorre a doação de um átomo de hidrogênio a partir de uma cadeia de ácidos graxos insaturados de fosfolípidios da membrana. O processo de peroxidação lipídica se inicia, e nele são gerados peróxidos lipídicos e finalmente peróxidos cíclicos, que em última análise são fragmentos de aldeídos combinados como malonaldeído. Os extratos das Annonaceas testadas inibiram a quantidade de TBARS gerado pelo meio reacional AAPH, indicando um efeito protetor contra a peroxidação lipídica. Conforme descrito por Luna, (2006) e Costa et al., (2012), resultados positivos sugerem que os extratos podem exercer uma proteção antioxidante em biomoléculas, como fosfolípidos, triacilgliceróis e ácidos graxos polinsaturados, os quais são lipídeos essenciais para a função da membrana celular.

3.2 Atividade Fotoprotetora

3.2.1 Determinação da determinação do comprimento de onda máximo (λ max.) e da absorbância máxima (A max.) dos extratos de folhas e polpa das espécies

A varredura do composto fotoprotetor padrão Metoxicinamato de Octila (Sigma[®]), obteve pico de absorbância em 1,481 no comprimento de onda 310nm. Para análise das varreduras dos extratos foram consideradas as menores diluições com absorbância positiva.

O extrato hidroetanólico da folha de *A. crassiflora*, e o extrato etanólico da folha de *A. muricata*, atingiram, em todo seu comprimento de onda, valores de absorção maiores do que o do padrão analisado Metoxicinamato de Octila (Sigma[®]) (Figura 2 e 4).

O extrato da folha hidroetanólico de *A. crassiflora* (Figura 2) atingiu o pico máximo no comprimento de onda de 290nm, com 2.482 de absorbância, porém em todos os comprimentos de onda obtiveram valores maiores que os do padrão.

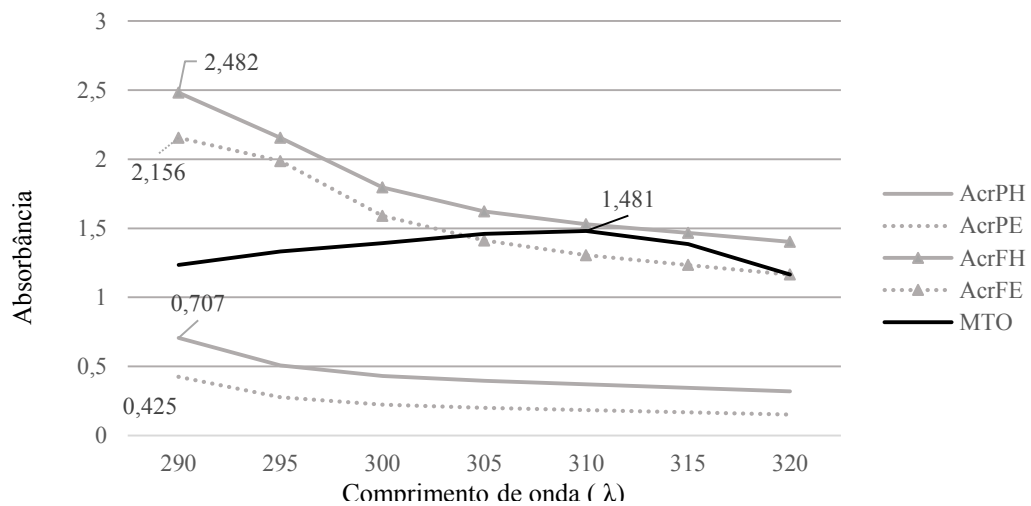


FIGURA 2. Espectros de absorção UV-visível e Comprimento de onda máximo (λ) e Absorbância (A) dos extratos de *A. crassiflora* em comparação com o padrão (Metoxicinamato de Octila, Sigma®) – **MTO**= Metoxicinamato de Octila, **AcrPH**= extrato polpa hidroetanólico *A. crassiflora* (1000 $\mu\text{g/mL}$), **AcrPE**= extrato polpa etanólico *A. crassiflora* (1000 $\mu\text{g/mL}$), **AcrFH**= extrato folha hidroetanólico *A. crassiflora* (500 $\mu\text{g/mL}$), **AcrFE**= extrato folha etanólico *A. crassiflora* (500 $\mu\text{g/mL}$).

Em *A. squamosa*, nenhum dos extratos obteve absorbância maior que padrão, os picos de absorbância foram atingidos no comprimento de onda de 290nm, e os valores para o extrato hidroetanólico da folha foi de 0.819, e etanólico de 0.810 (Figura 3).

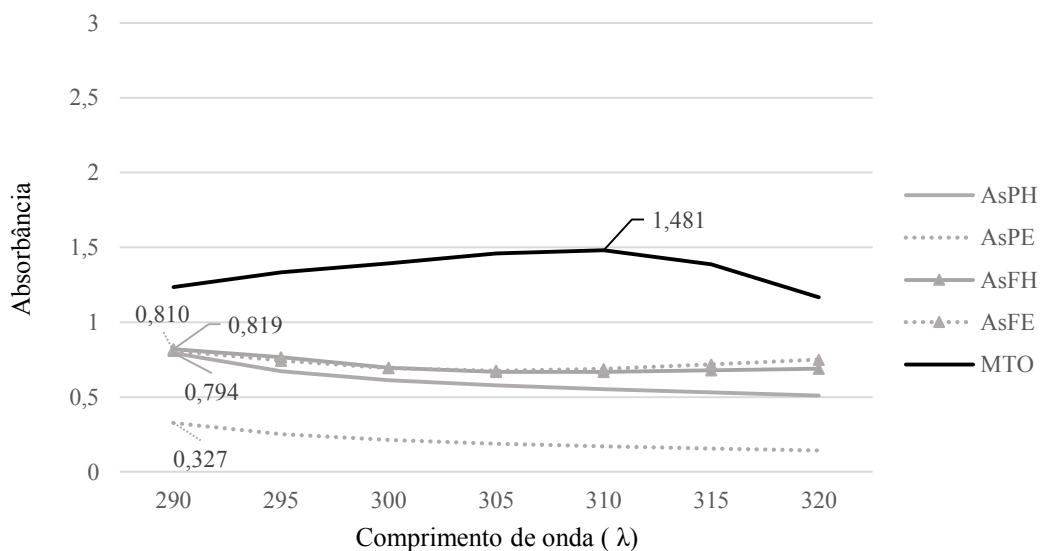


FIGURA 3. Espectros de absorção UV-visível e Comprimento de onda máximo (λ) e Absorbância (A) dos extratos de *A. squamosa* em comparação com o padrão (Metoxicinamato de Octila, Sigma®) – **MTO**= Metoxicinamato de Octila, **AsPH**= extrato polpa hidroetanólico *A. squamosa* (1000 $\mu\text{g/mL}$), **AsPE**= extrato polpa etanólico *A. squamosa* (1000 $\mu\text{g/mL}$), **AsFH**= extrato folha hidroetanólico *A. squamosa* (250 $\mu\text{g/mL}$), **AsFE**= extrato folha etanólico *A. squamosa* (250 $\mu\text{g/mL}$).

A varredura do extrato etanólico da folha de *A. muricata* atingiu pico de absorbância em 290nm com valor de 1.730, porém, em todos os comprimentos de onda, foram obtidos valores maiores do que os do padrão (Figura 4).

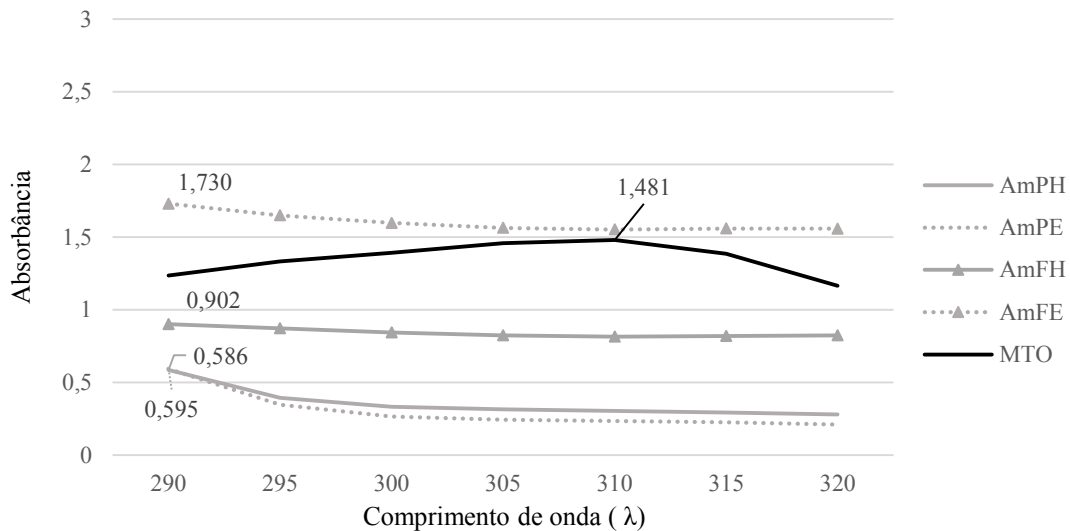


FIGURA 4. Espectros de absorção UV-visível e Comprimento de onda máximo (λ) e Absorbância (A) dos extratos de *A. muricata* em comparação com o padrão (Metoxicinamato de Octila, Sigma®) – **MTO**= Metoxicinamato de Octila, **AmPH**= extrato polpa hidroetanólico *A. muricata* (2000 $\mu\text{g/mL}$), **AmPE**= extrato polpa etanólico *A. muricata* (2000 $\mu\text{g/mL}$), **AmFH**= extrato folha hidroetanólico *A. muricata* (1000 $\mu\text{g/mL}$), **AmFE**= extrato folha etanólico *A. muricata* (1000 $\mu\text{g/mL}$).

O extrato etanólico da folha de *A. cacas*, obteve pico de absorbância em 305nm, com valor de 0.964 (Figura 5).

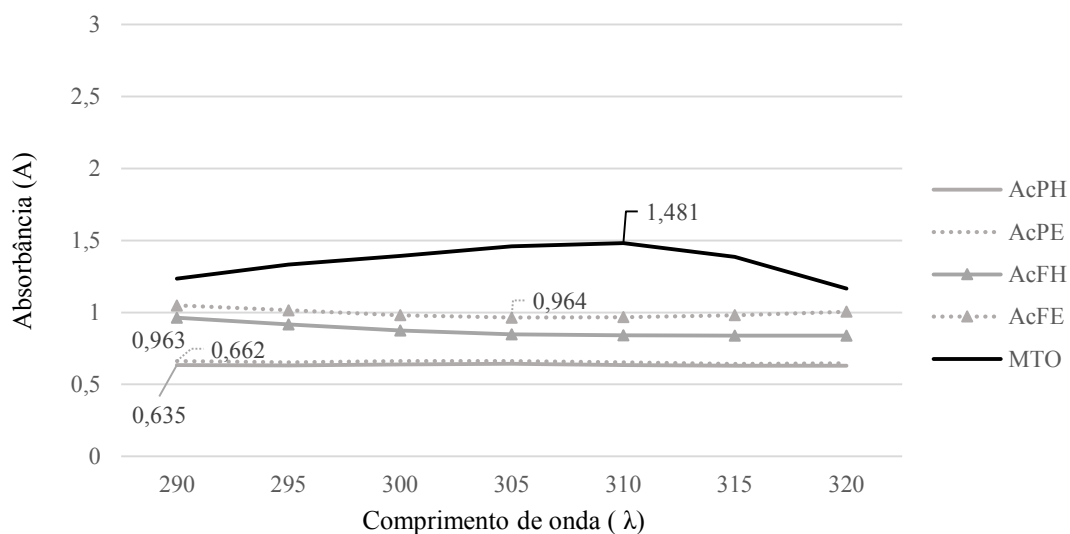


FIGURA 5. Espectros de absorção UV-visível e Comprimento de onda máximo (λ) e Absorbância (A) dos extratos de *A. cacas* em comparação com o padrão (Metoxicinamato de Octila, Sigma®) – **MTO**= Metoxicinamato de Octila, **AcPH**= extrato polpa hidroetanólico *A. cacas* (500 $\mu\text{g/mL}$), **AcPE**= extrato polpa etanólico *A. cacas* (500 $\mu\text{g/mL}$), **AcFH**= extrato folha hidroetanólico *A. cacas* (250 $\mu\text{g/mL}$), **AcFE**= extrato folha etanólico *A. cacas* (250 $\mu\text{g/mL}$).

A busca por possíveis resultados positivos, se fundamenta com o proposto por Tedesco et al. (1997) e Agar e Young (2005), de que a exposição aguda à radiação ultravioleta, principalmente a UVB (290-320nm), além de provocar queimaduras na pele, pode levar ao aumento da melanogênese. Petrova et al. (2011) e Oberley (2002) relatam que a exposição a UVB gera espécies reativas de oxigênio (ROS), que reagindo com moléculas fotossensíveis, resulta num desequilíbrio entre as ROS e promove danos para as estruturas moleculares.

Embora *Annona cacans* não tenha obtidos melhores resultados quando comparados as outras espécies analisadas, tem significativo potencial fotoprotetor e antioxidante, como já foi descrito por Saíto (1990), que isolou flavonoides e os glicosídeos rutinas, das folhas, e o ácido p-cumárico, nas formas mono e dimetiladas, em frutos.

Matsumura e Ananthaswamy (2002) e Guinea et al. (2012) demonstraram que a exposição crônica ou repetida à radiação UVB promove tanto o fotoenvelhecimento da pele, quanto a fotocarcinogênese, e assim ao aumento da busca e o desenvolvimento de fotoprotetores, de origem natural e presentes na alimentação. No presente trabalho foram detectados que extratos das Annonaceae, tem potencial fotoprotetor, já que apresentaram, em espectro de varredura, absorbância significativa na região de incidência da radiação UVB (290-320nm) (Figuras 2 a 5).

Os resultados obtidos tornam as espécies de Annonaceae avaliadas no presente estudo, promissoras para fornecer compostos afim de potencializar, também com seu efeito antioxidante, os filtros para prevenção aos danos causados pela radiação UVB.

4 Conclusões

Diante dos resultados obtidos neste estudo foi possível constatar que para o teste de DPPH, os melhores resultados encontrados foram no extrato de *A. crassiflora* folha etanólico, *A. squamosa* polpa hidroetanólico com EC50 menores em *A. crassiflora* folha etanólico e *A. cacans* polpa etanólico. Para o teste FRAP, os melhores resultados apresentados foram no extrato de *A. crassiflora* folha hidroetanólico e *A. cacans* polpa etanólico, já para o TBARS, os melhores resultados obtidos foram nos extratos hidroetanólico de *A. crassiflora* e no etanólico da folha de *A. cacans*. De acordo com o potencial fotoprotetor, os mais promissores foram os extratos hidroetanólico da folha de *A. crassiflora* e etanólico da folha de *A. muricata*.

A. crassiflora e *A. cacans* apresentaram os melhores resultados na maioria dos testes para antioxidantes e entre os tipos de extratos avaliados, bem como para potencial fotoprotetor.

5 Referências

- Agar, N., Young, A.R. (2005). Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571, 121-132.
- Alali, F.Q., Liu, X., McLaughlin, J.L. (1999). Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, 62, 3, 504-540.
- Araya, H. (2003). Studies on Annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* seeds. Tese Doutorado, Meiji University, Tokyo.
- Chang, F.R., Yang, P.Y., Lin, J.Y., Lee, K.H., Wu, Y.C. (1998). Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. *Journal of Natural Products*, 61, 437-439.
- Chen, C.Y., Chang, F.R., Cho, C.P., Wu, Y.C. (2000). ent-Kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. *Journal of Natural Products*, 63, 1000-1003.
- Costa, D.A., Oliveira, G.A.L, Sousa, D.P., Freitas, R.M. (2012) Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do composto ciano-carvona. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33, 4, 567-575.
- Ferelli, C., Dedalo, M.F.N. (2006). Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Extratos de Graviola (*Annona muricata*) e Suas Frações. Dissertação mestrado, Universidade Metodista de Piracicaba, São Paulo.
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43, 61-68.
- Gonçalves, A.E.S.S. (2008). Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C. Dissertação mestrado, Faculdade de ciências farmacêuticas - Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, São Paulo.
- Guimarães, A.G., Oliveira, G.F., Melo, M.S., Cavalcanti, S.C., Antonioli, A.R., Bonjardim, L.R., Silva, F.A., Santos, J.P.A., Rocha, R.F., Moreira, J.C.F., Araújo, A.A., Gelain, D.P., Quintans-Júnior, L.J. (2010). Bioassay-guided evaluation of antioxidante and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107, 6, 949-57.
- Guinea, M., Franco, V., Araujo-Bazán, L., Rodríguez-Martín, I., González, S. (2012). In vivo UVB-photoprotective activity of extracts from comercial marine macroalgae. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1109-1117.
- Heinrich, U., Moore, C.E., De Spirt, S., Tronnier, H., Stahl, W. (2011). Green tea polyphenols provide photoprotection, increase microcirculation, and modulate skin properties of women. *Journal of Nutrition*, 141, 1202-1208.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Janses, R., Wang, S.Q., Burnett, M., Osterwalder, U., Lim, H.W. (2013). Photoprotection : Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agentes. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69, 853e1–853e12.

Joly, A.B. (1979). *Botânica, introdução a taxonomia vegetal*. São Paulo: Nacional.

Katiyar, S.K., Elmets, C.A. (2001). Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection (review). *Internation Journal of Oncology*, 18, 1307-1313.

Katiyar, S.K. (2003). Skin photoprotection by green tea: antioxidante and immunomodulatory effects. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 3, 234-242.

Kullavanijaya, P., Lim, H.W. (2005). Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52, 937-958.

Lage, G.A. (2011). Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. Dissertação mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

Lage, G.A., Medeiros, F.S.; Furtado, W.L.; Takahashi, J.A.; Souza-Filho, J.D.; Pimenta, L.P.S. (2014). The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. *Natural Product Research*.

Lorenzi, H., Matos, F.J.A. (2002). *Plantas Mediciniais do Brasil*. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum.

Luna, A.F., Freitas, T.M.B., Alves, I.C, Pinto, C.E.M., Luz, E.W.M. (s.d.) Atividade fitoquímica e antioxidante da folha de *Annona muricata* L. frente ao radical ABTS – <http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNPEI2010/paper/view/1003>. Acessado em 10 de junho de 2014.

Luna, J.S. (2006). Estudo de Plantas Bioativas. Tese Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

Maas, P.J.M., Rainer, H., Lobão, A.Q. (2001). Annonaceae. In: *Lista de espécies da flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, R., Manian, S. (2008). The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry*, 107, 1000-1007.

Matsumura, Y., Ananthaswamy, H. N. (2002). Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4, 1-22.

Nagmoti, D.M., Khatri, D.K., Juvekar, P.R., Juvekar, A.R. (2012). Antioxidant activity and free radical-scavenging potential of *Pithecellobium dulce* Benth. Seed extracts. *Free radicals and antioxidants*, 2, 2.

Oberley, T.D. (2002). Oxidative damage and cancer, *American Journal of Pathology*, 160, 403-408.

Oliveira, B.H., Sant'ana, A.E., Bastos, E.D.Z. (2002). Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, 13, 368-371.

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

- Petrova, A., Davids, L.M., Rautenbach, F., Marnewick, J.L. (2011). Photoprotection by honeybush extracts, hesperidin and mangiferin against UVB-induced skin damage in SKH-1 mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103, 126-139.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5, 11, 1142-1145.
- Roesler, L.G., Malta, L.C., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S., Pastore, G.M. (2007). Atividade antioxidante de Frutas do Cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 1, 53-60.
- Rosa, M.B., Oliveira, T.G., Carvalho, C.A., Silva, F.D., Carvalho, L.M., Nascimento, P.C., Peres, R.L. (2008). Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea var. capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum runderale* (Jacq.) *cass e Sonchus*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 5, 101-110.
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Morais, S.M., Sampaio, C.G., Pérez-Jimenez, J., Saura-Calixto, F.D. (2006). Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em Frutas pelo métodos de redução do Ferro (FRAP). Comunicado técnico: EMBRAPA, Fortaleza, CE.
- Saito, M.L. (1990). Fitoquímica de *Annona cacans* Warming e quimiosistemática de Annonaceae Jussieu. Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Sreelatha, S., Padma, P.R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods Human Nutrition*, 64, 4, 303-311.
- Tedesco, A.C., Martínez, L., González, S. (1997). Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms, *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 30, 561-575.
- Telles, M.P.C., Valva, F.D., Bandeira, L.F., Coelho, A.S.G. (2003). Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica*, 26, 1, 123-129.
- Velasco, M.V.R., Balogh, T.S., Pedriali, C.A., Sarruf, F.D., Pinto, C.A.S.O., Kaneko, T.M., Baby, A.R. (2011). Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) – revisão, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 32, 27-34.
- Williams, S., Tamburic, S., Lally, C. (2009). Eating chocolate can significantly protect the skin from UV light. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 8, 169-173.
- Wulf, F.H.C., Sandby-Moller, J., Kobayasi, T., Gnidecki, R. (2004). Skin aging and natural photoprotection. *Micron*, 35, 185-191.

CAPÍTULO II

Potencial antiglicante de extratos de espécies da família Annonaceae.

Kamille D. Spera^a, Regildo M. G. Silva^a

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

RESUMO

A glicação é uma reação dada como amplificadora dos efeitos do estresse oxidativo, devido à atividade de seus produtos finais (AGES- *Advanced Glycation End-Products*). Tem sido alvo na busca de compostos vegetais com interesse farmacológico para minimizar os efeitos desses produtos, visto que, no mercado já existem inibidores de glicação sintéticos, mas que no entanto, são limitados devido a seus efeitos colaterais. Sabendo que uma planta que apresentar atividade antioxidante terá seu efeito antiglicante potencializado, a busca por compostos fenólicos também aumenta. A família Annonaceae possui espécies que apresentam compostos bioativos com distintas propriedades medicinais. No presente trabalho foi realizada a análise da capacidade antiglicante, pelo sistema BSA/glicose e Teste de Mobilidade Relativa por Eletroforese (MRE); quantificada a composição fenólica, e flavonoidica e realizada a CCD (Cromatografia de Camada Delgada) para flavonoides, terpenoides e alcaloides em extratos hidroetanólicos e etanólicos de folhas e polpa de *Annona crassiflora*, *Annona squamosa*, *Annona muricata*, *Annona cacans*. No teste antiglicação a polpa de *A. muricata* e a folha *A. crassiflora* apresentaram os melhores resultados. *A. crassiflora* teve os melhores resultados na quantificação de fenóis. Para flavonoides tanto na quantificação, quanto na CCD, os melhores resultados foram encontrados na folha de *A. squamosa* e na polpa de *A. cacans*.

Palavra Chave: Glicação; AGE; *Annona*; Fenóis; Flavonoides.

1 Introdução

A glicação consiste na adição enzimática de açúcares redutores e/ou seus produtos degradados reativos em grupos de proteínas (Maillard, 1912; Thornalley, et al., 1999). Existem dois estágios de glicação: no primeiro, o grupo amino da proteína reage com o grupo aldeído do açúcar fisiológico para iniciar a formação da base Schiff, que, com o tempo, é rearranjado, e forma os chamados produtos Amadori (Ho, et. al 2010). O segundo, conhecido como estágio avançado da glicação, baseia-se na transformação dos produtos Amadori em dicarbonil intermediários reativos, como metilglioxal (MGO) (Ho, et. al 2010).

Após essa transformação, pode ocorrer reação com resíduos de proteínas, como lisina, arginina e cisteína, formando inúmeros produtos com ligações *crosslinks* através de reações complexas que envolvem desidratação, oxidação, fragmentação e condensação (Ho, et al., 2010). Nesse processo, um dos responsáveis pelos danos são os seus produtos finais que são denominados AGES (*Advanced Glycation End-Products*) e podem levar a várias consequências ao organismo (Bailey et al., 1998, Li et al., 2006).

O envelhecimento cutâneo, assim como o desenvolvimento de doenças degenerativas, está parcialmente associado à glicação de proteínas (Brownlee, 2000). Os produtos finais de glicação são acumulados e causam modificações principalmente em proteínas de vida longa, como o colágeno, componente da matriz extracelular. As reações com as cadeias laterais dos aminoácidos arginina, lisina e o aspartato presentes no colágeno tipo I, alteram as propriedades físico-químicas e funcionais do colágeno, influenciando na elasticidade vascular (Brownlee, et. al 1988). Essas modificações resultam na redução da renovação das células, promovendo e/ou acelerando o processo de envelhecimento (Chapman et al., 1990; Reiser et al., 1992).

Os produtos finais da glicação podem se ligar a receptores específicos da membrana celular e induzir a expressão de mediadores inflamatórios potencializando o estresse oxidativo (Stern, et. al 2002). A glicação portanto, é tida como amplificadora e integradora desse estresse, sendo assim, necessário suprimir fatores correlacionados à ela, para proteger as células dos possíveis danos desse estresse. Os antioxidantes, são compostos responsáveis por tal proteção, entretanto, são inibidos pela glicação, não sendo, desse modo, suficientes para proteger as células dos danos (Ramkissoon, et. al 2013).

Diante desse contexto, predomina a busca de compostos que possam inibir a glicação no organismo, afim de se prevenir os danos celulares, principalmente complicações vasculares relacionadas à idade e ao diabetes. Já existem no mercado inúmeros inibidores de glicação

sintéticos, como a aminoguanidina, entretanto, suas aplicações são limitadas devido à sua toxicidade e seus efeitos colaterais (Peyroux e Sternberg, 2006).

A capacidade antiglicante de algumas plantas pode ser maior do que a atividade relacionada às aminoguanidinas e está correlacionada com a presença de compostos fenólicos, que exercem ações específicas em alvos biológicos, incluindo a atividade antioxidante (Bousova et al., 2005; Lunceford e Gugliucci, 2005). Tendo reação oxidativa diretamente envolvida na formação dos produtos finais da glicação, plantas com propriedades antiglicante e antioxidante podem proteger de modo ainda mais eficiente o organismo de danos celulares (Duraisamy et al., 2003; Farrar et al., 2007; Babu, et al., 2008; Peng et al., 2008; Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009). Compostos vegetais que apresentam propriedades hipoglicemiantes, pode estar baseado na atividade antiglicante (Hsieh et al., 2005, 2007).

A família Annonaceae compreende 128 gêneros e 2.300 espécies, sendo *Annona* o gênero mais representativo, com cerca de 120 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Joly, 1979; Maas et al., 2001; Lorenzi e Matos, 2002). É considerada economicamente importante, devido às espécies como *Annona muricata* (graviola) e *Annona squamosa* (fruta-do-conde) já serem utilizadas popularmente (Telles et al., 2003; Araya, 2003). Espécies silvestres menos conhecidas como *Annona crassiflora* (marolo) e *Annona cacans* (araticum cagão), também apresentam potencial farmacológico (Lorenzi e Matos, 2002).

Estudos fitoquímicos da família Annonaceae já catalogaram cerca de 320 produtos secundários, das mais variadas partes da planta, oriundos de 150 espécies desta família (Alali et al., 1999). Os principais grupos de compostos químicos presentes em extratos preparados de cascas (Chen et al., 2000), folhas e frutos (Chang et al., 1998) são acetogeninas, alcaloides isoquinolínicos e os diterpenos (Oliveira et al., 2002).

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a capacidade antiglicante de extratos da polpa do fruto e folhas de *A. crassiflora*, *A. muricata*, *A. squamosa* e *A. cacans*, bem como quantificar os fenóis e flavonoides totais, além de realizar a análise cromatográfica dos extratos que apresentaram melhores resultados.

2 Materiais e Métodos

2.1 Coleta e preparação do material vegetal

As folhas e frutos de *Annona crassiflora* M., *Annona muricata* L., *Annona squamosa* L. e *Annona cacans* W. foram coletadas no município de Assis/São Paulo/Brasil (latitude: 22°39 '42"S, longitude: 50°24'44"W, altitude: 546m), com colaboração do Instituto Florestal

do Estado de São Paulo, localizado na cidade de Assis/SP. As folhas das espécies avaliadas foram submetidas a secagem em estufa de ar circulante ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), logo após pulverizado em moinho de facas. Os frutos foram despolidos e as polpas congeladas a -18°C e liofilizadas.

2.2 Preparação dos Extratos

Os extratos hidroetanólicos (70%) e etanólicos foram preparados na proporção de 1:10 (p/v) em água destilada, submetidos à agitação mecânica por um período de 24 horas em temperatura ambiente. O resíduo vegetal foi retirado por filtração a vácuo e reextraído por duas vezes. Os extratos obtidos foram levados ao rotaevaporador para eliminação completa do álcool. Para o preparo do extrato hidroetanólico, a solução aquosa resultante foi congelada e posteriormente liofilizada para obtenção do extrato seco. Ambos foram armazenados em frasco de vidro âmbar, protegidos da luz.

2.3 Atividade antiglicação

2.3.1 Avaliação do potencial antiglicação utilizando sistema albumina sérica bovina (BSA)/glicose

A glicação de proteínas por glicose será avaliada utilizando metodologia adaptada utilizada por Peng et al., 2008 (Rabar et al, 2000, Wu e Yen, 2005). Em 2,5ml do volume total da reação de glicação serão incluídas diferentes diluições dos extratos das plantas (0,5mL), 20mg/mL de BSA, 500mM de glicose, 0,02% (p/v) de azida de sódio e tampão fosfato (100mM, pH 7,4). Após incubação a 37°C durante três semanas, a quantidade globais de AGEs fluorescentes formadas será determinada utilizando um fluorímetro, em comprimento de onda de excitação de 330nm e comprimento de onda de emissão de 410nm. A porcentagem de inibição da formação de AGE para cada extrato foi calculada pela seguinte equação, % de inibição = $[1 - (\text{fluorescência da solução com inibidores} / \text{fluorescência da solução, sem inibidores})] \times 100\%$.

2.3.2 Teste da Mobilidade Relativa em Eletroforese (MRE)

A MRE foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Miura et al., (1994), BSA (0,3mg/mL de proteína) foi diluído em 10 mM tampão fosfato (PBS) e incubadas com glicose (400 mM) a 37°C durante 24h, na presença e ausência dos extratos vegetais (0,1 mg/mL). A SDS-PAGE foi realizada com 4% de gel de empilhamento e 10% de gel de separação. Uma alíquota de solução de BSA glicada foi misturada com um volume igual de SDS tampão de amostra (20 mg/ml de SDS, 30% glicerol, 0,25 M tampão Tris-HCl, pH 6,8) e fervida por 3 minutos. 15 μL da solução mista foram aplicadas no gel de empilhamento e gel

de separação foi executado em uma corrente constante de 20mA, por aproximadamente 3 horas. Após a finalização da eletroforese, o gel foi fixado com etanol a 60%, e em seguida corado com Coomassie-Blue (R-250). Os resultados são expressos na MRE utilizando o BSA nativo como a base. A concentração final de BSA (0,3mg/mL de proteína, sem adição do extrato) será utilizado como o controle negativo. Foi realizado com o melhor extrato entre os avaliados.

2.4 Determinação de Fenóis Totais

O método utilizado foi o de *Folin-Ciocalteu* para a determinação dos compostos fenólicos totais, adaptado de Wu et al. (2004). A cada 0,1mL de amostra (extrato) foram adicionados 5mL de água destilada e 0.5mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico). Após 3 minutos foi adicionado 1,4mL de solução de Na₂CO₃ saturada a 10% e 3ml de água destilada. O branco utilizado foi 5.1mL de água destilada e 0.5mL do reagente *Folin-Ciocalteu*. A mistura foi agitada e armazenada por 1 hora, e a absorbância medida a 765nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido gálico por g de extrato.

2.5 Determinação de flavonoides totais

A dosagem dos flavonoides totais dos extratos foi quantificada por espectrofotômetro UV-Vis e as amostras preparadas segundo a metodologia de Zhishen et al. (1999), baseada na complexação dos flavonoides com AlCl₃, ocorrendo o deslocamento das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda. Uma alíquota de 1mL dos extrato foi misturado a 4mL de álcool a 70%, e 0.5ml de NaNO₂ saturado a 5%. Após 6 minutos, 0.5mL de AlCl₃ a 10%, 3mL de NaOH 1M, e 1mL de água destilada, foram adicionados. As amostras foram agitadas em vórtex e a absorbância mensurada a 510nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos expressos em mg de rutina por g de extrato ou frações secas.

2.7 Cromatografias em camada delgada dos extratos brutos (etanólico, hidroetanólico).

Cromatografias em camada delgada (CCD) para separação e identificação dos compostos presentes nos extratos brutos (etanólico e hidroetanólico). Na análise por CCD, realizada pela otimização de metodologias descritas por Wagner e Bladt (1996), foram preparadas amostras de 100mg/mL dos extratos brutos, a partir dos quais foram aplicadas com capilares 20µl das amostras em cromatoplasas de sílica gel em alumínio F250 (10 cm x 10 cm- MERCK), previamente ativadas em estufa a 100 C° por três minutos.

Para preparo das placas cromatográficas deve se utilizar placas de vidro de 20 x 20 cm, onde se aplica como auxílio de um carrinho aplicador uma mistura de 15g de sílica gel 60 mech e 30mL de água obtendo se uma camada de 25mm, em seguida deixar secar em estufa a 100 C° por +ou- 30min. O prepara deve ser feito em período próximo da utilização sendo ativada como citado anteriormente.

2.7.1 Detecção Flavonoides

Como fase móvel para detecção dos compostos do grupo dos flavonoides foi utilizado o sistema eluente clorofórmio-metanol-água (75:23:2) e como padrões quercetina, rutina e ácido gálico. A revelação das placas foi realizada por nebulização com os reveladores anisaldeído e 2-aminoethyl diphenylborinate sendo analisado em seguida na luz ultravioleta (254 e 366 nm). Após a definição das zonas cromatográficas, foram calculados seus respectivos fatores de referência (Rf) utilizando a seguinte fórmula: $Rf = Z_{cm}/FRONT$ cm.

2.7.2 Detecção Terpenoides

Para a detecção dos compostos do grupo dos terpenoides foi utilizado o sistema eluente tolueno-acetato de etila (93:7) e como padrões citronelol, óleo essencial de eucalipto e óleo essencial de alecrim. As placas foram reveladas com o auxílio de um nebulizador com o revelador de vanilina sulfúrica seguido de aquecimento a 110°C em sistema fechado sendo analisado na luz ultravioleta (254 e 366 nm). Após a definição das zonas cromatográficas, foram calculados seus respectivos fatores de referência (Rf) utilizando a seguinte fórmula: $Rf = Z_{cm}/FRONT$ cm.

2.7.3 Detecção Alcaloides

O último grupo analisado foi o dos alcaloides empregado o sistema eluente acetato de etila – metanol - água (100:13,5:10) e como padrões cafeína, emeína e solasidína. A revelação das placas foi realizada por meio de nebulização com o reagente dragendorff em sistema fechado sendo analisado na luz ultravioleta (254 e 366 nm). Após a definição das zonas cromatográficas, foram calculados seus respectivos fatores de referência (Rf) utilizando a seguinte fórmula: $Rf = Z_{cm}/FRONT$ cm.

3. Resultados e Discussão

3.1 Atividade antiglicação

3.1.1 Avaliação do potencial antiglicação utilizando sistema albumina sérica bovina (BSA)/glicose

Na figura 1 estão apresentados os valores do potencial antiglicante do controle positivo (aminoguanidinas) e dos extratos de *Annona* avaliados na concentração de 1000 µg/mL. Todos os extratos apresentaram porcentagem de inibição da peroxidação lipídica. *A. muricata* apresentou uma atividade de 50,72% para o extrato da polpa e 61,76% para folha. O extrato da polpa de *A. squamosa* apresentou 47,20% e da folha 61,62%. O extrato da folha de *A. crassiflora* foi o que apresentou melhor resultado entre as amostras analisadas, com 79,27%, atingindo valor semelhante ao padrão de antiglicante utilizado Aminoguanidina (20mM), que teve como valor 81,04%, já o extrato da polpa obteve resultado de 45,28%. *A. cacans* apresentou 77,80% de inibição no extrato da folha e 50,61% no extrato da polpa.

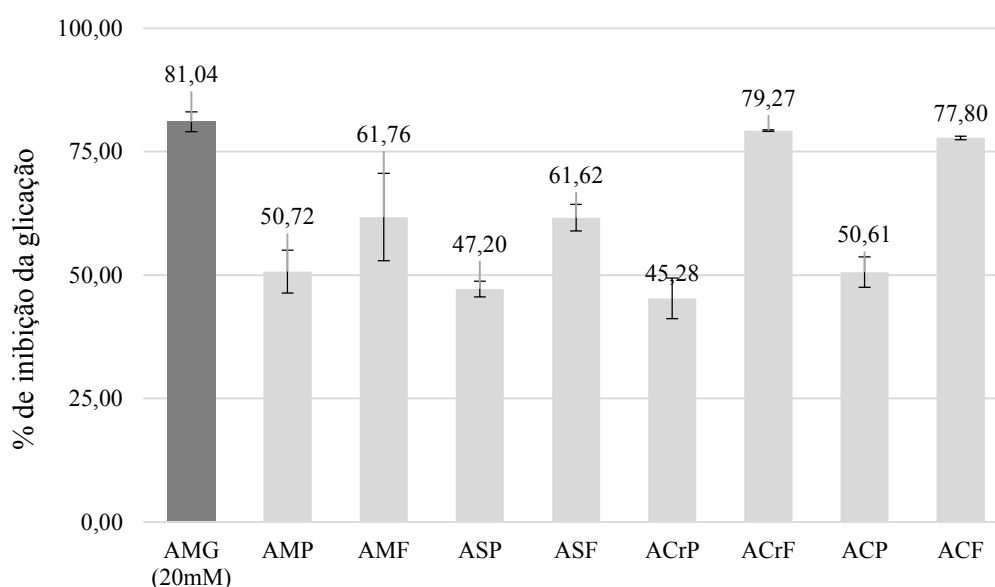


FIGURA 1. Avaliação da porcentagem de inibição da glicação dos extratos através do método BSA/glicose. AMG – Aminoguanidina, *A. muricata* polpa hidroetanólico (AMP), *A. muricata* folha hidroetanólico (AMF), *A. squamosa* polpa hidroetanólico (ASP), *A. squamosa* folha hidroetanólico (ASF), *A. crassiflora* polpa hidroetanólico (ACrP), *A. crassiflora* folha etanólico (ACrF), *A. cacans* polpa etanólico (ACP), *A. cacans* folha etanólico (ACF).

Estudos recentes realizados por Lunceford e Gugliucci, 2005; Gugliucci et al., 2009; Beaulieu et al., 2010; Ramkissoon et al., 2013, têm demonstrado a importância da investigação da capacidade antiglicante de compostos naturais de origem vegetal, principalmente correlacionado com a atividade antioxidante dos mesmos, e suas ações tanto na prevenção como no tratamento de doenças degenerativas correlacionadas com o envelhecimento. Diante disso os extratos das espécies de *Annona* avaliados neste estudo

podem contribuir de forma direta para a elucidação completa do mecanismo de ação dos componentes naturais destas espécies, e suas ações farmacológicas já consagradas e comprovadas em trabalhos científicos. Apesar disso e de acordo Peng et al., 2008a, é difícil decidir exatamente em que sentido ou em qual fase há intervenção dos extratos para reduzir a formação de AGEs. No entanto, considerando a sua alta capacidade antioxidante, acredita-se que a antiglicação pode ser provocada pela eliminação de radicais livres e/ou atividades de captura de ions de metais.

3.1.2 Antiglicação por meio da Mobilidade Relativa em Eletroforese (MRE)

Na figura 2 estão apresentados os perfis eletroforéticos das amostras de BSA sob glicação na presença ou ausência do extrato de *A. crassiflora* tanto o da folha como o da polpa do fruto, pois os mesmo foram o que apresentaram melhores resultados de acordo com o ensaio de BSA/glicose. Na figura é possível observar que o extrato de polpa de *A. crassiflora* apresentou melhor atividade antiglicante em comparação com extrato da folha da mesma espécie.

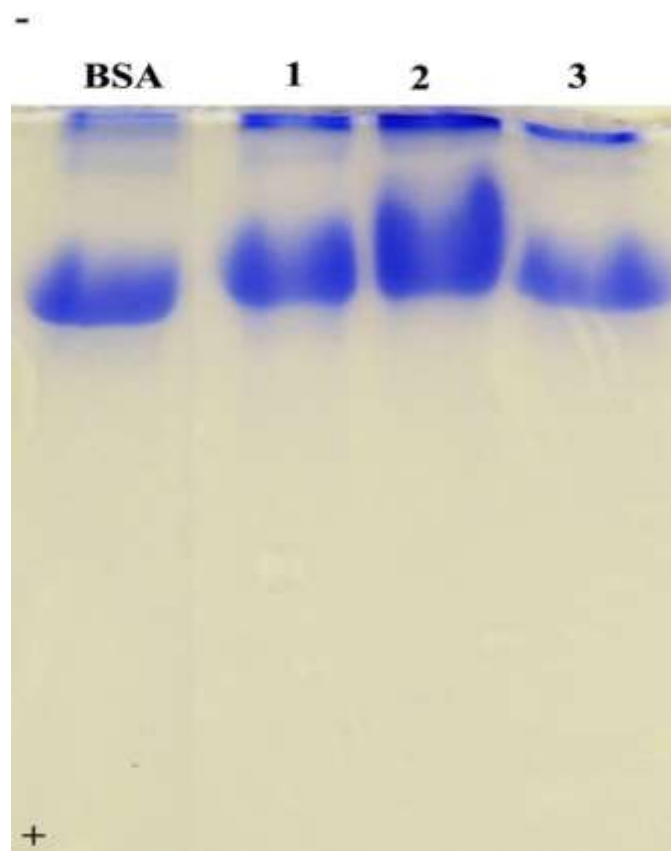


FIGURA 2. Teste de mobilidade relativa em eletroforese para avaliação da capacidade antiglicação pelo sistema BSA+Glicose, de extratos da folha hidroetanólico e polpa etanólico de *A. crassiflora*. Onde BSA=Albumina Sérica Bovina; 1= BSA+glicose; 2=BSA+glicose+Extrato da polpa; 3=BSA+glicose+Extrato da folha.

Estes resultados estão de acordo com os apresentados por espécies de plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional ocidental, chinesa e indiana, que concomitantemente também apresentam comprovada ação antioxidante e antidiabéticas como demonstrado em estudos realizados por Beaulieu et al., 2010; Ramkissoon et al., 2013; Morrone et al., 2013; Islam et al., 2014; Shankaraiah et al., 2014.

3.2 Determinação de Fenóis Totais

A. muricata apresentou valor de compostos fenólicos de acordo com o teste realizado apenas no extrato hidroetanólico da folha (39,75mg EAG/g de extrato) (Tabela 1). Em *A. squamosa* os melhores resultados foram no extrato hidroetanólico da polpa com 23,36mg EAG/g de extrato, e a folha hidroetanólico 57,81mg EAG/g de extrato, tal resultado está de acordo com os estudos realizados por Shirwaikar et al. (2004), que demonstraram que a presença de flavonoides e alguns fenóis no extrato das folhas de *A. squamosa* sejam os responsáveis pela redução do estresse oxidativo.

Para *A. crassiflora* os melhores valores do conteúdo de fenóis totais encontrados foram no extrato hidroetanólico da polpa 28,08mg EAG/g de extrato, e o etanólico da folha com 208,08mg EAG/g de extrato. Como já foi descrito por Lage (2011), compostos fenólicos são predominantes nas folhas de *A. crassiflora*, e apresentam menor quantidade em outras partes da planta. Em *A. cacans* os melhores resultados foram em ambos os extratos etanólicos, polpa com 25,86mg EAG/g de extrato, e folha 63,64mg EAG/g de extrato.

Os extratos das polpas (hidroetanólico e etanólico) e o etanólico da folha de *A. muricata*; o etanólico e hidroetanólico da polpa de *A. squamosa* e *A. cacans*, respectivamente; e o hidroetanólico de *A. cacans* não apresentaram quantidade de fenóis totais que pudesse ser representativa para o teste utilizado.

TABELA 1. Teor de fenóis totais dos extratos hidroetanólicos e etanólicos de polpa e folha de *A. crassiflora*, *A. squamosa*, *A. muricata* e *A. cacans*. (médias e desvio padrão)

| | | <i>A. muricata</i> | <i>A. squamosa</i> | <i>A. crassiflora</i> | <i>A. cacans</i> |
|-------|----------------|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------|
| Polpa | Hidroetanólico | nd | 23,36±1,35 | 28,08±1,27 | nd |
| | Etanólico | nd | nd | nd | 25,86±0,24 |
| Folha | Hidroetanólico | 39,75±3,00 | 57,81±3,39 | 201,70±2,88 | 58,91±1,66 |
| | Etanólico | nd | 53,08±5,77 | 208,08±6,94 | 63,64±4,00 |

Resultados expressos em mgEAG/g de extrato. nd=quantidade não detectada pelo teste

3.3 Determinação de flavonoides totais

Ambos os extratos hidroetanólicos de *A. muricata* (polpa e folha) apresentaram os melhores valores para flavonoides totais, sendo 41,56mgER/g de extrato e 79,52mgER/g de

extrato, respectivamente. *A. squamosa* também apresentou melhores resultados no extrato hidroetanólico, sendo o da polpa com 21,46mg ER/g de extrato, e para a folha, 169,00mg ER/g de extrato.

Para *A. crassiflora*, o maior conteúdo de flavonoides totais foi encontrado no extrato hidroetanólico da polpa, 21,46mg ER/g de extrato, e no extrato hidroetanólico da folha, 169,00mg ER/g de extrato, corroborando com Brito et al. (2008), que realizou testes positivos para alcaloides, flavonoides, flavonas, triterpenoides, esteroides, flavonas, flavonóis, xantonas, saponinas, taninos e resinas em *A. squamosa*. Os melhores resultados em *A. cacans*, foram em ambos os extratos etanólicos, 102,13mgER/g de extrato, para a folha, e para a polpa, 164,66mg ER/g de extrato.

O extrato da polpa etanólico de *A. squamosa* e o hidroetanólico de *A. cacans* não apresentaram quantidade de flavonoides Totais que pudesse ser representativa para o teste realizado (Tabela 2).

TABELA 2. Teor de flavonoides totais dos extratos hidroetanólicos e etanólicos de polpa e folha de *A. crassiflora*, *A. squamosa*, *A. muricata* e *A. cacans*. (média e desvio padrão)

| | | <i>A. muricata</i> | <i>A. squamosa</i> | <i>A. crassiflora</i> | <i>A. cacans</i> |
|-------|----------------|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------|
| Polpa | Hidroetanólico | 41,56±0,42 | 21,46±2,23 | 14,28±11,97 | nd |
| | Etanólico | 27,68±0,49b | nd | 9,61±1,92 | 102,13±3,07 |
| Folha | Hidroetanólico | 79,52±2,40 | 169,00±1,67 | 95,22±12,28 | 123.00±4.41 |
| | Etanólico | 54,00±5,00 | 161,49±8,78 | 126,89±12,28 | 164.66±3.30 |

Resultados expressos em mgER/g de extrato. nd=quantidade não detectada pelo teste

3.5 Cromatografias em camada delgada dos extratos brutos (etanólico, hidroetanólico).

Foram realizadas as cromatografias em camada delgada para a detecção de compostos flavonoídicos, terpênicos e alcaloídicos, sendo a revelação das placas realizadas por nebulização com os reveladores: (NP/PEG); vanilina sulfúrica seguido de aquecimento a 110°C, e reagente *dragendorff* respectivamente, e analisadas na luz ultravioleta (254 e 366nm), estando identificado cada extrato e padrão nas placas cromatográficas onde foram aplicadas as amostras com seus respectivos valores de Rf como representado nas figuras 5, 6, 7 e 8.

3.5.1 Detecção Flavonoides

A eluição cromatográfica e os cálculos dos referidos valores de Rf indicaram a presença de compostos polifenólicos nos diferentes extratos brutos (Figura 3) (RFS= **AMPH**:0,43; **AMFH**: 0,97, 0,83, 0,72, 0,67, 0,63, 0,54, 0,34, 0,23, 0,15; **ASPH**: 0,30; **ASFH**: 0,94, 0,79, 0,72, 0,64, 0,57, 0,50, 0,31, 0,28, 0,22, 0,17; **ACrFE**: 0,86, 0,76, 0,60,

0,47, 0,39, 0,25; **ACPE**: 0,95, 0,27; **ACFE**: 0,92, 0,88, 0,80, 0,69, 0,53, 0,43, 0,37, 0,31, 0,27, 0,19), onde alguns destes valores foram semelhantes aos encontrados para os padrões (Rutina:0,78; Quercetina:0,28 e 0,18; Ácido Gálico: 0,22). **ACrPH** não apresentou Rf para a detecção flavonoidica.

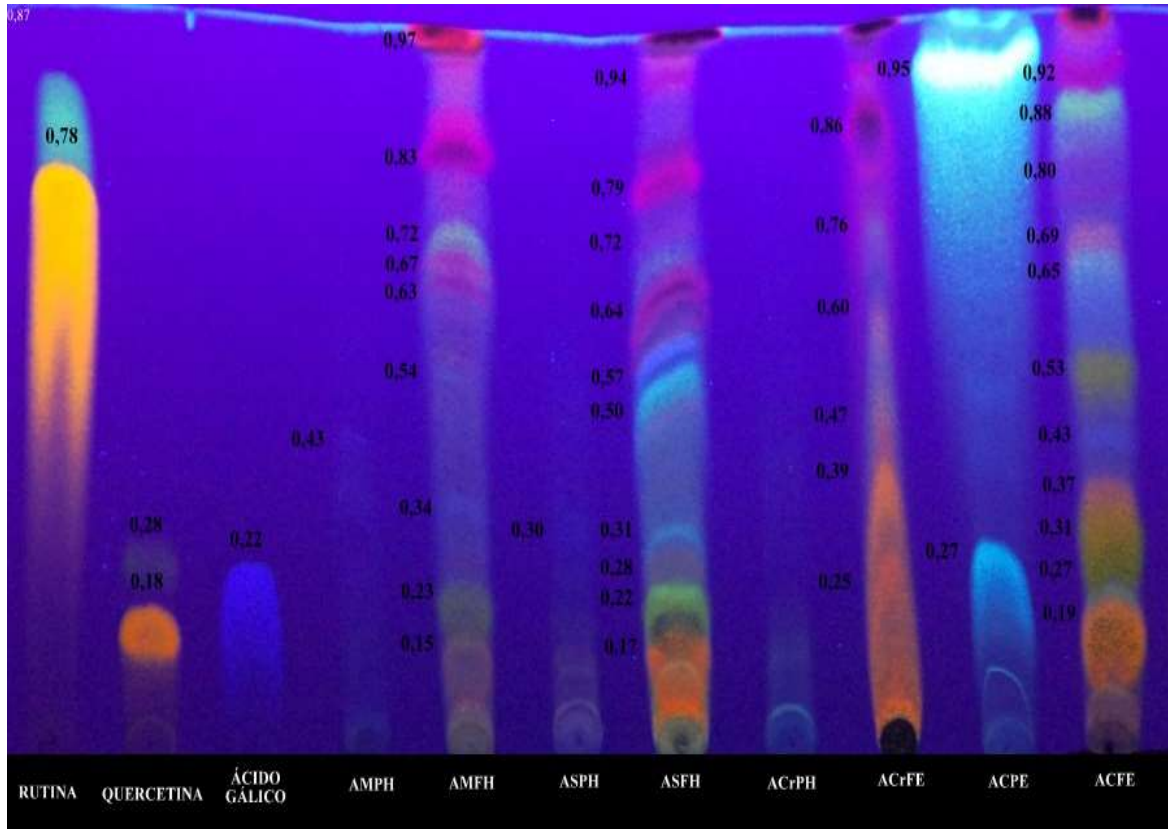


FIGURA 3. Cromatograma dos extratos de *A. muricata* polpa hidroetanólico (AMPH), *A. muricata* folha hidroetanólico(AMFH), *A. squamosa* polpa hidroetanólico (ASPH), *A. squamosa* folha hidroetanólico (ASFH), *A. crassiflora* polpa hidroetanólico (ACrPH), *A. crassiflora* folha etanólico (ACrFE), *A. cacans* polpa etanólico (ACPE), *A. cacans* folha etanólico (ACFE), e padrões Rutina, Quercetina e Ácido Gálico em sistema eluente Clorofórmio-metanol-água (75:23:2): com revelação em presença (NP/PEG). Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).

Os diferentes extratos de exibiram nas CCD sob luz UV após a revelação, manchas fluorescentes de coloração amarelo-alaranjado, sugerindo a presença de flavonóis derivados de quercetina e miricetina e seus glicosídeos, além de manchas azul clara e azul violácea, que sugerem a presença de ácidos fenólicos carboxílicos, como já evidenciado pelos referidos cálculos de Rf citados anteriormente (Figura 3) (Wagner e Bladt, 1986). Extratos de *A. crassiflora* foram caracterizados e dois alcaloides, aterospermidina e liriodenina foram identificados, sobressaindo a atividade antimicrobiana e citotóxica (Gonçalves et al., 2008; Santana et al. 2009).

3.5.2 Detecção Terpenoides

A eluição cromatográfica e os cálculos dos referidos valores de Rf indicaram a presença terpenoides nos diferentes extratos brutos (RFS= **AMPH**: 0,98, 0,36; **AMFH**: 0,97, 0,71, 0,64, 0,51, 0,38, 0,14, 0,07; **ASFH**: 0,62, 0,44, 0,35, 0,30, 0,19), onde alguns destes valores foram semelhantes aos encontrado para os padrões (Eucalipto: 0,93, 0,89, 0,74, 0,60, 0,46, 0,37, 0,20; Alecrim: 0,83, 0,67, 0,51, 0,37, 0,33, 0,11; Citronelol: 0,96, 0,54, 0,09). **AsPH** não apresentou Rf para a detecção de terpenoides (Figura 4).

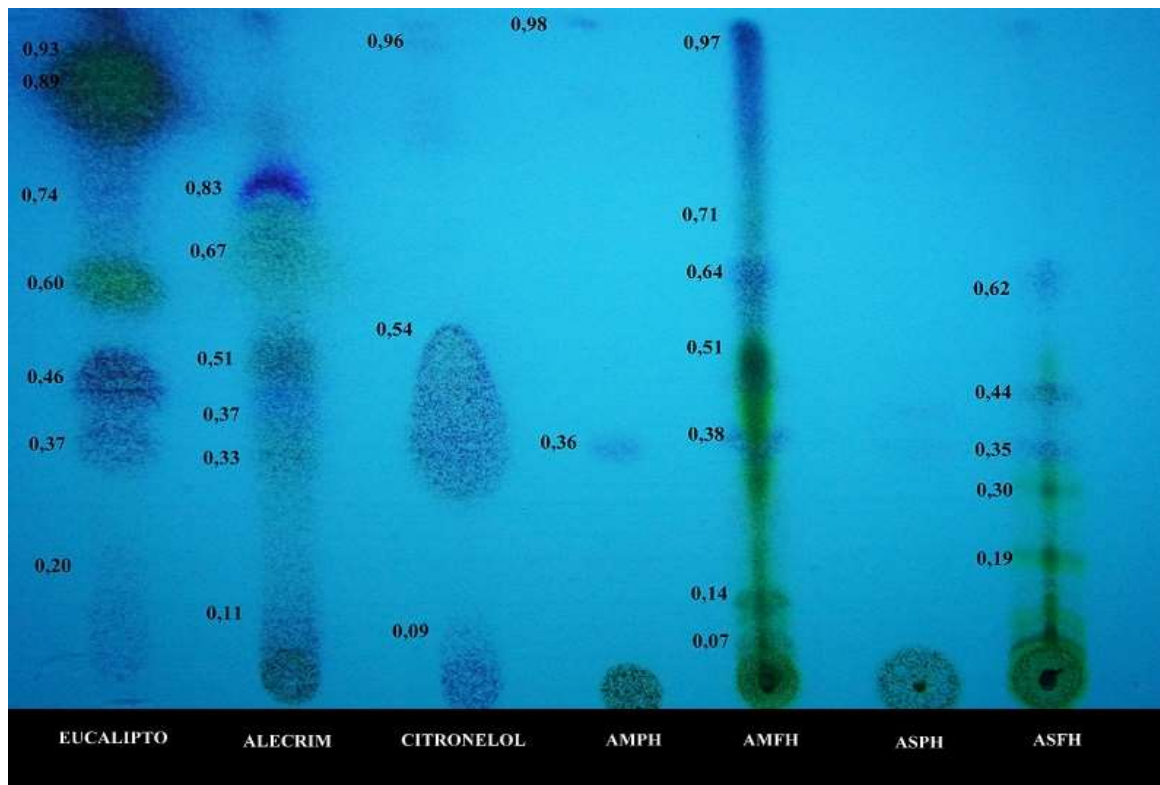


FIGURA 4. Cromatograma dos extratos de *A. muricata* polpa hidroetanólico (AMPH), *A. muricata* folha hidroetanólico(AMFH), *A. squamosa* polpa hidroetanólico (ASPH), *A. squamosa* folha hidroetanólico (ASFH), e padrões Eucalipto, Alecrim, Citronelol, em sistema eluente Tolueno-Acetato de etila (93:7): Com o revelador vanilina sulfúrica seguido de aquecimento a 110°C em sistema fechado para identificação de terpenóides. Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).

A eluição cromatográfica e os cálculos dos referidos valores de Rf indicaram a presença terpenoides nos diferentes extratos brutos (RFS= **ACrFE**: 0,97, 0,35, 0,22, 0,17; **ACPE**: 0,96, 0,44, 0,33, 0,14; **ACFE**: 0,96, 0,42, 0,36, 0,30, 0,11), onde alguns destes valores foram semelhantes aos encontrado para os padrões (Eucalipto: 0,89, 0,81, 0,64, 0,58, 0,46, 0,34, 0,22; Alecrim: 0,90, 0,67, 0,57, 0,47, 0,35, 0,21; Citronelol: 0,93, 0,70, 0,42). **ACrPH** não apresentou Rf para a detecção de terpenoides (Figura 5).

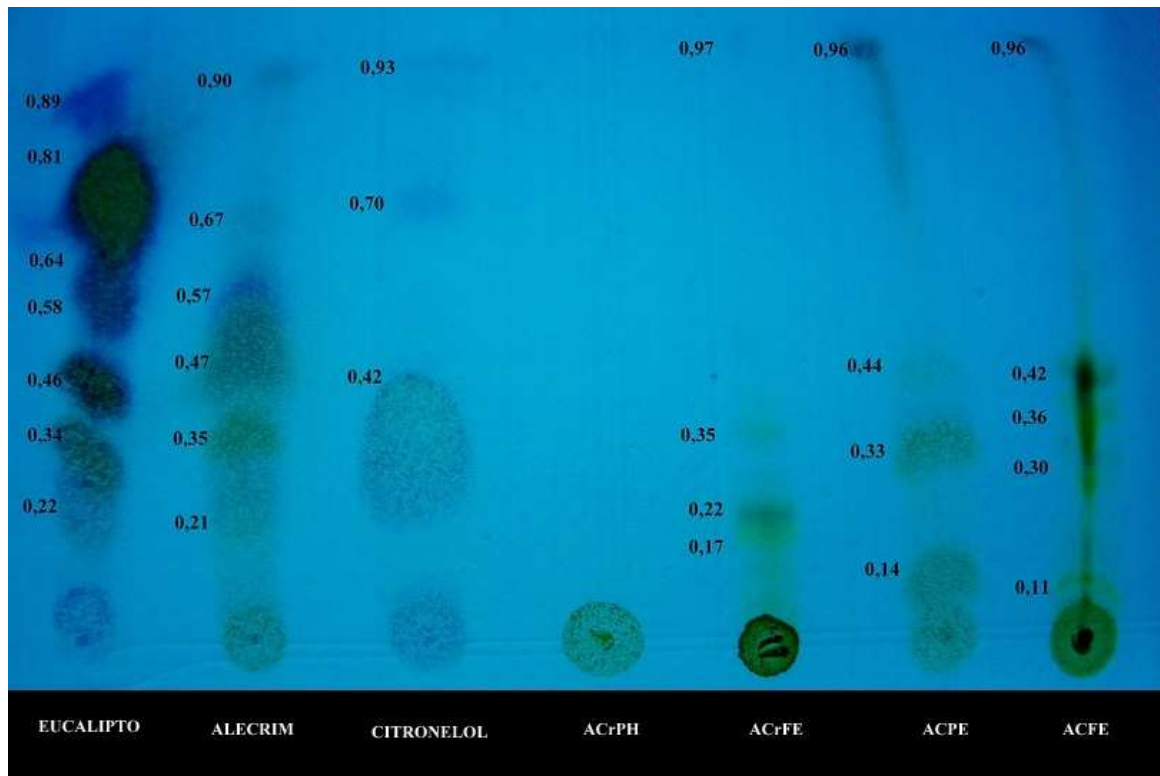


FIGURA 5. Cromatograma dos extratos de *A. crassiflora* polpa hidroetanólico (ACrPH), *A. crassiflora* folha etanólico (ACrFE), *A. cacans* polpa etanólico (ACPE), *A. cacans* folha etanólico (ACFE), e padrões Eucalipto, Alecrim, Citronelol em sistema eluente Tolueno-Acetato de etila (93:7): Com o revelador vanilina sulfúrica seguido de aquecimento a 110°C em sistema fechado para identificação de terpenóides. Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).

Quando observada a CCD dos diferentes extratos de ambas as plantas realizadas para detecção de terpenóides após a revelação, manchas de coloração azul e azul-violácea e violeta foram observadas, demonstrando possível presença de alcoóis, monoterpénos, ésteres e derivados de fenilpropano, sendo que para ASPH e ACrPH nenhuma mancha foi verificada (Figuras 4 e 5) (Wagner e Bladt, 1986).

3.5.3 Detecção Alcaloides

A eluição cromatográfica e os cálculos dos referidos valores de Rf indicaram a presença de compostos polifenólicos nos diferentes extratos brutos (RFS= AMFH: 0,94, 0,72, 0,60; ASFH: 0,91, 0,73, 0,43; ACrFE: 0,97, 0,81, 0,72, 0,47, 0,22; ACFE: 0,87, 0,55, 0,33), onde alguns destes valores foram semelhantes aos encontrados para os padrões (Cafeína: 0,51, Emeína: 0,12, Solasidina: 0,36). AMPH, ASPH, ACrPH, ACPE não apresentou Rf para a detecção de alcaloides (Figura 6).

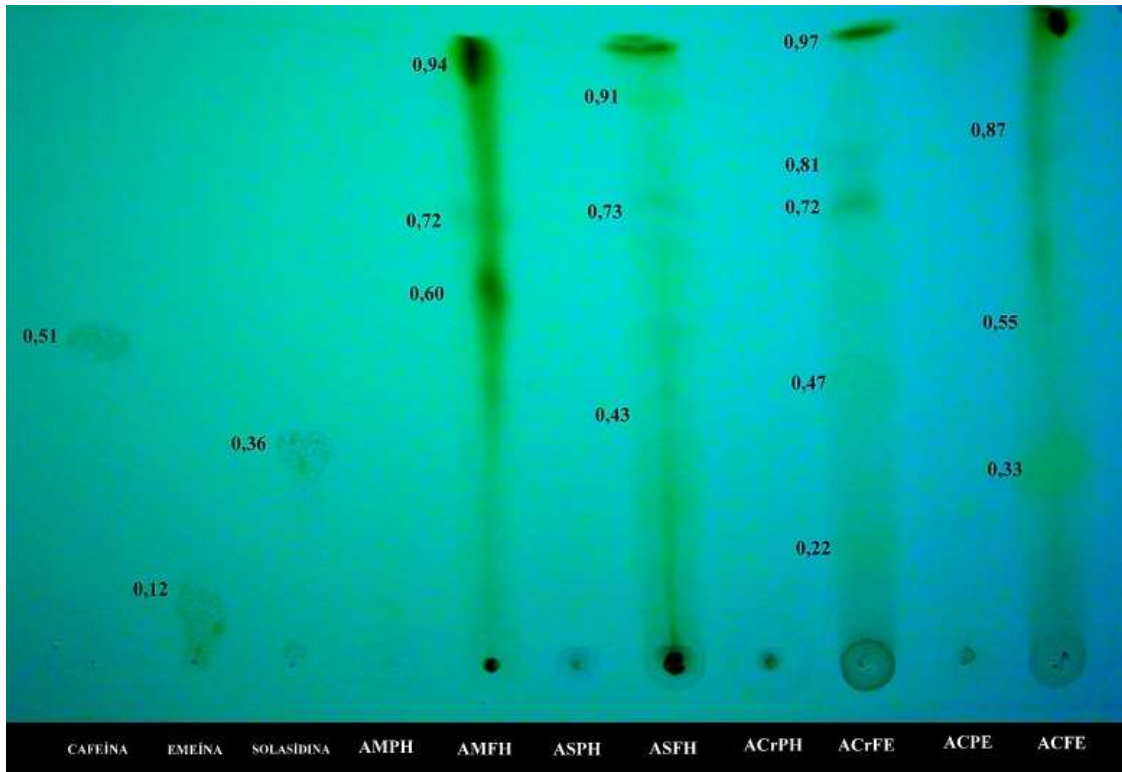


FIGURA 6. Cromatograma dos extratos de *A. muricata* polpa hidroetanólico (AMPH), *A. muricata* folha hidroetanólico(AMFH), *A. squamosa* polpa hidroetanólico (ASPH), *A. squamosa* folha hidroetanólico (ASFH), *A. crassiflora* polpa hidroetanólico (ACrPH), *A. crassiflora* folha etanólico (ACrFE), *A. cacans* polpa etanólico (ACPE), *A. cacans* folha etanólico (ACFE) e padrões Cafeína, Emeína e Solasidina em sistema eluente acetato de etila-metanol-água (100:13,5:10): Como revelador foi utilizado o reagente dragendorff. Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).

Os resultados corroboram com o proposto por Lima (2007) e Luna (2006), de que esta família é muito rica na biodiversidade de compostos químicos como: compostos aromáticos, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, compostos benzênicos, catequinas, proantocianidina, óleos essenciais, terpenos, esteroides, alcaloides, acetogeninas, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, vitaminas, carotenos, saponinas, entre outros.

Flavonoides encontrados no gênero *Annona* foram flavonas (luteonina) e flavonóis (canferol, quercetina, ramnetina, rutina e isorramnetina) descritos para as espécies *A. crassiflora*, *A. tomentosa*, *A. monticola*, *A. warmingiana*, *A. dolichorcharpa* (Rinaldi, 2007).

A partir de *A. squamosa* e *A. senegalensis* foram isolados monoterpenos. Enquanto diterpenos foram descritos em *A. squamosa* e sesquiterpenos em *A. bullata*, terpenóides foram isolados do fruto de *A. muricata* e de *A. reticulata* (Rinaldi, 2007; Hiruma-Lima, 2003).

4 Conclusões

Para o teste antiglicação BSA/MGO, obtiveram-se melhores resultados em ambos os extratos etanólicos da polpa e folha de *A. muricata* e *A. crassiflora*, respectivamente. Para quantificação de fenóis os melhores resultados obtidos foram em ambos os extratos (polpa e folha) etanólicos de *A. crassiflora*. Para quantificação de flavonoides, os melhores resultados foram o hidroetanólico da folha de *A. squamosa* e o etanólico da polpa de *A. cacans*, confirmado pela CCD para Flavonoides. A CCD para Terpenoides apresentou resultados mais significativos no extrato hidroetanólico de *A. squamosa* folha hidroetanólico, e etanólico da polpa de *A. cacans*. E a CCD para alcaloides somente apresentou valores no extrato etanólico de *A. cacans*.

A. crassiflora apresentou os melhores resultados para teste antiglicação, bem como para quantificação de fenóis.

Para flavonoides tanto na quantificação, quanto na CCD, os melhores resultados foram encontrados na folha de *A. squamosa* e na polpa de *A. cacans*. (que apresentou melhor resultado antiglicação entre as polpas).

5 Referências

- Alali, F.Q., Liu, X., McLaughlin, J.L. (1999). Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, 62, 3, 504-540.
- Alonso, J. (1998). Tratado de Fitomedicina: Bases clínicas e farmacológicas. Corpus Libros.
- Araya, H. (2003). Studies on Annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* seeds. Tese Doutorado, Meiji University, Tokyo.
- Babu, P.V.A., Sabitha, K.E., Shyamaladevi, C.S. (2008). Effect of green tea extract on advanced glycation and cross-linking of tail tendon collagen in streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 280-285.
- Bailey, A.J., Paul, R.G., Knot, L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106, 12, 1-56.
- Beaulieu, L.F., Harris, C.S., Saleem, A., Cuerrier, A., Haddad, P.S., Martineau, L.C., Benett, A.I., Arnason, J.T. (2010) Inhibitory effect of the cree tradicional medicine wiishichimanaan (Vaccinium vitis-idaea) on Advanced glycation endproduct formation: Identification of active principles. *Phytotherapy Research*, 24, 741-747.
- Bousova, I., Martin, J., Jahodar, L., Dusek, J., Palicka, V., Drsata, J. (2005). Evaluation of *in vitro* effects of natural substances of plant origin using a model of protein glycosylation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 937-957, 2005.

- Brito, H.O., Noronha, E.P., Franca, L.M., Brito, L.M.O., Prado, M.S.A. (2008). Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 89, 180–184.
- Brownlee, M. (2000). Negative consequences of glycation. *Metabolism*, 49, 1, 9–13.
- Chang, F.R., Yang, P.Y., Lin, J.Y., Lee, K.H., Wu, Y.C. (1998). Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. *Journal of Natural Products*, 61, 437-439.
- Chapman, J.A., Tzaphlidou, M., Meek, K.M. (1990). The collagen fibril: a model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microscope Review*, Oxford, 3, 1, 143-182.
- Chen, C.Y., Chang, F.R., Cho, C.P., Wu, Y.C. (2000). ent-Kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. *Journal of Natural Products*, 63, 1000-1003.
- Duraisamy, Y., Gaffney, J., Slevin, M., Smith, C.A., Williamson, K., Ahmed, N. (2003). Aminosalicylic acid reduces the antiproliferative effect of hyperglycaemia, advanced glycation endproducts and glycated basic fibroblast growth factor in cultured bovine aortic endothelial cells: Comparison with aminoguanidine. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 246, 143–153.
- Farrar, J.L., Hartle, D.K., Hargrove, J.L., Greenspan, P. (2007). Inhibition of protein glycation by skins and seeds of the muscadine grape. *Biofactors*, 30, 193–200.
- Gonçalves, A.E.S.S. (2008). Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C. Dissertação mestrado, Faculdade de ciências farmacêuticas - Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, São Paulo.
- Gugliucci A, Kotani K, Taing J *et al* (2009). Short-term low calorie diet intervention reduces serum advanced glycation end products in healthy overweight or obese adults. *Annals of Nutrition and Metabolism Aims e Scope*, 54, 197–201.
- Hiruma-Lima, C.A., Di stasi, L.C. (2003). Magnoliales medicinais. In: Guimarães, M.E., Santos, M.N., Di stasi, L.C., Hiruma-lima, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, 2ed. São Paulo: UNESP, 2003. p. 89-109.
- Ho, S.C., Wu, S.P., Lin, S.M., Tang, Y.L. (2010). Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. *Food Chemistry*, 122, 768-774.
- Hshieh, C.L., Lin, Y.C., Ko, W.S., Peng, C.H., Huang, C.N., Peng, R.Y. (2005). Inhibitory effect of some selected nutraceutical herbs on LDL glycation induced by glucose and glyoxal. *Journal of Ethnopharmacology*, 102-357.
- Hsieh, C.L, Peng, C.H., Chyau, C.C., Lin, Y.C., Wang, H.E., Peng, R.Y. (2007). Low-densitylipoprotein, collagen, and thrombin models reveal that *Rosemarinus officinalis* L. exhibits potent antiglycative effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2855-2884.
- Islam, M.D., Ishita, I.J., Jung, H.A., Choi, J.S. (2014). Vicentin 2 isolated from *Artemisia capillaris* exhibited potente anti-glycation properties. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 55-62.
- Joly, A.B. (1979). *Botânica, introdução a taxonomia vegetal*. São Paulo: Nacional.
- Lage, G.A. (2011). Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. Dissertação mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

- Li, H., Nakamura, S., Morita, T., Suzuki, M., Pischetsrieder, M., Niwa, T. (2006). N2-carboxyethyl-2'-deoxyguanosine, a DNA glycation marker, in kidneys and aortas of diabetic and uremic patients. *Kidney International*, 69, 388–392.
- Lima, M.D. (2007). Perfil cromatográfico dos extratos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência. Dissertação Mestrado - Universidade Federal de Alagoas, Alagoas.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A. (2002). *Plantas Medicinais do Brasil*. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Luna, J.S. (2006). Estudo de Plantas Bioativas. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2006.
- Lunceford, N., Gugliucci, A. (2005). *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*, 76, 419-431.
- Maas, P.J.M., Rainer, H., Lobão, A.Q. (2001). Annonaceae. In: *Lista de espécies da flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Maillard, L.C. (1912). Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 154, 66–68.
- Miura, T., Yamashita, M., Zaninovic, V., Cartier, L., Takehisa, J., Igarashi, T., Ido, E., Fujiyoshi, T., Sonoda, S., Tajima, K., Hayami, M. (1997). Molecular Phylogeny of Human T-Cell Leukemia Virus Type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. *Journal of Molecular Evolution*, 44(Suppl1), S76–S82.
- Morrone, M.S., Assis, A.M.A., Rocha, R.F., Gasparotto, J., Gazola, A.C., Costa, G.M., Zucolotto, S.M., Castellanos, L.H., Ramos, F.A., Schenkel, E.P., Reginatto, F.H., Gelain, D.P., Moreira, J.C.F. (2013). *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation in vitro and ex vivo models. *Food and chemical toxicology*, 69, 55-62.
- Oliveira, M.J.R., Simões, M.J.S., Sassi, C.R. (2006). Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 8, 2.
- Oliveira, B.H., Sant'ana, A.E., Bastos, E.D.Z. (2002). Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, 13, 368-371.
- Peng, X., Zheng, Z., Cheng, K-W., Shan, F., Ren, G.X., Chen, F. (2008). Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents virexin and isovitaxin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chemistry*, 106, 475–481.
- Peng, X., Cheng, K.-W., Ma, J., Chen, B., Ho, C.-T., Lo, C., et al. (2008a). Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1907–1911.
- Peyroux, J., Sternberg, M. (2006). Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathologie Biologie*, 54, 405–419.
- Rahbar, S., Yerneni, K. K., Scott, S., Gonzales, N., & Lalezari, I. (2000). Novel inhibitors of advanced glycation endproducts (part II). *Molecular Cell Biology Research Communications*, 3, 360–366.

- Ramkissoon, J.S., Mahomoodally, M.F., Ahmed, N., Subratty, A.H. (2013). Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropic Medicine*, 561-569.
- Rinaldi, M.V.N. (2007). Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. Dissertação Mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Reiser, K.M., Amigable, M.A., Last, J.A. (1992). Nonenzymatic glycation of type I collagen: the effects of aging on preferential glycation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 34, 24207-24216.
- Santana, D.C. (2009). Reação do extrato bruto de acetato de etila da *Annona crassiflora* sobre espécies de plantas daninhas. In: Simpósio iberoamericano de plantas medicinais, Cuiabá. [Anais]
- Shankaraiah, G., Tiwari, A.K., Kumar, T.V., Kumar, D.A., Raju, S.S.N., Babu, K.H., Varala, R., Rao, M.M.B., Babu, K.S. (2013). New protein glycation inhibitory free radical scavenging compound from *Duranta repens* L. *Journal of Pharmacy research*, 7, 162-166.
- Shirwaikar, A., Rajendran, K., Kumar, C.D., Bodla, R. (2004). Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 91: 171-175.
- Stern, D.M., Yan, S.D., Yan, S.F., Schmidt, A.M. (2002). Receptors for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Research Reviews*, 1, 1-15.
- Telles, M.P.C., Valva, F.D., Bandeira, L.F., Coelho, A.S.G. (2003). Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica*, 26, 1, 123-129.
- Thornalley, P.J., Langborg, A., Minhas, H.S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochemical Journal*, 344, 109-116.
- Wagner, H., Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Verlag, Berlin, 2, 384p.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*; 16, 97-110.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4026-4037.
- Wu, C. H., & Yen, G. C. (2005). Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3167-3173.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho, de acordo com as diferentes metodologias adotadas tornaram possível concluir que os extratos das folhas e polpas dos frutos das espécies *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. crassiflora*, e *A. cacans*, apresentam potencialidade fotoprotetora e atividade antioxidante e antiglicante, possivelmente devido à presença de constituintes químicos nos extratos, como compostos fenólicos, principalmente os flavonoides.

Todas as plantas apresentaram em algum extrato, atividade representativa tanto para atividade antioxidante, quanto para capacidade fotoprotetora, sendo assim promissoras para testes mais específicos na busca de compostos bioativos