

***Annona muricata* L.: Análise química e biológica dos frutos de  
gravioleira**

**CLARA DOS REIS NUNES**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2011**

***Annona muricata* L.: Análise química e biológica dos frutos de gravioleira**

**CLARA DOS REIS NUNES**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal com ênfase em Química de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dr. Daniela Barros de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2011

***Annona muricata* L.: Análise química e biológica dos frutos de gravioleira**

**CLARA DOS REIS NUNES**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal com ênfase em Química de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dr. Daniela Barros de Oliveira

Aprovada em 22 de Fevereiro de 2011

Comissão examinadora:

---

Prof. Michelle Frazão Muzitano (D.S., Química de Produtos Naturais) UFRJ

---

Prof. Rodrigo Rodrigues de Oliveira (D.S., Química de Produtos Naturais) UFRJ - RJ

---

Profa. Silvia Menezes de Faria Pereira (DS., Engenharia e Ciencia dos Materiais) UENF - RJ

---

Prof. Daniela Barros de Oliveira (Orientadora) (D.S., Química de Produtos Naturais) UENF

*Dedico...*

*À minha mãe Sara Celeste.*

*" Fé e Esperança...*

*Onde encontro forças para olhar*

*Para as dificuldades e saber que Deus*

*Vê-me muito além do que eu posso imaginar*

*Nele respiro fundo e...*

*Começo tudo de novo*

*Só por Ele, Nele e com Ele...*

*“Tudo posso Naquele que me fortalece”.*

*Filipenses 4.13*

## **Agradecimentos**

Antes de tudo, a Deus que é meu escudo e fortaleza, por me iluminar, conduzir e me dar sabedoria em minhas decisões e me fortalecer nos momentos mais difíceis, não me deixando desistir, mesmo quando tudo parecia impossível. Sem Deus nada seria possível e esta conquista nunca teria sido alcançada.

À UENF pelo suporte financeiro e oportunidade de aqui desenvolver este trabalho;

Aos professores Michelle Frazão Muzitano, Rodrigo Rodrigues de Oliveira e Silvia Menezes de Faria Pereira por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho;

À Camila de Oliveira Mansur e Luzineide Tinoco pelas análises realizadas no RMN, nos laboratórios do LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por RMN) e ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jones (Dept. de Bioquímica - UFRJ);

Ao prof. Rodrigo Rodrigues de Oliveira pela análise da elucidação estrutural, prestando uma valiosa contribuição a este trabalho;

À prof<sup>a</sup> Daniela Barros de Oliveira por abraçar a idéia deste trabalho aceitando me orientar, pelo ensinamento, paciência e por acreditar que sou capaz;

À prof<sup>a</sup> Michelle Frazão Muzitano, pelo direcionamento em toda parte biológica, por toda ajuda, paciência, ensinamento e dedicação, sempre se mostrando acessível e disposta;

À minha mãe Sara, que sempre esteve presente, não medindo esforços para que esta minha vitória fosse alcançada e sempre acreditou que eu pudesse chegar aonde cheguei. Obrigada mãe por todas as suas orações, preocupação e por toda a educação que me proporcionou. Te amo!

Aos amigos Natalia, Shalline, Lorena, Larissa, Fernanda, Danielle, Isabela, Rodrigo e Glauber, pelo companheirismo, apoio, momentos de descontração e por sempre estarem disponíveis nas horas em que precisei. Não teria conseguido sem a ajuda de vocês.

Aos amigos Marlon, Thatiana, Thiago e William pela ajuda na parte biológica, obrigada por cada ensinamento, paciência e companheirismo. Vocês me ajudaram muito!

Aos amigos do LTA: Andréia, Aninha, Erikinha, Geraldo, Vanessinha, João, Simone, Juliana, Silvania, Luciana Coutinho e Valdinéia. Muito obrigada pelos momentos de descontração, vocês são muito especiais!

À amiga Silvia, pelo carinho, conselhos, amizade, companheirismo, incentivo, preocupação e dedicação. Você é muito amada e tem lugar especial em meu coração. Que bom que você existe!

Enfim, a todos que me ajudaram, cada um do seu modo, de maneira direta ou indireta, a conquistar esta vitória.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>xviii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xx</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 Alimentos Funcionais.....	4
3.2 Classes de Substâncias.....	5
3.2.1 Terpenos ou Terpenóides.....	7
3.2.2 Flavonóides.....	10
3.2.3 Taninos.....	13
3.3 Radicais Livres X Antioxidantes.....	15
3.4 Imunofarmacologia.....	17
3.5 Processo Inflamatório.....	20
3.6 Escolha do Material Vegetal.....	21
3.6.1 Descrição Botânica.....	22

3.6.1.1 Família Annonaceae.....	22
3.6.1.2 Espécie <i>Annona muricata</i> L.....	23
3.6.2 Propriedades Biológicas Descritas.....	24
3.6.3 Constituintes Químicos Descritos.....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 Coleta de Material Vegetal e Identificação Botânica.....	38
4.2 Parte Química: Aspectos Experimentais Gerais.....	39
4.2.1 Preparação do Sumo e Frações.....	43
4.2.2 Fracionamento, Isolamento e Identificação de Substâncias.....	44
4.2.3 Atividade Antioxidante.....	46
4.2.4 Avaliação e Dosagem do Teor de Taninos e Fenóis Totais.	47
4.2.4.1 Método para Dosagem de Taninos Hidrolisáveis....	47
4.2.4.2 Método para Dosagem de Taninos Condensados..	47
4.2.4.3 Método para Determinação de Fenóis Totais.....	48
4.3 Parte Biológica.....	49
4.3.1 Ensaio Imunofarmacológico.....	49
4.3.1.1 Cultivo Celular.....	49
4.3.1.2 Avaliação da Atividade Imunomodulatória na Produção de Óxido Nítrico em RAW 264.7.....	49
4.3.1.3 Avaliação da Citotoxicidade e Viabilidade Celular em RAW 264.7 e Células U937.....	49
4.3.1.4 Análises Estatísticas.....	50
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
5.1 Perfil Cromatográfico e Fracionamento.....	51
5.2 Isolamento da Substância.....	66
5.3 Elucidação Estrutural da Substância G-1.....	70
5.3.1 Infravermelho.....	70
5.3.2 Técnicas Monodimensionais.....	71
5.3.2.1 RMN <sup>1</sup> H.....	72
5.3.2.2 RMN <sup>13</sup> C.....	75
5.3.3 Técnicas Bidimensionais.....	78
5.3.3.1 COSY <sup>1</sup> H - <sup>1</sup> H.....	78

5.3.3.2 HMQC.....	79
5.3.3.3 HMBC.....	81
5.5 Atividade Antioxidante.....	88
5.6 Determinação do Teor de Taninos.....	93
5.7 Determinação do Teor de Fenóis.....	95
5.8 Atividades Imunofarmacológicas.....	97
5.8.1 Avaliação da atividade imunomodulatória na produção de NO em RAW 264.7.....	97
5.8.2 Avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular em RAW 264.7 e células U937.....	99
<b>6. RESUMO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>104</b>
6.1 Avaliação do Perfil Químico.....	104
6.2 Avaliação da Atividade Antioxidante.....	105
6.3 Avaliação do Teor de Taninos e Fenóis Totais.....	105
6.4 Avaliação da Atividade Imunofarmacológica.....	106
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química de Terpenóides e Fenilpropanóides.....	7
Figura 2: Estrutura química de monoterpenos.....	8
Figura 3: Estrutura química do sesquiterpeno.....	8
Figura 4: Biossíntese de terpenos.....	9
Figura 5: Biossíntese geral dos flavonóides, mostrando as etapas de formação da chalcona intermediária básica.....	10
Figura 6: Estrutura básica dos flavonóides.....	11
Figura 7: Estrutura das principais classes de flavonóides.....	12
Figura 8: Estruturas de taninos hidrolisáveis: Galotanino e Elagitanino.....	14
Figura 9: Estrutura de tanino condensado.....	14
Figura 10: Antioxidantes sintéticos BHA e BHT, respectivamente.....	17
Figura 11: Fluxograma representativo dos eventos da resposta inflamatória..	20
Figura 12: Fruto da gravioleira.....	23
Figura 13: Estrutura química da uvaricina.....	27
Figura 14: Estrutura química básica das acetogeninas.....	27
Figura 15: Estrutura básica das acetogeninas das Annonaceae.....	28

Figura 16: Flavonóides isolados de espécies de Annonaceae.....	28
Figura 17: Exemplos de terpenos isolados de espécies de Annona.....	37
Figura 18: Gráfico da área do pico X massa (em µg) injetada de rutina obtido a partir dos valores apresentados na Tabela 8.....	41
Figura 19: Gráfico da área do pico X massa (em µg) injetada de quercetina obtido a partir dos valores apresentados na Tabela 8.....	42
Figura 20: Esquema da obtenção do sumo e frações a partir da polpa de <i>A. muricata L.</i> .....	43
Figura 21: Esquema do fracionamento e purificação do sumo.....	45
Figura 22: Representação da reação do radical DPPH com um antioxidante (Flavonóide).....	46
Figura 23: Fluxograma representativo para a dosagem de taninos e fenóis totais da polpa dos frutos de <i>A. muricata L.</i> .....	48
Figura 24: Cromatograma das frações obtidas a partir do sumo da polpa dos frutos de graviola realizada por CCD, mostrando as manchas características. Fase móvel: butanol: ácido acético: água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.....	52
Figura 25: Cromatograma 1: perfil químico da rutina avaliado por CLAE e estrutura química da rutina.....	53
Figura 26: Cromatograma 2: perfil químico da rutina avaliado por CLAE e estrutura química da quercetina.....	54
Figura 27: Estrutura química de um flavonóide com as partes que originam as bandas de absorção características no UV.....	55
Figura 28: Espectros de ultravioleta dos flavonóides rutina (A) e quercetina (B).....	56
Figura 29: Cromatograma 3, perfil químico da fração acetato de etila (FAcEt) avaliada por CLAE.....	57
Figura 30: Cromatograma 4, perfil químico da subfração F1 avaliada por CLAE.....	58
Figura 31: Cromatograma 5, perfil químico da subfração F2 avaliada por CLAE.....	59
Figura 32: Cromatograma 6, perfil químico da co-cromatografia da fração acetato de etila (FAcEt) junto com o flavonóide rutina avaliados por CLAE.....	61
Figura 33: Cromatograma 7, perfil químico da co-cromatografia da subfração F1 junto com o flavonóide rutina avaliados por CLAE.....	62
Figura 34: Cromatograma 8, perfil químico da co-cromatografia da subfração F2 junto com os flavonóides rutina e quercetina avaliados por CLAE.....	63

Figura 35: Espectros de Ultravioleta dos picos de tempo de retenção (TR) igual a 16,683 minutos indicativo da presença de rutina e 22,70 minutos, indicativo da presença de quercetina pela co-cromatografia.....	64
Figura 36: Cromatograma 9, perfil químico da amostra F6b avaliado por CLAE.....	66
Figura 37: Cromatograma das subfrações F6b1, F6b2 e F6b3 realizado em CCD, mostrando as manchas majoritárias. Fase móvel: butanol: ácido acético: água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.....	67
Figura 38: Cromatograma da subfração F6b1 realizado em CCD, mostrando a mancha da substância isolada. Fase móvel: butanol: ácido acético: água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.....	68
Figura 39: Cromatograma 10, perfil químico da substância isolada, avaliado por CLAE.....	68
Figura 40: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 47,72 minutos, correspondente à substância isolada G1.....	69
Figura 41: Espectro de Infravermelho da Substância G1.....	71
Figura 42: Espectro de RMN <sup>1</sup> H de G-1 (400 MHz).....	73
Figura 43: Espectro de RMN <sup>1</sup> H de G-1 (400 MHz), com a expansão da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos.....	73
Figura 44: Espectro de RMN <sup>1</sup> H de G-1 (400 MHz), com a expansão da região dos sinais.....	74
Figura 45: Espectro de RMN <sup>13</sup> C de G-1 (400 MHz).....	76
Figura 46: A) Espectro de RMN APT de G-1 (400 MHz); B) Expansão da região dos sinais.....	77
Figura 47: Espectro de RMN 2D- COSY para G-1.....	78
Figura 48: Espectro de RMN-2D HMQC para G-1.....	79
Figura 49: Expansão do espectro de RMN -2D HMQC para G-1 (400 MHz)....	80
Figura 50: Expansão do espectro de RMN -2D HMQC para G-1 (400 MHz) para a região de 120 a 138 ppm.....	80
Figura 51: Espectro de RMN-2D HMBC para G-1(400 MHz).....	81
Figura 52: Ampliação do espectro de RMN-2D HMBC para G-1(400 MHz).....	82
Figura 53: Ampliação do espectro de RMN-2D HMBC para G-1(400 MHz) para a região de -10 a 160 (F1) ppm.....	82
Figura 54: Ampliação do espectro de RMN-2D HMBC para G-1(400 MHz) para a região de 8 a 40 ppm (F1).....	83

Figura 55: Estrutura química do benzoato-1-metil-heptila.....	85
Figura 56: Correlações bidimensionais observadas por HMBC e HSQC.....	87
Figura 57: Estrutura do benzoato-2-metil-heptila (G-1) comparada com os dados da literatura (Marchese, 2009; dos Santos, 2008; Argondizo et al., 2007; Araújo e Chaves, 2005; Ritter, 2005; Raya, 2005; Correia, 2002).....	87
Figura 58: Atividade antioxidante do sumo, frações, subfrações e G1 em comparação com os padrões de referência quercetina, rutina, apigenina e BHT (n=3).....	91
Figura 59: Estrutura química da apigenina, mostrando o grupamento OH nos carbonos 5, 7 e 4'.....	92
Figura 60: Estrutura química da procianidina, um exemplo de tanino condensado.....	94
Figura 61: Avaliação da atividade imunomodulatória do sumo e frações na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Como controle negativo foram usados macrófagos não-tratados e não-estimulados e como controle positivo macrófagos estimulados 1 µg/ml LPS e não-tratados. Média aritmética ± desvio padrão (n = 3). p < 0.05 (*) e p < 0.001 (**) em relação ao controle positivo.....	98
Figura 62: Citotoxicidade mensurada pela porcentagem de liberação específica de LDH. A) Células U937 foram plaqueadas e incubadas com o sumo e frações a 37°C por 48h. Foram utilizadas como controle negativo células U937 não-tratadas e como controle positivo células U937 não-tratadas acrescidas de 10µL de uma solução de 10X Triton X-100. B) Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados e estimulados com 1.0 µg/ml de LPS por 24 h a 37 °C com ou sem o sumo e frações. Média aritmética ± desvio padrão (n = 3).....	100
Figura 63: Testes de viabilidade do sumo e frações em macrófagos RAW 264.7 e células leucêmicas U937 através do método de MTT. A) células U937 (1x10 <sup>6</sup> células/mL) e B) Macrófagos RAW 264.7 (1x10 <sup>5</sup> células/mL) foram incubadas respectivamente por 48 e 24 horas com as amostras e em seguida a viabilidade das culturas foi mensurada pelo teste de metabolização do MTT. Triton (células cultivadas apenas em meio de cultura mortas pela adição de triton 10X antes da adição do MTT) representa o controle negativo de viabilidade. Média aritmética ± desvio padrão (n = 3).....	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Flavonóides isolados de espécies de Annonaceae.....	29
Tabela 2: Distribuição de flavonóides nas espécies de Annonaceae.....	34
Tabela 3: Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE.....	40
Tabela 4: Dados de massa (em µg) injetada de rutina e as respectivas áreas obtidas.....	41
Tabela 5: Dados de massa (em µg) injetada de quercetina e as respectivas áreas obtidas.....	42
Tabela 6: Sistema de solventes utilizado na cromatografia em coluna aberta aplicado nas frações.....	44
Tabela 7: Tempos de retenção e áreas correspondentes dos flavonóides quercetina e rutina.....	55
Tabela 8: Quantificação dos flavonóides presentes nas frações da polpa dos frutos de <i>A. muricata</i> L.....	65
Tabela 9: Bandas e suas respectivas intensidades observadas no infravermelho.....	71
Tabela 10: Sinais de <sup>1</sup> H listados para a amostra G-1.....	74
Tabela 11: Sinais de <sup>13</sup> C listados para a amostra G-1.....	76
Tabela 12: Sinais listados de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da substância G-1.....	84
Tabela 13: Alguns ácidos aromáticos derivados do benzoato relatados na literatura.....	85

Tabela 14: Comparação dos sinais de G-1 e os sinais encontrados na literatura.....	86
Tabela 15: Atividade antioxidante do sumo, das frações, das subfrações, da G-1, dos padrões fenólicos (quercetina, rutina, apigenina) e do BHT.....	89
Tabela 16: Dados obtidos da análise do teor de taninos condensados e hidrolisáveis da polpa da graviola.....	94
Tabela 17: Dados obtidos do conteúdo de fenóis totais nas amostras oriundas da polpa dos frutos de gravioleira.....	96

## LISTA DE ABREVIações

AA	Atividade Antioxidante
APT	Attached Proton Test
AT	Análise de Taninos
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCL <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
<i>c/NOS</i>	Óxido Nítrico Sintase constitutiva
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
DHA	Ácido docasahexanóico
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetil sufóxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazil
EIM	Ensaio Imunofarmacológico
EPA	Ácido Eicosapentanóico

ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FT	Fenóis Totais
HMBC	Heteronuclear MultipleBond Coherence
HMQC	Heteronuclear MultipleQuantum Coherence
<i>i</i> NOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)2-5-difeniltetrazol
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato
RL	Radicais Livres
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-2	Fase inversa com dois átomos de carbono
SBF	Soro Fetal Bovino
TR	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta

## RESUMO

REIS, C.N. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2011; *Annona muricata L.*: Análise química e biológica dos frutos de gravioleira; Professora Orientadora: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc.; Banca Avaliadora: Michelle Frazão Muzitano, D.Sc.; Rodrigo Rodrigues de Oliveira, D.Sc.; Silvia Menezes de Faria Pereira, D.Sc.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, em conjunto com o Laboratório de Biologia do Reconhecer do Centro de Biociências e Biotecnologia, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil químico da polpa dos frutos de gravioleira, *Annona muricata L.* (Annonaceae), a atividade antioxidante, o teor de taninos e fenóis totais e a capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, o que em tese pode justificar seu uso popular como anti-inflamatório e um possível alimento funcional. Para a obtenção do sumo, a polpa dos frutos de gravioleira foi separada das sementes e cascas e submetida à extração com água na proporção de 75% (p/v). Os fracionamentos cromatográficos foram realizados com o intuito de se obter uma substância purificada. O conhecimento do perfil químico do sumo e frações conduziu a quantificação de rutina e quercetina (baixos teores). A partir da purificação do

sumo, obteve-se uma substância isolada (G1), a qual foi enviada ao RMN para sua elucidação estrutural, sendo identificada como benzoato-2-metil heptila. O sumo, frações, G1 e padrões químicos foram avaliados quanto sua atividade antioxidante, observando-se que ocorre diminuição da capacidade de seqüestro de radicais livres com a purificação. A partir de análises de taninos e fenóis totais do sumo e do sobrenadante oriundos da polpa dos frutos de gravioleira, não foram detectados taninos hidrolisáveis e verificou-se que os teores de taninos condensados e fenóis totais concentram-se no sumo. A relação entre a concentração de fenóis totais e a capacidade de seqüestrar radicais livres das amostras foi positiva, visto que as amostras com maior concentração de fenóis totais são justamente as que apresentam maior atividade antioxidante. Na análise imunofarmacológica verificou-se que o sumo não apresentou capacidade inibitória de produção de NO e não foi observada liberação de LDH. Em células tumorais (U937), o sumo não induziu atividade citostática, não interferindo na viabilidade, crescimento e morte celular por necrose. Já as frações apresentaram resultados inversos ao sumo. Com estes resultados, pode-se verificar que o sumo não apresentou citotoxicidade e não foi capaz de inibir a produção de NO em macrófagos, enquanto as frações interferem na viabilidade celular tanto em macrófagos quanto em células tumorais, e possuem atividade inibitória na produção de NO. Desta forma, este trabalho permitiu conhecer quimicamente a polpa dos frutos da gravioleira até então pouco estudada e avaliar sua atividade antioxidante e imunofarmacológica, contribuindo para a compreensão científica do seu possível uso popular como anti-inflamatório.

## ABSTRACT

REIS, C.N. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February of 2011; *Annona muricata L.*: Chemical and biological analysis of soursop fruit; Teacher Advisor: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc.; Banking Appraiser: Michelle Frazão Muzitano. D.Sc.; Rodrigo Rodrigues de Oliveira, D.Sc.; Silvia Menezes de Faria Pereira, D.Sc.

This work was conducted at the Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias in conjunction with the Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. The aim of this study was to evaluate the chemical profile of the fruit pulp of soursop, *Annona muricata L.* (Annonaceae), the antioxidant activity, the level of tannins and phenols and the ability to inhibit production of nitric oxide (NO) by macrophages, which in theory could justify its use as a popular anti-inflammatory and a potential functional food. To obtain the juice, fruit pulp of soursop was separated from the seeds and skins and subjected to extraction with water at a rate of 75% (w / v). The chromatographic fractionations were performed in order to obtain a purified substance. Knowledge of the chemical profile of the juice and fractions led to quantification of rutin and quercetin (low levels). From the purification of the juice, we obtained a pure compound (G1), which was sent to the NMR structural elucidation, identified as 2-methyl-heptyl benzoate. The juice,

fractions, G1 and chemical patterns were evaluated for their antioxidant activity, noting that there is a reduction of capacity for carbon free radicals with purification. From analysis of tannins and phenols of juice and pulp from the supernatant of soursop fruit, hydrolysable tannins were not detected and it was found that the levels of condensed tannins and total phenols in juice concentrate. The relationship between the concentration of total phenols and the ability to scavenge free radicals in the samples was positive, whereas samples with higher concentrations of phenolics are precisely those that have a higher antioxidant activity. In immunopharmacology analysis showed that the juice did not show inhibitory effect of NO production and there was no release of LDH. In tumor cells (U937), the juice did not induce cytostatic activity, no effect on viability, growth and cell death by necrosis. Since the fractions showed opposite results to the juice. With these results, it is found that the juice showed no cytotoxicity and was not able to inhibit NO production in macrophages, while the fractions interfere with cell viability in both macrophages as in tumor cells and have inhibitory activity on NO production . Thus, this study provided information about the chemical pulp of the fruit of soursop little studied and to evaluate its antioxidant activity and immunopharmacology, contributing to the scientific understanding of its possible use as a popular anti-inflammatory.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso das plantas como fonte de alimentos e produtos terapêuticos talvez seja tão antigo quanto a própria humanidade (Srivastava et al., 2000). As fontes vegetais contêm metabólitos secundários potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos (Kim et al., 2004). Dentre os metabólitos secundários mais estudados estão os terpenóides (substâncias isoprênicas) e os flavonóides (compostos fenólicos), que são um grupo de pigmentos vegetais com extensa distribuição na natureza (Ribeiro et al., 2004).

As substâncias terpênicas, por sua vez, constituem a maioria dos óleos essenciais, os quais são empregados como flavorizantes (nos alimentos), fragâncias (em perfumes) e formulações farmacêuticas (Luna, 2006).

Os flavonóides possuem capacidade anti-inflamatória, visto que inibem a produção de mediadores inflamatórios ao modular o mecanismo do ácido araquidônico, inibindo várias enzimas como, por exemplo: ATPase, ciclooxigenase, lipoxigenase, NADH oxidase, proteína quinase, hidrolases, peroxidases, metalopeptidases, tirosinases e as fosfolipases. Assim, os flavonóides têm sido alvo de crescente interesse como potencial fármaco de uso terapêutico na inibição ou mesmo na diminuição da atividade inflamatória (Campos e Miraldo, 2006).

Vários estudos mostram que o consumo de frutas e vegetais está associado com a redução ao risco de muitas doenças, incluindo o câncer, a aterosclerose e as doenças neurovegetativas que, normalmente, estão relacionadas com os elevados níveis de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é um estado de vulnerabilidade do

sistema de defesa em que há uma produção excessiva das espécies reativas do oxigênio (ERO) que supera a capacidade antioxidante de defesa do organismo, estando, portanto, sujeito a doenças infecciosas e degenerativas (Spada et al., 2008).

Substâncias antioxidantes podem diminuir o estresse oxidativo minimizando a incidência dessas doenças e as frutas fornecem diversas substâncias antioxidantes, tais como vitamina C,  $\beta$ -caroteno e outros polifenóis (Bernardes et al., 2010; Spada et al., 2008). A procura por novos agentes antioxidantes a partir de fontes vegetais usadas na dieta humana e na medicina popular pode levar a descoberta de moléculas naturais com elevado potencial anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo*. Estas substâncias poderiam justificar o uso popular de tais espécies vegetais como anti-inflamatórias (Fang e Liu, 2002).

Nesse sentido, observa-se uma crescente concentração de esforços na pesquisa de produtos naturais advindos de plantas frutíferas. Porém, são escassos os grupos de pesquisa que atuam na área de caracterização de pigmentos em frutos no país.

O Brasil tem se sobressaído como um respeitável produtor e consumidor de frutas e a *Annona muricata L.*, graviola, ocupa um lugar de destaque. Integrando a diversidade biológica da região de Campos dos Goytacazes - RJ e com proeminência na economia de frutos tropicais, a graviola possui substâncias fenólicas e terpênicas com ação antioxidante (Baskar et al., 2007). É empregada, principalmente, na indústria de polpas alimentícias. Nesse sentido, o avanço no conhecimento químico a partir de seus frutos e do enfoque biológico sobre a utilização do mesmo, principalmente seu efeito anti-inflamatório, provavelmente irá incentivar a comercialização desses frutos, gerando uma possível contribuição para o crescimento econômico da cidade.

Diante da escassez de estudos que vêm sendo produzidos sobre os frutos da gravioleira, o enfoque principal desta pesquisa é avaliar a sua composição química e ação antioxidante e, aliado a isto, sua citotoxicidade com sua possível utilização como alimento funcional.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é isolar e identificar as substâncias ativas presentes nos frutos de gravioleira (*Annona muricata L.*) investigando sua atividade biológica e, desta forma, ampliar o conhecimento químico e biológico acerca da polpa dos frutos de *Annona muricata L.*, para a possível utilização do mesmo como alimento funcional.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil químico da polpa dos frutos de *A. muricata L.* por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar atividade antioxidante do sumo e frações a partir da polpa dos frutos de *A. muricata L.* através de métodos espectroscópicos;
- Isolar e identificar os compostos ativos presentes nos frutos através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
- Determinar os teores de taninos e fenóis totais;
- Avaliar a atividade inibitória da produção de óxido nítrico;
- Avaliar a citotoxicidade em células RAW 264.7 e a ação sobre células tumorais da linhagem U937 através de modelos *in vitro*.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Substâncias Encontradas em Alimentos Funcionais**

A expressão “alimento funcional” foi empregada pela primeira vez em 1985 no Japão (Moraes et al., 2006) e sua definição abrange qualquer substância ou componente de um alimento que proporcione, além do valor nutricional, benefícios à saúde e até mesmo a prevenção e o tratamento de doenças. Como exemplo podem-se citar: frutos, hortaliças, grãos, alimentos fortificados e suplementos alimentares (Bernardes et al., 2010; IFIC, 2006). Alguns alimentos funcionais contêm como substâncias: as alicinas encontradas no alho, os carotenóides (substâncias isoprênicas) e flavonóides (substâncias fenólicas) encontrados em frutas e vegetais, os glucosinolatos presente nos vegetais crucíferos e os ácidos graxos poliinsaturados encontrados em óleos vegetais e óleo de peixe (Roberfroid, 2002).

Alimentos funcionais não podem ser desenvolvidos simplesmente pela adição ou mistura de ingredientes apropriados (Casé et al., 2005). Alguns critérios foram estabelecidos para determinação de um alimento funcional, tais como: exercer ação metabólica ou fisiológica que contribua para a saúde física e para a diminuição de morbidades crônicas; integrar a alimentação usual; os efeitos positivos devem ser obtidos em quantidades não tóxicas, perdurando mesmo após suspensão de sua ingestão; e, por fim, os alimentos funcionais não são destinados ao tratamento ou à cura das doenças (Bernardes et al., 2010; Borges, 2000).

Com o aumento da expectativa de vida dos brasileiros e ao mesmo tempo o crescente aparecimento de doenças crônicas como obesidade, hipertensão, osteoporose, diabetes e câncer, é crescente a preocupação com uma alimentação saudável. Nesse sentido, a perda da saúde justifica a produção de alimentos funcionais, sendo peça chave na diminuição do risco de doenças e na promoção de qualidade de vida (ABIA, 2008).

Assim, pesquisas com alimentos funcionais não irão trazer os avanços para a saúde sem que os benefícios dos alimentos sejam efetivamente comprovados e passem a ser de domínio público. Doenças poderiam ser evitadas associando-se dieta equilibrada, hábitos de vida saudáveis e alimentos funcionais (Casé et al., 2005).

### **3.2 Classes de Substâncias Biologicamente Ativas**

As substâncias biologicamente ativas encontradas nos alimentos funcionais podem ser classificadas em grupos, como: probióticos e prebióticos, alimentos sulfurados e nitrogenados, pigmentos e vitaminas, compostos fenólicos, ácidos graxos poliinsaturados e fibras (Rodríguez et al., 2003; Roberfroid, 2002).

Os probióticos são microrganismos vivos que podem ser agregados como suplementos na dieta, afetando de forma benéfica o desenvolvimento da flora microbiana e conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (Saad, 2006), como por exemplo, *Escherichia coli Nissle*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecalis*, entre outros (Reig e Anesto, 2002). Os prebióticos são oligossacarídeos não digeríveis, porém fermentáveis cuja função é mudar a atividade e a composição da microbiota intestinal com a perspectiva de promover a saúde do hospedeiro (Rodríguez et al., 2003; Roberfroid, 2002).

Os alimentos sulfurados e nitrogenados são compostos orgânicos usados na proteção contra a carcinogênese e mutagênese, sendo ativadores de enzimas na detoxificação do fígado. Os isotiocianatos e indóis são compostos antioxidantes que estão presentes também em crucíferas, tais como brócolis, couve e repolho. Já as fibras são substâncias com alto peso molecular, encontradas nos vegetais, como os grãos, em verduras, raízes e outras hortaliças (Anjo, 2004).

A vitamina C (ácido ascórbico) é, geralmente, adicionada a produtos alimentares para inibir a formação de metabólitos nitrosos carcinogênicos. Os

benefícios obtidos de sua utilização terapêutica incluem o efeito protetor contra os danos causados pela exposição às radiações e medicamentos, e um possível papel de proteção no desenvolvimento de tumores em humanos (Moraes et al., 2006).

Os ácidos graxos poliinsaturados, destacando as séries ômega 3 e 6, são encontrados em alguns peixes de água fria, óleos vegetais, sementes de linhaça, nozes e alguns tipos de vegetais. Os principais ácidos graxos da família ômega 3 são o alfa-linolênico, o eicosapentanóico (EPA) e o docasahexanóico (DHA), enquanto que na família ômega 6 destacam-se o ácido linoléico e o araquidônico. EPA e DHA são sintetizados nos seres humanos a partir do ácido linolênico, o qual é o precursor primordial das prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos com atividade anti-inflamatória, anticoagulante, vasodilatadora e antiagregante (Pimentel et al., 2005).

Nesse contexto, o metabolismo vegetal é dividido em metabolismo primário e secundário. Contudo, na realidade, não existe uma divisão precisa entre os dois tipos. Admite-se, porém, que os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucléicos, que são comuns aos seres vivos e fundamentais para a manutenção das células, são oriundos do metabolismo primário e as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas e, portanto, mais elaboradas, são produtos do metabolismo secundário (Bernardes et al., 2010; Campos, 2008).

Os metabólitos secundários são divididos em três grupos principais: os compostos fenólicos, os terpenos e os compostos nitrogenados. Dentre os metabólitos secundários mais estudados na pesquisa científica estão os terpenóides (substâncias isoprênicas) e os flavonóides (compostos fenólicos), que constituem grupos de pigmentos com ampla distribuição na natureza (Campos, 2008).

Os pigmentos naturais possuem estrutura e propriedades químicas e físicas diferenciadas e são agrupados de acordo com suas estruturas químicas em: substâncias heterocíclicas tetrapirrólica, substâncias com estrutura isoprênica, betalínas, substâncias quinoidais, taninos e os flavonóides (Bernardes et al., 2010; O'prey et al., 2003).

Os terpenos (ou terpenóides) constituem o maior grupo de produtos secundários. São, em geral, insolúveis em água e sintetizados a partir do acetil-CoA. Exemplos de terpenóides incluem as giberelinas e os carotenóides (Fabri, 2008).

Os compostos fenólicos compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Existem cerca de cinco

mil fenóis, dentre eles, destacam-se os ácidos fenólicos, fenóis simples, flavonóides, cumarinas, taninos hidrolisáveis, ligninas e tocoferóis, os quais possuem atividade antioxidante comprovada (Oliveira et al., 2009; Angelo et al., 2007).

### 3.2.1 Terpenos ou Terpenóides

Os terpenos são largamente distribuídos no Reino Vegetal e exibem propriedades farmacológicas. Entre outras ações, os terpenóides apresentam propriedades anti-inflamatórias e antinoceptivas, inibem a agregação plaquetária e interferem a nível intracelular em vários passos do mecanismo de transdução (Sartori, 2005).

Os componentes químicos dos óleos voláteis podem ser divididos em duas classes: os derivados dos terpenóides, formados pela via do ácido mevalônico-acetato, e os derivados do fenilpropanóide (Figura 1), compostos aromáticos formados pela via do ácido chiquímico (Prado, 2007).

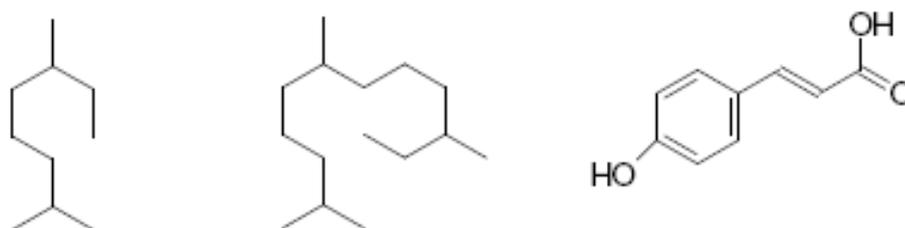


Figura 1: Estrutura de terpenóides e fenilpropanóides.

Os terpenóides possuem uma estrutura comum, pois suas fórmulas representam a união de duas, três, quatro ou mais unidades do isopreno (2-metil-1,3-butanodieno ou metilbutanodieno). Assim, os terpenos são formados por diversas ciclizações, rearranjos, perdas ou adições de átomos de carbono. Classificados como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, sendo os dois primeiros encontrados principalmente em óleos essenciais (Prado, 2007; Dey & Harborne, 1997).

Os monoterpenos fazem parte da classe mais simples dos terpenóides, sendo constituídos por 10 átomos de carbono, ou seja, duas unidades de isopreno, e são componentes da maioria dos óleos essenciais. O maior interesse nestes compostos

é o seu uso como perfumes e flavorizantes em alimentos, além de apresentarem efeitos inseticida e farmacológico (Prado, 2007; Dey & Harborne, 1997).

Os monoterpenos são classificados em acíclicos, ciclopentanóides, ciclohexanóides (Figura 2) e irregulares.

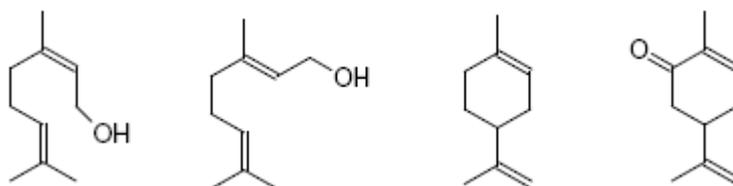


Figura 2: Estrutura química de monoterpenos.

Os sesquiterpenos (Figura 3) são bastante encontrados em plantas, fungos e algas. Mais de 100 sesquiterpenos são conhecidos e identificados. Eles aparecem principalmente com monoterpenos em óleos essenciais. Sua estrutura compreende 15 átomos de carbono, relacionando-se com o constituinte fundamental do qual podem considerar-se derivados: o *trans-cis*-farnesol ou o *trans-trans*-farnesol (Costa, 1994). A maioria dos sesquiterpenos apresenta propriedades biológicas como inseticida e antibiótica (Prado, 2007; Dey & Harborne, 1997).

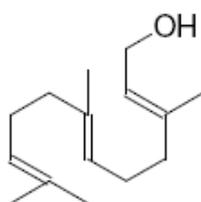


Figura 3: Estrutura química do sesquiterpeno.

Os compostos terpênicos constituem a maior parte dos óleos essenciais. Os monoterpenos mais comuns encontrados nos óleos voláteis são: linalol, geraniol, tujona, cânfora, limoneno e outros. Já entre os sesquiterpenos mais comuns encontra-se o farnesol, nerolidol, bisaboleno e outros (Prado, 2007).

A chave para a rota biossintética dos isoprenóides foi determinada pelo ácido mevalônico (AMV), o qual apresenta 6 átomos de carbono. O ácido mevalônico é

catalisado pela hidroximetilglutaril-CoA redutase, advindo do metabolismo da glicose, mais precisamente pela condensação aldólica da acetil-CoA com acetoacetil-CoA (Prado, 2007).

Seguindo a rota biossintética (Figura 4), o AMV é convertido em isopentilpirofosfato (IPP). O IPP converte-se no seu isômero dimetil-alilpirofosfato (DMAPP), o qual, através de reação de condensação forma o geranylpirofosfato (GPP), que novamente condensa-se com outra molécula de IPP formando o farnesilpirofosfato (FPP). Estas condensações de IPP com pirofosfatos alílicos produzem novos prenil-pirofosfatos, ou seja, resultando em sesquiterpenos e diterpenos (Prado, 2007; Dey & Harbone, 1997).

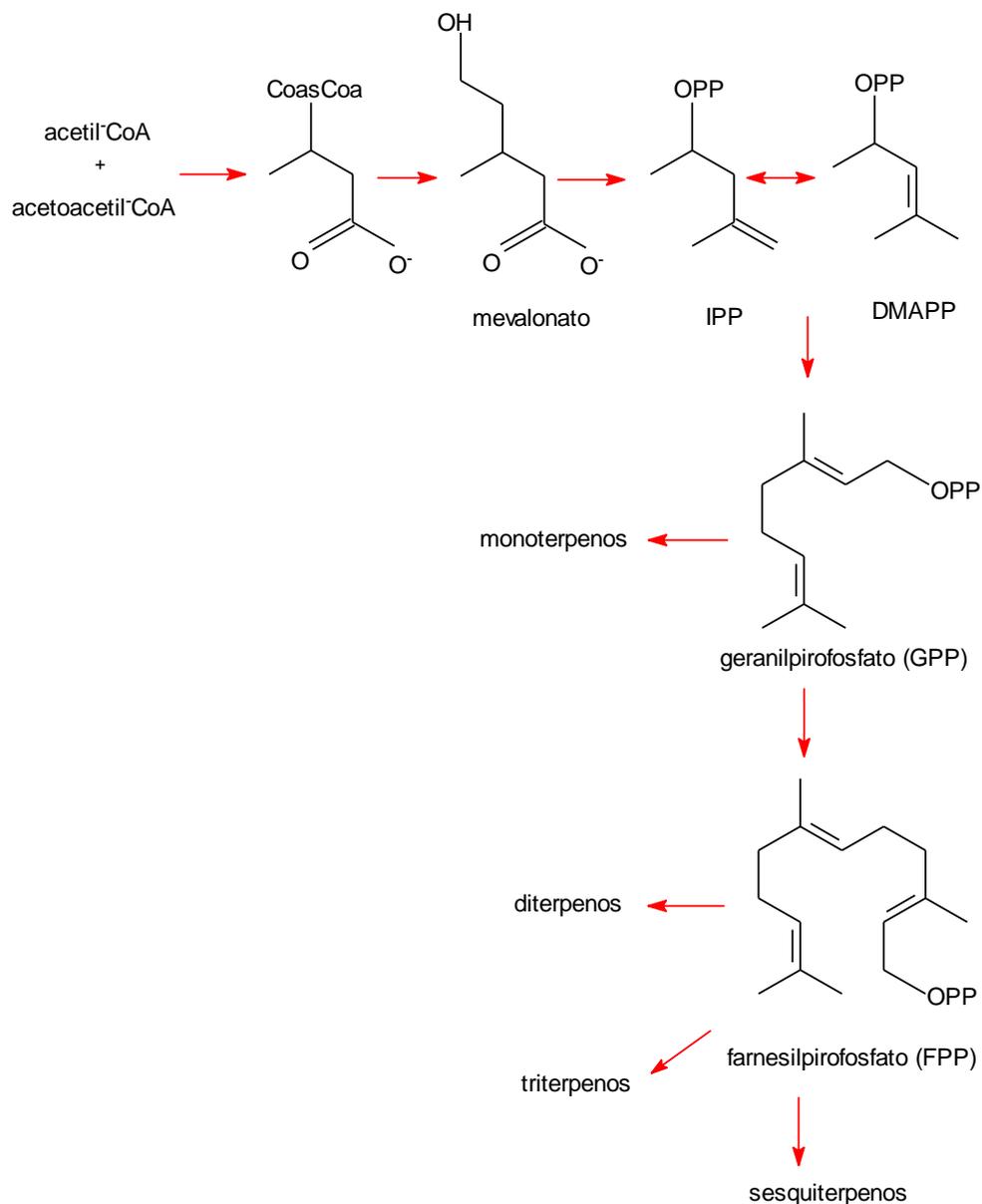


Figura 4: Biossíntese de Terpenos.

### 3.2.2 Flavonóides

Os flavonóides foram identificados pela primeira vez em 1930, pelo Dr. Szent György, a partir da casca do limão, de onde foi extraída a citrina, a qual possuía capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares (Campos, 2008). Constituem uma das classes de polifenóis e são importantes fitonutrientes presentes principalmente em vegetais, frutas e bebidas (Kim et al., 2006).

Junto com os terpenóides e alcalóides, os flavonóides representam uma das três maiores classes de metabólitos secundários (Ribani, 2006). São biossintetizados nas plantas a partir de uma rota biossintética mista, a partir do ácido chiquímico e do acetato via ácido mevalônico como mostra a figura 5 (Bernardes et al., 2010; Ribani, 2006; Harborne, 1994a).

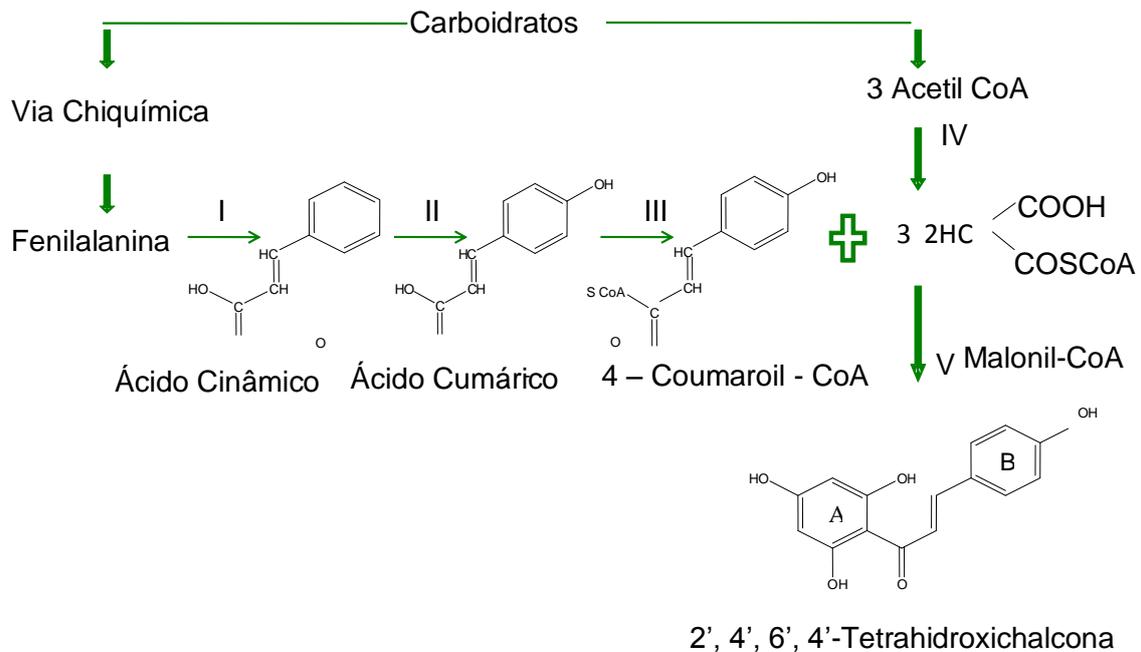


Figura 5: Biossíntese geral dos flavonóides, mostrando as etapas de formação da chalcona intermediária básica C15. Enzimas: I - Fenil amônia liase; II - Cinamato 4-hidroxilase; III - 4-coumarato:CoA ligase; IV - Acetil-CoA carboxilase; V - Chalcona sintase.

A chalcona sintase é a enzima que cataliza a formação da chalcona intermediária básica C15, da qual todos os flavonóides são formados pela condensação de três moléculas de malonil-CoA com uma molécula de 4-coumaroil-

CoA (C6-C3). O substrato éster da CoA do ácido cinâmico vem da fenilalanina. A fenilalanina amônio liase canaliza o esqueleto C6-C3 da fenilalanina via ácido *trans*-cinâmico pelo metabolismo de fenilpropanóides. A inserção da função hidróxi na posição 4 do ácido *trans*-cinâmico é catalizada pela cinamato 4-hidroxilase, fornecendo o 4-coumarato. O ácido hidróxi-cinâmico é ativado para futuras reações pela formação de um éster da CoA (4-coumaroil-CoA), substrato preferido pela chalcona sintase. O segundo substrato da chalcona sintase, o malonil-CoA, é sintetizado a partir da acetil-CoA e CO<sub>2</sub>. Por meio de subseqüentes hidroxilações e reduções, as plantas sintetizam as diferentes classes dos flavonóides (Ribani, 2006; Forkmann e Martens, 2001).

Os flavonóides podem sofrer degradação em meio alcalino na presença de oxigênio e possuem intensa absorção UV, aproximadamente em 350 nm devido à presença de ligações duplas conjugadas com os anéis aromáticos; são ácidos fracos e, como são substâncias polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações de solventes com água (Harborne, 1994a).

São formados por dois anéis aromáticos (A e B) conectados por um anel de três carbonos contendo oxigênio (anel C). O anel C pode ter forma cíclica piranóica (núcleo flavonóide básico) ou ainda conter um grupo carbonila na posição 4 (Otaki et al., 2009; Ribani, 2006).

Desta forma, a estrutura básica de um flavonóide é o núcleo flavan, o qual consiste em 15 átomos de carbono dispostos em 3 anéis (C6-C3-C6) marcados como A, B e C. A figura 6 mostra a estrutura dos flavonóides e sua numeração para distinguir a posição dos carbonos ao redor da molécula.

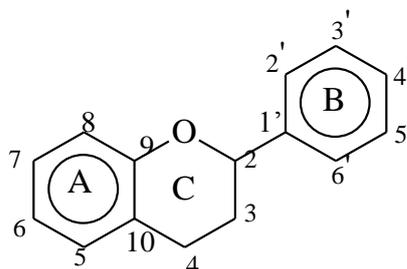
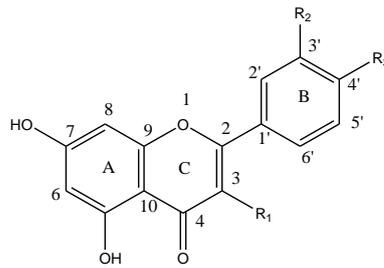


Figura 6: Estrutura básica dos flavonóides.

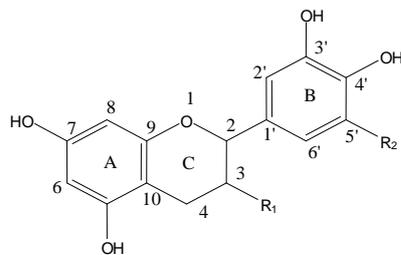
A variação estrutural no anel C subdivide os flavonóides em 6 principais subclasses (Figura 7): flavonóis (p.ex., quercetina, kaempferol, miricetina), contendo uma hidroxila na posição 3 e carbonila na posição 4 do anel C; flavonas (p.ex.,

luteolina, apigenina), com somente carbonila na posição 4; flavanóis (p.ex. catequina) contendo apenas a hidroxila no C-3, mas sem a dupla ligação entre o C-2 e C-3; flavanonas com apenas a carbonila no C-4, também sem a dupla ligação entre o C-2 e C-3 (p.ex. hesperetina); antocianidinas (p.ex., cianidina, pelargonidina) contendo a hidroxila no C-3; e isoflavonas (p.ex., genisteína, daidzeína), na qual o anel B está localizado na posição C-3 do anel C (Otaki et al., 2009; Ribani, 2006; Harborne, 1994a).

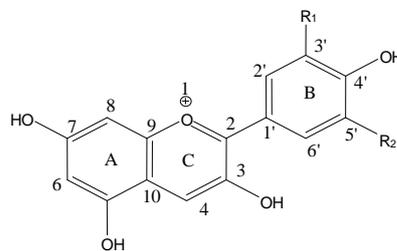
1a e 1b



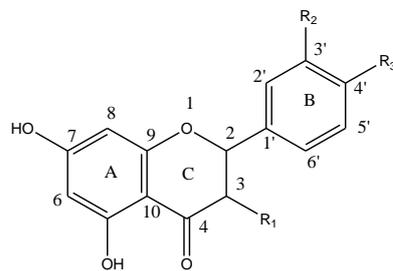
2



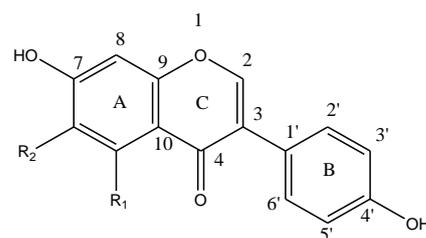
3



4



5

**1a – Flavonóis**

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Quercetina	OH	OH	OH
Kaempferol	OH	H	OH

**1b – Flavonas**

Luteolina	H	OH	OH
Apigenina	H	H	OH

**2 – Flavanóis**

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Catequina	OH	H
Epicatequina	OH	H

**3 - Antocianidina**

Cianidina	OH	H
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	HCH <sub>3</sub>

**4 – Flavanonas**

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Hesperetina	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Naringenina	H	H	OH

**5 - Isoflavonas**

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Daidzeína	H	H
Genisteína	OH	H
Gliciteína	H	OCH <sub>3</sub>

Figura 7: Estrutura das principais classes de flavonóides.

Várias funções são conferidas aos flavonóides nas plantas, tais como, proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais para polinização, controle da ação de hormônios vegetais e inibidores de enzimas. Quanto aos efeitos bioquímicos e farmacológicos dos flavonóides destacam-se ações como sequestro de radicais livres (antioxidantes), anti-inflamatórias, anti-hepatóxica, antialérgica, antitumoral, antiparasitária, antimicrobiana, fungistática, antiviróticos, entre outros (Bernardes et al., 2010; Huang et al., 2007).

Em relação às frutas observam-se variações na composição dos flavonóides devido a diferentes fatores como variedades/cultivares e partes do fruto. A composição é dependente do grau de incidência de luz uma vez que a formação dos flavonóides é influenciada pela luz. São localizados principalmente nas folhas, flores, e nas frutas em suas partes externas, pele ou casca, decrescendo em concentração até o centro destas (Ribani, 2006).

Os flavonóides podem contribuir para a qualidade das frutas de várias maneiras, por exemplo, com os atributos sensoriais como a coloração e sabor (p.ex. gosto amargo de algumas frutas). Também estão envolvidos na formação de pigmentos marrons indesejáveis em frutas frescas após injúria ou corte como resultado da oxidação enzimática dos fenólicos em quinonas que polimerizam formando produtos marrons (Bernardes et al., 2010; Ribani, 2006).

### **3.2.3 Taninos**

Os taninos são classificados em dois grupos principais, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos tenham na molécula poli-hidroxifenóis ou seus derivados. Os pertencentes ao primeiro grupo são denominados taninos hidrolisáveis, que incluem os galotaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico de acordo com a figura 8 (Degáspari, 2004).

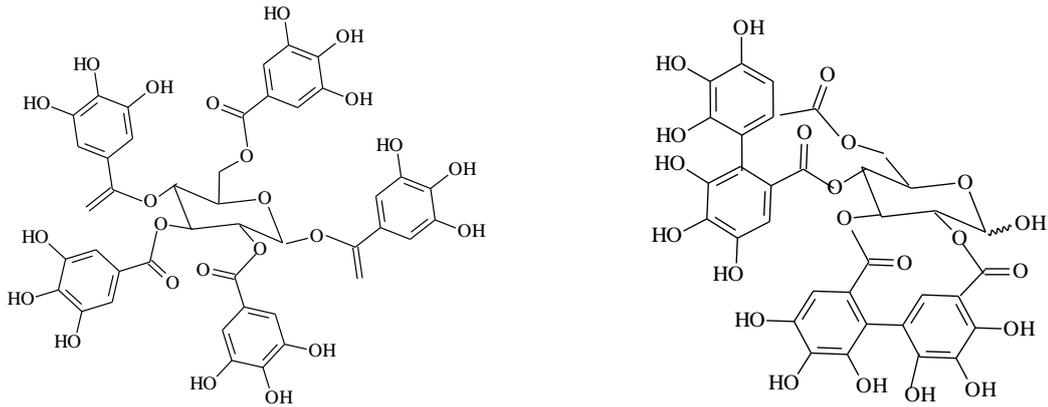


Figura 8: Estruturas de taninos hidrolisáveis: Galotanino e Elagitanino.

Os constituintes do segundo grupo são denominados de taninos condensados e são encontrados em maiores proporções e com maior importância nos alimentos. Exibem uma estrutura similar aos flavonóides, com coloração variando do vermelho ao marrom, conforme a figura 9. Em baixas concentrações em frutos, os taninos conferem-lhes características sensoriais desejáveis. Todavia, em concentrações mais elevadas, conferem aos frutos e outros alimentos características adstringentes (Degáspari, 2004).

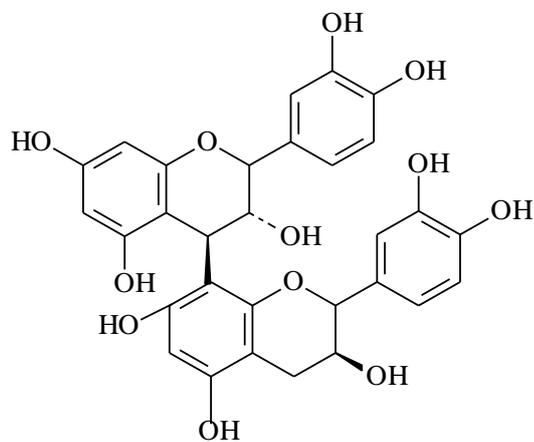


Figura 9: Estrutura de tanino condensado.

Os taninos possuem um forte potencial antioxidante, detendo a capacidade de atuar no processo de estabilização de radicais livres (Paiva et al., 2002).

### 3.3 Radicais Livres X Antioxidantes

Os radicais livres (RL) são moléculas orgânicas ou inorgânicas, que possuem átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (Bernardes et al. 2010; Schneider e Oliveira, 2004).

Radicais livres induzidos pela peroxidação têm ganhado muita importância por causa de seu envolvimento em diversas condições patológicas tais como aterosclerose, isquemia, desordens neuronais, inflamação, câncer, entre outras (Aruoma, 2003). Podem ser gerados por fontes endógenas ou exógenas. Através das fontes endógenas, se originam a partir de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, como: redução de flavinas e tióis; resultado da ação de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. As fontes exógenas incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações. Além disso, os processos inflamatórios também promovem o aumento da concentração dos radicais livres no organismo (Soares, 2002).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas *in vivo*, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, são muito reativas e potencialmente prejudiciais. Todavia, são continuamente produzidas no organismo humano, visto serem essenciais para o custo energético, desintoxicação, sinalização química e função imunológica (Ali et al., 2009; Scheneider e Oliveira, 2004). Devido ao excesso de produção de espécies reativas, induzida pela exposição a substâncias oxidantes externas ou a uma falha nos mecanismos de defesa, a lesão para as estruturas celulares, DNA, lipídios e proteínas pode elevar o risco para mais de trinta doenças (Ali et al., 2009). Assim, nos processos biológicos há formação de uma variedade de radicais livres (Soares, 2002), tais como os radicais do oxigênio como o íon superóxido ( $O_2^-$ ) e do nitrogênio como o óxido nítrico (NO).

Os principais radicais livres observados são superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), a hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), o hidroperóxido ( $HO_2^{\bullet}$ ), o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $NO_2^{\bullet}$ ). Dentre estes, o radical hidroxila é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas

celulares e o peróxido de hidrogênio possui a capacidade de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA (Anderson, 2000).

O radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é gerado pela reação entre moléculas de substâncias que participam da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e no retículo endoplasmático com o oxigênio, devido ao metabolismo aeróbico. Desta forma, as células fagocitárias produzem superóxido como parte do mecanismo de defesa imunológico visando eliminar microorganismos patogênicos. Quando esta produção torna-se excessiva, como ocorre nas doenças inflamatórias crônicas, geram-se lesões nos tecidos (Mariod et al., 2009; Degáspari, 2004; Scheneider e Oliveira, 2004).

Se o  $O_2^{\bullet-}$  é parcialmente reduzido pela recepção de dois elétrons, o produto é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Reação 1); se receber apenas um elétron, o produto será o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Reação 2).



O  $H_2O_2$  e o  $O_2^{\bullet-}$  são extremamente tóxicos. Esta toxicidade se deve, principalmente, à conversão em radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). Radicais livres como  $OH^{\bullet}$  provocam quebra e modificações nas bases de DNA gerando alterações na expressão genética, mutação e apoptose celular, nas cadeias protéicas e peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica produzida nas paredes do endotélio vascular contribui para a aterosclerose, risco de acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (Halliwell, 2009; Degáspari, 2004; Scheneider e Oliveira, 2004).

A peroxidação lipídica é o processo através do qual as ERO agredem os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídeos das membranas celulares, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares. A fosfolipase, ativada pelas espécies tóxicas desintegra os fosfolipídeos, liberando os ácidos graxos não saturados (Halliwell, 2009).

Assim como na formação das ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico e, portanto, na resposta inflamatória. Pesquisas têm demonstrado que os flavonóides inibem a peroxidação lipídica, *in*

*vitro*, no estágio de iniciação, devido a sua atuação como antioxidante (Soares, 2002).

Os antioxidantes fenólicos podem funcionar como seqüestradores de radicais (ação redutora) e algumas vezes como quelantes de metais agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (Bernardes et al., 2010; Moraes et al., 2006).

Desta forma, os antioxidantes podem oferecer resistência contra o estresse oxidativo pelo sequestro de radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica e outros mecanismos, prevenindo o surgimento de doenças, sendo estes encontrados em muitos alimentos. Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (Ali et al., 2009; Aruoma, 2003).

Os antioxidantes podem ser naturais ou artificiais. Os naturais encontram-se principalmente em plantas na forma de compostos fenólicos (flavonóides, ácidos e álcoois, estilbenos, tocoferóis, tocotrienóis), ácido ascórbico e carotenóides. Já dentre os antioxidantes artificiais podem ser citados o butil-hidroxi-tolueno - BHT e o butil-hidroxi-anisol – BHA (Figura 10) (Mariod et al.; 2009; Ali et al.; 2009; Shami & Moreira, 2004).

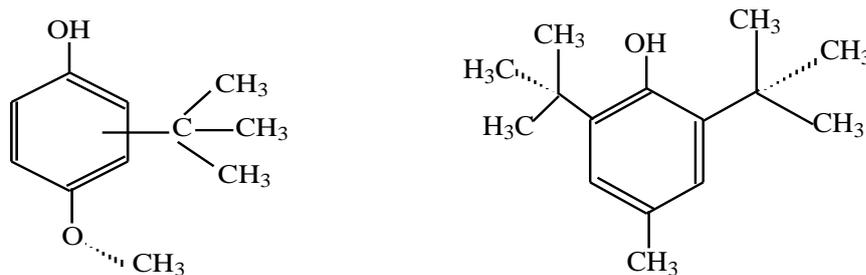


Figura 10: Antioxidantes sintéticos BHA e BHT, respectivamente.

### 3.4 Imunofarmacologia

As fontes vegetais produzem um extenso número de substâncias que possuem várias atividades biológicas, incluindo propriedades imunomoduladoras (Carlos et al., 2005).

De acordo com Murakami e Ohigashi (2007), os macrófagos são células envolvidas na resposta imunológica e podem ser ativados por diversos estímulos. Sua função principal é a fagocitose de partículas estranhas, a apresentação de antígenos, a produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxidos de nitrogênio como o óxido nítrico (NO).

O óxido nítrico (NO) é um gás formado na atmosfera durante as tempestades com raios e também numa reação catalisada por enzimas entre o oxigênio molecular e L-arginina em mamíferos (Rang et al., 2001). É uma molécula usada no reino animal como sinalizadora nos sistemas cardiovascular e nervoso e desempenha um papel de defesa do hospedeiro ou um agente tóxico entre as células (Coleman, 2001; Rang et al., 2001). Exerce também um significativo papel no sistema imunológico, pois está envolvido na patogênica e controle de doenças infecciosas, tumores, processos auto-imunes e doenças degenerativas crônicas (Oliveira et al., 2009; Bogdan, 2001). Além disso, possui demonstrada ação antibacteriana, antiviral e antiparasitária (Moraes et al., 2011; Coleman, 2001).

A síntese do NO é intermediada por um grupo de enzimas denominadas de óxido nítrico sintases (NOS) a partir do aminoácido L-arginina. A óxido nítrico sintase (NOS) é uma enzima que catalisa a conversão de L-arginina em L-citrulina com formação estequiométrica de óxido nítrico (NO), um radical gasoso (Chae et al., 2009; Murakami e Ohigashi, 2007).

Assim, tais sintases catalisam a oxidação de uma molécula de L-arginina pelo oxigênio molecular obtendo como produto final L-citrulina e uma molécula de NO. Nesta reação a L-arginina é transformada em um intermediário, a NG-hidroxi-L-arginina com a presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH) e  $Ca^{2+}$  sendo necessário mais NADPH e ( $O_2$ ) para a formação de L-citrulina e NO (Vieira, 2007).

A NOS é uma proteína dimérica e o monômero de suas isoformas possui massa molecular que varia de 135 a 164 kDa (Rang et al., 2001). NOS é classificada como: constitutiva ou induzida (Murakami e Ohigashi, 2007).

NOS constitutiva (cNOS) é detectada no tecido neuronal (nNOS), vascular e nas células endoteliais (eNOS), enquanto NOS induzida (*i*NOS) é expressa em diversos tipos celulares incluindo macrófagos, células da microglia, epiteliais e do endotélio vascular, queratinócitos, hepatócitos e astrócitos, em circunstâncias normais e condições patológicas (Murakami e Ohigashi, 2007).

As duas cNOS são classificadas como cálcio-dependentes, pois necessitam de  $\text{Ca}^{2+}$  para sua ativação, ou seja, é necessária uma determinada concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para haver a atividade enzimática, caso ocorra queda no nível de  $\text{Ca}^{2+}$  as enzimas tornam-se inativas. Já a *iNOS* é classificada como cálcio-independente, pois sua ativação não é regulada pela presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (Viera, 2007; Rang et al., 2001).

Nos processos infecciosos, as células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio (Dusse et al., 2003). Na célula-alvo, o NO combina-se com grupos metais de enzimas responsáveis pela síntese de DNA e pelo ciclo respiratório, levando à morte celular (Vieira, 2007).

A síntese de NO aumenta durante a inflamação e exerce efeitos pró-inflamatórios e regulatórios. Resultados experimentais mostram que compostos com capacidade de inibir a produção de NO, seja por inibir a expressão ou a atividade da *iNOS*, possuem elevado potencial como agentes anti-inflamatórios (Hamalainen et al., 2007).

*iNOS* é altamente expressa em macrófagos ativados com LPS (Lipopolissacarídeo) e desempenha papel importante no desenvolvimento e manutenção da inflamação e dor. Portanto, a síntese de NO pela *iNOS* pode refletir o grau de inflamação e prover um padrão para avaliar o efeito das drogas sobre a resposta inflamatória (Chae et al., 2009; Murakami e Ohigashi, 2007).

Algumas pesquisas relacionadas à atividade inibidora de NO por substâncias naturais com propriedades anti-inflamatórias têm sido relatadas na literatura, como é o caso do estudo da flavona wogonina e quercetina e sua capacidade em inibir a produção de NO e a expressão da enzima *iNOS* (Oliveira et al., 2009; Huang et al., 2007; García-Mediavilla et al.; 2007).

### 3.5 Processo Inflamatório

A inflamação é clinicamente definida como um processo patofisiológico caracterizado por vermelhidão, edema, febre, dor e perda de função e ocorre como resposta do organismo à invasão de agentes infecciosos ou à lesão física. Durante a reação inflamatória são identificados dois tipos de eventos diferenciados e que se relacionam: o vascular e o químico (Huang et al., 2007).

Os eventos vasculares ocorrem na microcirculação causando uma série de modificações como o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar, entre outros (Figura 11). Essas modificações são efeitos da ação local de mediadores químicos, os quais são sistemas de enzimas plasmáticas, citocinas, produtos de mastócitos, plaquetas e leucócitos e produtos do metabolismo do ácido araquidônico (Huang et al., 2007).

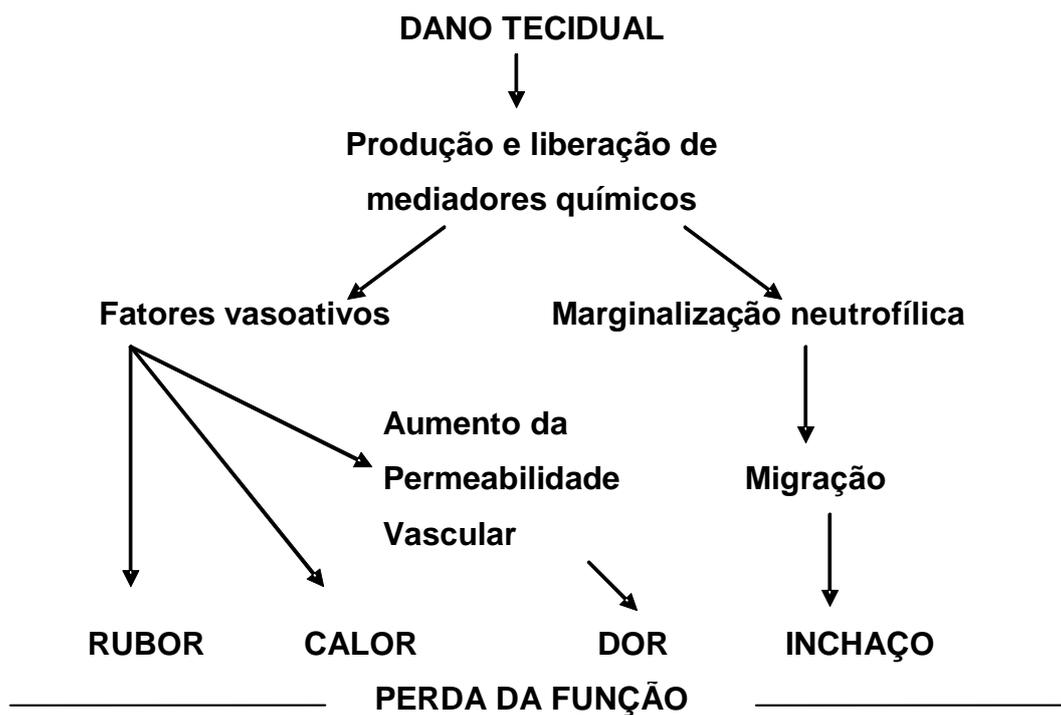


Figura 11: Fluxograma representativo dos eventos da resposta inflamatória.

Durante a inflamação, a produção de óxido nítrico (NO) aumenta e exerce efeitos pró-inflamatórios e regulatórios. Análises experimentais demonstram que compostos capazes de inibir a produção de NO, por inibir a expressão ou a atividade da NOS, são potentes como agentes anti-inflamatórios (Hamalainen et al., 2007).

Neste contexto, os vegetais com o intuito de se adaptar às agressões do meio ambiente, produzem diversas substâncias, entre as quais se destacam os polifenóis, presentes em grande quantidade na dieta humana. Dentre as muitas atividades biológicas exercidas por esse grupo de substâncias estão inclusas as propriedades imunomoduladoras e a atividade antioxidante (Carlos et al., 2005).

Alguns flavonóides apresentam capacidade anti-inflamatória, visto que inibem a produção de mediadores inflamatórios ao modular o mecanismo do ácido araquidônico (Campos & Miraldo, 2006; Kim et al., 2004).

Desta forma, os flavonóides atuam modulando a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida, e as células envolvidas com a inflamação, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como as cicloxigenases, as lipoxigenases e a fosfolipase A2 (Coutinho et al., 2009; Campos & Miraldo, 2006).

Os flavonóides também podem inibir várias enzimas como, por exemplo: ATPase, prostaglandina ciclooxigenase, lipoxigenase, NADH oxidase, proteína quinase, hidrolases, peroxidases, metalopeptidases, tirosinases e as fosfolipases. Assim, a inibição da atividade inflamatória por meio de flavonóides tem sido alvo de crescente interesse (Campos & Miraldo, 2006).

### **3.6. Escolha do Material Vegetal**

O Brasil vem se destacando mundialmente como um importante produtor e consumidor de frutas, especialmente as tropicais e subtropicais e a graviola tem ganhado um lugar de destaque nesse cenário. Seu principal uso está na indústria de polpas alimentícias para refrescos, geléias, doces, sorvetes e sucos (Pereira et al., 2004).

Deste modo, no presente trabalho de pesquisa optou-se pela utilização da espécie *Annona muricata* L., pois além de possuir destaque na economia de frutos tropicais, integra a diversidade biológica da região de Campos dos Goytacazes - RJ e também possui substâncias fenólicas e terpênicas com ação antioxidante (Pereira et al., 2004).

### 3.6.1 Descrição Botânica

#### 3.6.1.1. Família Annonaceae

A família Annonaceae pertence ao grupo das plantas Eudicotiledôneas, clado das magnolíideas. Este clado é constituído por quatro ordens: Canallales, Laurales, Magneliales e Piperales, sendo a ordem Magneliales representada pelas famílias Magnoliaceae, Myristicaceae e Annonaceae. As anonáceas estão sistematicamente inseridas na classe Magnoliopsida e subclasse Magnolidae (Baron, 2010).

A família Annonaceae compreende um grande número de gêneros e espécies, a maioria nativa de regiões tropicais ou subtropicais. Possui cerca de 135 gêneros e mais de 2300 espécies, sendo que dos gêneros conhecidos de Annonaceae, o gênero *Annona* é o de maior importância como fonte de frutos comestíveis (Baron, 2010), seguido de *Cananga* e *Rollinia* (Luna, 2006).

Esta família é muito rica na biodiversidade de compostos químicos como: compostos aromáticos, ácidos fenólicos, taninos, flavonóides, compostos benzênicos, catequinas, proantocianidina, óleos essenciais, esteróides, terpenos, esteróides, alcalóides, acetogeninas, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, vitaminas, carotenos, saponinas, entre outros (Lima, 2007; Luna, 2006).

Os flavonóides 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).

A maior parte das espécies dessa família é considerada subutilizada economicamente e a informação sobre elas é escassa e amplamente dispersa. Contudo, as áreas sob produção têm crescido mais rapidamente do que a contribuição da ciência e tecnologia. Essa preocupação levou à formação, em 2003, da Associação Brasileira dos Produtores de Anonáceas (Anonas Brasil), cuja finalidade maior é orientar os fruticultores atuais e potenciais para a conquista do mercado com qualidade (Baron, 2010).

Não existe levantamento oficial para o plantio de anonáceas no Brasil, o que dificulta uma análise mais atualizada e específica a respeito da evolução, comercialização e participação dessas frutas no agronegócio brasileiro (Baron, 2010), porém para a graviola são disponíveis os dados do Censo Agropecuário de 1996 do IBGE (Nogueira et al., 2005).

### 3.6.1.2. Espécie *Annona muricata* L.

A espécie *Annona muricata* (Annonaceae) pertence ao gênero *Annona*. É também conhecida como graviola, guanabara, araticum, coração-de-rainha, fruta-do-conde, jaca-do-pará, pinha, coração-de-boi, condessa, jaca-de-pobre, araticum manso entre outros (Figura 12).



Figura 12: Fruto da gravioleira.

Sua árvore mede até 8 metros de altura, dotada de copa piramidal, com folhas obovado-oblongas, brilhantes, medindo 8-15 cm de comprimento. As flores são solitárias, com cálice de sépalas triangulares e pétalas externas grossas de cor amarelada. Os frutos são uma baga composta (sincarpo) com peso variando de 0,4 a 10 kg, têm superfície ouriçada, de 25 a 35 cm de comprimento, com polpa mucilaginosa e levemente ácida. A casca possui espículas rígidas e coloração verde-escura quando o fruto está imaturo. No período de colheita as espículas ficam carnosas e moles e a casca verde-clara. A semente tem de 1 a 2 cm, peso aproximadamente 0,60 g, é preta quando retirada do fruto passando a marrom após alguns dias fora dele (Brandão, 2003). Originária da América tropical, principalmente

Antilhas e América Central, é amplamente cultivada em todos os países de clima tropical, inclusive no Brasil (Corrêa, 1984).

A gravioleira prefere os solos com boa drenagem, profundos, com pH entre 6,0 e 6,5. Quanto ao clima, não tolera geadas e vegeta muito bem em altitudes de até 1200 metros (Corrêa, 1984).

A graviola é um fruto facilmente perecível com período de conservação limitado a poucos dias. Aliado à intensa atividade metabólica, alguns fatores têm contribuído para o elevado nível de perdas pós-colheitas neste fruto, sendo um deles o escurecimento enzimático, presente tanto nos frutos destinados à indústria, principalmente para a fabricação de polpa, bem como para o consumo *in natura*. O escurecimento enzimático relaciona-se à ação das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidases (POD), que usam compostos fenólicos como substratos. Os compostos fenólicos envolvidos no processo determinam, até certo limite, a adstringência dos frutos e estão presentes em diferentes graus de polimerização, sendo que os fenólicos oligoméricos formam complexos insolúveis com as proteínas e mucopolissacarídeos da saliva, resultando no sabor adstringente (Alves et al., 2002).

### **3.6.2 Propriedades Biológicas**

A graviola é uma importante fonte alimentícia para o homem; a polpa é consumida ao natural ou usada no preparo de refrescos, tortas e conservas, assim como na fabricação de sucos concentrados, polpas congeladas, néctar, geléias, cremes e bebidas. Além disso, folhas, frutos, sementes e raízes apresentam propriedades medicinais, sendo utilizadas, por exemplo, contra nevralgias e reumatismo. A casca do tronco, folhas e sementes contêm alcalóides (anonina e muricana) utilizados na produção de inseticidas (Brandão, 2003).

A *Annona muricata* L. é considerada uma boa fonte natural de antioxidantes, sendo todas as suas partes utilizadas na medicina tradicional (Baskar et al., 2007). A literatura etnofarmacológica registra diversos usos medicinais baseados na tradição popular, embora a eficácia e a segurança de suas preparações não tenham sido todas comprovadas ainda cientificamente e apesar da planta, mas não a fruta, ser considerada potencialmente tóxica para o homem (Junqueira et al., 2002).

Os usos etnobotânicos e farmacológicos da graviola incluem: artrite, artrose, analgésico, atiespasmódico, antileishmanial, adstringente, desodorizador corporal, diarreia, feridas, úlceras, problemas renais, malária, tranqüilizante, expectorante, próstata, função pancreática, diabetes I e II, depressão, sistema nervoso central, alcoolismo, funções digestivas e intestinais, depurativo sanguíneo, HIV, epilepsia, Parkinson e escleroses (Jaramillo et al., 2000).

Esta espécie é rica em compostos bioativos e diversos trabalhos têm demonstrado a atividade hipotensiva das folhas, antidepressiva do fruto e anti-herpes da casca do caule. Foram observadas ainda atividades antibacterianas, antifúngicas, ação relaxante muscular e cardiodepressiva para os extratos da casca e das folhas de *A. muricata* L. (Luna, 2006).

Porém, uma das maiores descobertas sobre a graviola foi a sua capacidade de agir contra células cancerígenas, mostrando em testes de laboratório um potencial extraordinário. Esta propriedade é consequência das acetogeninas presentes na graviola. Uma terapia natural em complemento às terapias tradicionais, como quimioterapia e radioterapia, está sendo investigada por não provocar efeitos secundários severos, como náuseas e perda de cabelo, efeitos decorrentes da quimioterapia. Evitar possíveis infecções protegendo o sistema imunológico também está sendo considerado possível com o uso da graviola, porque, diferente da quimioterapia, a graviola é seletiva, não destrói células saudáveis (Souza, 2009).

As acetogeninas formam uma nova classe de compostos naturais de grande interesse. Sua ação primária está relacionada com sua capacidade de depleção dos níveis de ATP ao inibir o complexo I na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias e inibindo a NADH oxidase do plasma de membranas, principalmente de células tumorais, uma vez que essas células possuem uma alta demanda de ATP (Ferelli et al., 2005).

Estudos têm avaliado a atividade antitumoral de várias acetogeninas presentes na *Annona muricata* L. contra diversas linhagens celulares tumorais *in vitro* como, por exemplo, contra células de carcinoma pancreático e prostático, carcinoma pulmonar, de mama, epidermóide (Quispe et al., 2006). Também tem sido observada a ação antioxidante dos extratos foliares (Freitas et al., 2007) e investigados os efeitos mutagênicos e antimutagênicos inclusive em frutos congelados, sugerindo os dados que o congelamento das frutas contribui para a prevenção contra danos biológicos (Spada et al., 2008).

Uma comparação da atividade antioxidante foi feita entre espécies do gênero *Annona*. As folhas de *A. muricata*, *A. squamosa* e *A. reticulata* foram testadas e os resultados evidenciaram que os extratos etanólico de *A. muricata* possuem atividade antioxidante mais potente *in vitro* quando comparado às folhas de *A. squamosa* e *A. reticulata*. Isso pode ser atribuído à presença de acetogeninas (Baskar et al., 2007).

Estudos visando à identificação e caracterização dos compostos químicos ativos dos extratos vegetais das folhas da graviola mostraram resultados promissores quando os extratos hidroalcoólicos das folhas foram submetidos à avaliação da capacidade antioxidante (Avanzi et al., 2006). Também foi determinada a ação do extrato das sementes contra *Molinema dessetae* e isoladas algumas acetogeninas responsáveis por essa atividade (Luna, 2006).

Jaramillo et al. (2000) investigando os constituintes químicos do pericarpo de *A. muricata* para avaliar sua atividade citotóxica e antileishmanial, verificaram ser a fração acetato de etila a mais efetiva contra linhagens celulares U-937 e cepas de promastigotas *Leishmania*.

### 3.6.3 Constituintes Químicos

A avaliação da composição química do fruto mostrou a presença de açúcares, taninos, pectinas e vitaminas A ( $\beta$ -caroteno), C e do complexo B, enquanto a partir das folhas, casca e raízes foram identificados vários alcalóides. Para as sementes foram registradas acetogeninas, que são encontradas também nas folhas, casca e raízes da planta (Ferelli et al., 2005).

Estudos químicos com a *A. muricata* L. conduziram ao isolamento de compostos de diversas classes, tais como: alcalóides, terpenóides, carboidratos, polifenóis, lipídeos e ácidos aminados. Todavia, nos últimos anos as pesquisas fitoquímicas com esta espécie se dirigiram ao isolamento de compostos da classe das acetogeninas, principalmente a partir das folhas (Luna, 2006).

Acetogeninas formam uma nova classe de compostos naturais de natureza policetídica, que se caracteriza por possuir uma larga cadeia alifática com um a três anéis de tetrahydrofurano (THF). A primeira acetogenina relatada foi a uvaricina, em 1982, isolada do extrato etanólico das raízes de *Uvária acuminate*, e desde então há um crescente interesse, por serem biológica e farmacologicamente ativas como antitumoral, inseticida, citotóxica, antiparasitária entre outros (Figura 13). Há relatos

que a *A. muricata* possui mais de 50 acetogeninas (Quispe et al., 2006) como, por exemplo, a cohibina A e B (Gleye et al., 1997) e murihexol (Yu et al., 1998).

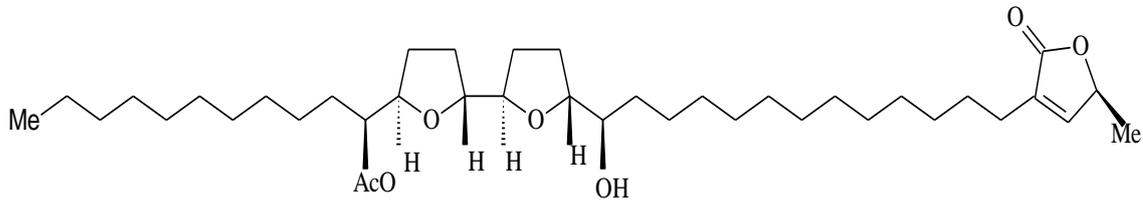


Figura 13: Estrutura química da uvaricina.

As acetogeninas são classificadas em mono tetrahydrofurano (THF), bis-THF adjacente, bis-THF não adjacente e compostos não-THF (Souza, 2003), respectivamente representadas abaixo (Figura 14):

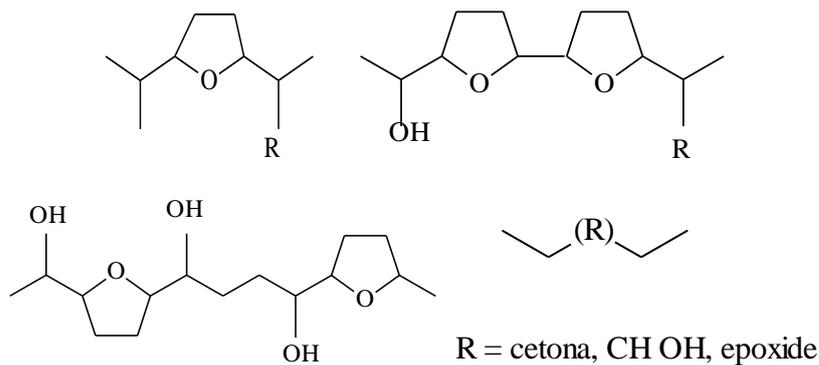


Figura 14: Estrutura química básica das acetogeninas.

As acetogeninas das Annonaceae (Figura 15) também são fortes candidatas para as próximas gerações de drogas no combate a tumores resistentes a quimioterapia devido à sua atuação como inibidores do complexo I da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias de vários organismos, inclusive em células tumorais, levando à depleção dos níveis de ATP (Souza, 2009).

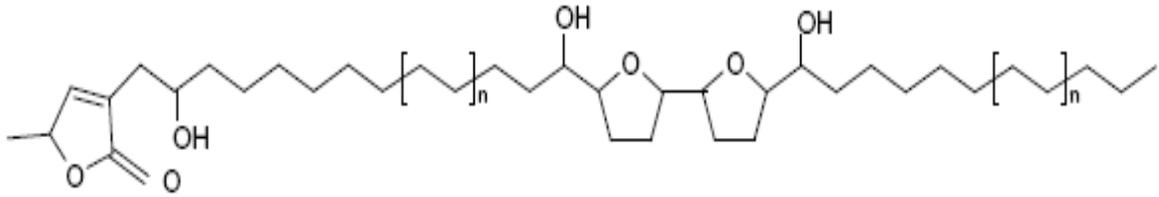
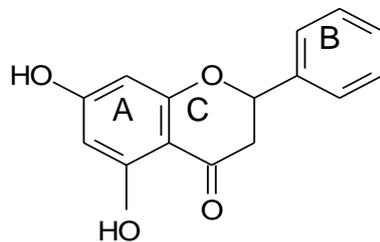
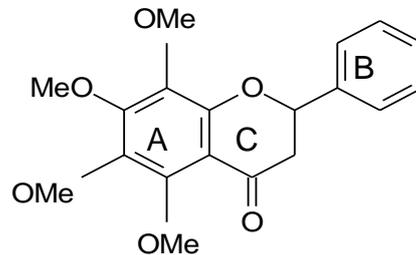


Figura 15: Estrutura básica das acetogeninas das Annonaceae.

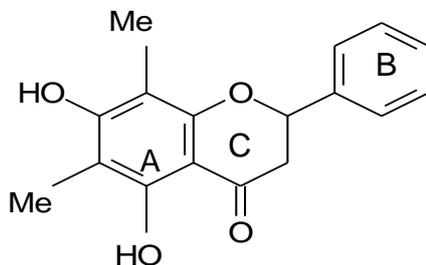
Em relação aos flavonóides, são poucos os relatos em espécies de Annonaceae. Contudo, esta família se destaca pela biossíntese de derivados da via do chiquimato que é responsável pela produção da maioria dos derivados fenólicos produzidos por fontes vegetais. Alguns gêneros de Annonaceae são produtores de flavonóides relativamente pouco polares e com um padrão incomum de substituição (Figura 16), como por exemplo, a ausência de oxigenação no anel B (Soares et al., 2000; Harborne, 1994b).



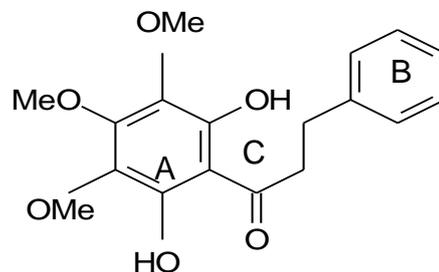
pinocembrina – *Melodorum fruticosum*



Kanakugina – *Popowiacauliflora*



Desmetoximatteucinol - *Unoma lawii*



Kanakugiol - *Popowiacauliflora*

Figura 16: Flavonóides isolados de espécies de Annonaceae.

Uma estratégia metabólica de proteção do núcleo flavonoídico contra a degradação oxidativa é a proteção das hidroxilas fenólicas (Soares, 1996). Em espécies de Annonaceae pode-se observar frequentemente a produção de derivados no qual essa proteção é feita pela formação de éteres metílicos (substituição do tipo O-metila) como é o caso das substâncias kanakugina e kanakugiol (Soares et al., 2000).

Em outra espécie de Annonaceae, *Uvaria angolensis*, é verificada a biossíntese de derivados flavonoídicos menos polares. Outros derivados flavonoídicos incomuns produzidos por *U. angolensis* são as ligações C-C em aromáticos. Este tipo de substância reforça mais uma vez a tendência das espécies de Annonacea em produzir flavonóides menos polares (Soares et al., 2000).

Santos e Salatino (2000) isolaram e identificaram um total de 76 flavonas e flavonóis (Tabela 1), a partir das folhas de espécies de Annonaceae (Tabela 2), sendo a maior parte glicosídeos. Um estudo realizado anteriormente revelou que todos os fenóis encontrados foram glicosídeos de flavonas (apigenina, scutellareina, hispidulina e luteolina) ou flavonóis (canferol, ramnocitrina, 6-hidroxiraamnocitrina, quercetina, isoramnetina e ramnetina), com predominância deste último (Valter et al., 2008).

Tabela 1: Flavonóides isolados de espécies de Annonaceae.

<b>Flavonas</b>		<b>Flavonóis</b>	
1	Apigenina-7-O-glucosídeo	10	Canferol-3-O-arabinosídeo
2	Apigenina-7-O-glucosilglucosídeo	11	Canferol-3-O-galactosídeo
3	Apigenina-8-C-glucosídeo (isovitexina)	12	Canferol-3-O-glucosídeo
4	Apigenina-6-C-glucosídeo (vitexina)	13	Canferol-3-O-ramnosídeo
5	Scutellareina-6-O-galactosídeo	14	Canferol-3-O-arabinosilarabinosídeo
6	Scutellareina-6-O-glucosilglucosídeo	15	Canferol-3-O-(arabinose-glucose) <sup>a</sup>
7	Hispidulina-7-O-glucosilglucosídeo	16	Canferol-3-O-arabinosilramnosídeo

8	Luteolina-7-O-glucosídeo	17	Canferol-3-O-(ácido galactose-glucurônico) <sup>a</sup>
9	Luteolina-6-hidroxi-7-O-ramnosilglucosídeo	18	Canferol-3-O-galactosilgalactosídeo
		19	Canferol-3-O-galactosilglucosídeo
		20	Canferol-3-O-galactosilramnosídeo
		21	Canferol-3-O-glucosilglucosídeo
		22	Canferol-3-O-glucosilramnosídeo
		23	Canferol-3-O-ramnosilarabinosídeo
		24	Canferol-3-O-raamnosilgalactosídeo
		25	Canferol-3-O-ramnosilglucosídeo
		26	Canferol-3-O-ramnosilramnosídeo
		27	Canferol-3-O-(ácido xilose-glucurônico) <sup>a</sup>
		28	Canferol-3-O-glucosilglucosilglucosídeo
		29	Canferol-3-O-(glucose-glucose-ramnose) <sup>a</sup>
		30	Canferol-3-O-(glucose-ramnose-ramnose) <sup>a</sup>
		31	Canferol-3-O-(ramnose-galactose)aglucosídeo
		32	Canferol-3-O-glucosídeo-7-O-ramnosídeo
		33	Canferol-3-O-ramnosídeo-7-O-arabinosídeo
		34	Canferol-3-O-glucosídeo-7-O-glucosilramnosídeo
		35	Canferol-3-O-ramnosídeo-7-O-glucosilglucosídeo
		36	Ramnocitrina-3-O-glucosídeo (7-O-metilcanferol-3-O-glucosídeo)
		37	Ramnocitrina-3-O-rhamnosilglucosídeo
		38	6-Hidroxirhamnocitrina-3-O-glucosídeo

39	6-Hidroxirhamnocitrina-3-O-(glucose-ramnose) <sup>a</sup>
40	Quercetina-3-O-arabinosídeo
41	Quercetina-3-O-galactosídeo
42	Quercetina-3-O-glucosídeo
43	Quercetina-3-O-ramnosídeo
44	Quercetina-3-O-arabinosilarabinosídeo
45	Quercetina-3-O-arabinosilgalactosídeo
46	Quercetina-3-O-arabinosilglucosídeo
47	Quercetina-3-O-arabinosilglucuronídeo
48	Quercetina-3-O-arabinosilramnosídeo
49	Quercetina-3-O-arabinosilxilosídeo
50	Quercetina-3-O-galactosilglucosídeo
51	Quercetina-3-O-galactosilramnosídeo
52	Quercetina-3-O-glucosilglucosídeo
53	Quercetina-3-O-glucosilramnosídeo
54	Quercetina-3-O-ramnosilgalactosídeo
55	Quercetina-3-O-ramnosilglucosídeo
56	Quercetina-3-O-ramnosilramnosídeo
57	Quercetina-3-O-(ácido xilose-glucurônico) <sup>a</sup>
58	Quercetina-3-O-arabinosídeo-7-O-arabinosídeo
59	Quercetina-3-O-galactosídeo-7-O-galactosídeo
60	Quercetina-3-O-glucosídeo-7-O-glucosídeo
61	Quercetina-3-O-glucosídeo-7-O-ramnosídeo
62	Quercetina-3-O-ramnosídeo-7-O-arabinosídeo
63	Quercetina-3-O-ramnosídeo-7-O-glucosídeo

64	Quercetina-3-O-ramnosídeo-7-O-ramnosídeo
65	Quercetina-3-7-O-(arabinose-glucose) <sup>a</sup>
66	Quercetina-3-7-O-(arabinose-xilose) <sup>a</sup>
67	Quercetina-3-O-ramnosídeo-7-O-ramnosídeo-3'-O-ramnosídeo
68	Isoramnetina-3-O-galactosídeo
69	Isoramnetina-3-O-glucosídeo
70	Isoramnetina-3-O-galactosilgalactosídeo
71	Isoramnetina-3-O-galactosilramnosídeo
72	Isoramnetina-3-O-glucosilglucosídeo
73	Isoramnetina-3-O-ramnosilglucosídeo
74	Ramnetina-3-O-glucosilglucosídeo
75	Ramnetina-3-O-glucosilramnosídeo
76	Ramnetina-3-O-ramnosilglucosídeo

<sup>a</sup> = Posição relativa dos açúcares não determinada.

Além das C-glicoflavonas, as flavonas obtidas são O-glicosídeos da apigenina, hispidulina, scutellareína e luteolina.

A extensa diversidade de estruturas encontradas é devido a presença de mono, di e triglicosídeos de diferentes açúcares e a possibilidade de glicosilação nas posições 3, 3/7 ou 3/7/3'. Oxigenação nas posições 6 e O-metilação dos anéis A e B também podem ser observadas em algumas das espécies (Valter et al., 2008).

A Tabela 2 mostra a ocorrência destes flavonóides isolados na família Annonaceae distribuídos por espécies.

Os membros da *Duguetia* destacam-se pela aparente ausência de glicosídeos de quercetina. Observa-se que foram identificados nas folhas de *Duguetia furfuracea* os seguintes flavonóides glicosilados: 3-O-galactosilgalactosil-kaempferol, 3-O-galactosil-isoramnetina, 3-O-galactosilramnosil-isoramnetina e 3-O-ramnosilglucosil-isoramnetina. *Anaxagorea dolichocharpa* aparentemente não possui de flavonas e flavonóis (Santos e Salatino, 2000).

Além disso, algumas enzimas presentes nos frutos têm sido caracterizadas como, por exemplo, a polifenoloxidase (Bora et al., 2004) e as pectinesterases PE I

e PE II (Arbaisah et al., 1997), e estudos sobre a estabilidade de armazenamento do suco de graviola mostraram que a temperatura de armazenamento afeta grandemente a estabilidade microbiológica e conseqüentemente a qualidade do suco (Abbo et al., 2006).

Jurgens et al. (2000) estudando os gêneros *Xylopia*, *Anaxagorea*, *Duguetia* e *Rollinia*, pertencentes à família Annonaceae, verificaram que isoprenóides, principalmente monoterpenos foram os principais compostos em *Duguetia asterotricha*. Estas espécies têm terpenóides e, geralmente, pequenas quantidades de ácidos graxos e derivados. No entanto, há um padrão claro para a ocorrência de ésteres ácidos e compostos benzênicos, os quais são geralmente compostos de destaque das fragrâncias (*Duguetia asterotricha*).

As flores do gênero *Anaxagorea brevipes* e *A. dolichocarpa* são dominadas pelos ésteres de ácidos alifáticos (butanoato-2-metil-etil e butanoato-2-metil-etil). Os monoterpenos (limoneno, p-cimeno, a-pineno), por sua vez, são os principais compostos responsáveis pelo aroma de *D. asterotricha* e o naftaleno prevaleceu no perfume das flores de *Rollinia insignis*. Já os odores das flores de *Xylopia aromatica* e *X. benthamii* foram atribuídos a quantidades elevadas de compostos benzênicos (benzoato de metila e álcool 2-feniletil) (Jurgens et al., 2000). A *Cananga odorata*, uma outra espécie de Annonaceae, apresenta em sua composição do óleo essencial obtido das flores o benzoato de metila, geraniol, eugenol, linalol, acetato de benzila, pineno, cariofileno, entre outros (Ferreira, 2010).

Dentre os compostos aromáticos encontrados na família Annonaceae pode-se citar: etilbenzeno, benzeno1-etil-2-metil, trimetilbenzeno, metilbenzoato, acetato de benzila e acetato-2-fenil-etil (Marchese, 2009; Jurgens et al., 2000).

Nesse contexto, algumas espécies de *Annona* são aromáticas devido à presença de óleos essenciais e seus compostos aromáticos, como os benzoatos. Dentre as análises desta família destaca-se o isolamento de óleos essenciais a partir das folhas *A. muricata* (Luna, 2006; Esquinca, 2005; Leboeuf et al., 1982).

Além disso, a determinação aproximada da composição nutricional e propriedades físicoquímicas da polpa, das sementes e do óleo extraído das sementes da graviola também foram avaliadas e foi observado que se o óleo for desodorizado pode ser usado na culinária (Onimawo, 2002). Estudos também têm sido realizados no que se refere à quantificação do conteúdo total de ácido ascórbico, carotenóides e polifenóis nos frutos (Spada et al. 2008).



Tabela 2 (continuação)

Espécies	Flavonóides																	
	Apigenina			Luteolina			Kaempferol					Quercetina			Isorhamnetina		Ramnetina	
	7R	C	6R	7R	6OH	3Rm	3Rd	3Rt	3R 7R	3R 7Me	3R 7Me 6OH	3Rm	3Rd	3R 7R	3R 7R 3'R	3Rm	3Rd	3Rd
<i>Duguetia furfuracea</i>							18, (22/25)									68	71, 73	
<i>Guatteria</i> sp. 1							14		33			42		58, 62				
<i>Guatteria</i> sp. 2							16					40						
<i>Guatteria australis</i>							19, 21	31				42	(50), 52	60				
<i>Guatteria notabilis</i>												42	47, 48, 52					
<i>Guatteria pogonopus</i>												43		58, 64, (61/63)	67			
<i>Guatteria rupestris</i>						10, 12, 13	22, 25, 26					40, 42	53, 55	62, 63				
<i>Guatteria sellowiana</i>							(22/25)	(29/30)					53, 55	65, 66			72, 73	
<i>Guatteria villosissima</i>						10, 12	25		33			40, 41, 42, 43	55, 56	59				
<i>Hornschuchia bryothrophe</i>			6															
<i>Hornschuchia citriodora</i>	1,2	3,4											52					
<i>Hornschuchia myrtillus</i>							20, 24, 25	(29,30)										
<i>Porcelia macrocarpa</i>							25	29				42	53, 55	61				74,75, 76
<i>Rollinia bahiensis</i>																69	70,73	

Tabela 2 (continuação)

Espécies	Flavonóides																	
	Apigenina			Luteolina			Kaempferol						Quercetina			Isorhamnetina		Ramnetina
	7R	C	6R	7R	6OH	3Rm	3Rd	3Rt	3R 7R	3R 7Me	3R 7Me 6OH	3Rm	3Rd	3R 7R	3R 7R 3'R	3Rm	3Rd	3Rd
<i>Rollinia dolabripetala</i>						12	(19), 21					42		50, 52, 55				
<i>Rollinia sylvatica</i>							21							52				
<i>Trigynaea oblongifolia</i>					7	25												
<i>Xylopiia aromatica</i>						12	25					40,42		48, 55, 56, (53/55)				
<i>Xylopiia emarginata</i>							16, 17, 20, 21, 27							46,(48), 52, 57, (53/55)				

7R: 7-O-glicosídeo; 6R: substituição 6; C: C-glicoflavonas; 3R: 3-O- glicosídeo; 7Me: 7-O-metil; 3'R: 3'-O- glicosídeo; m: mono glicosídeo; d: di glicosídeo; t: tri glicosídeo; números nos parênteses mostram compostos não confirmados.

Outra importante classe de compostos isolados a partir da família Annonaceae são os terpenos. Mais de 518 terpenóides já foram isolados e divididos em 2 tipos diferentes de esqueletos (Figura 17). A abundância de diterpenos do tipo caurano é evidente (Luna, 2006).

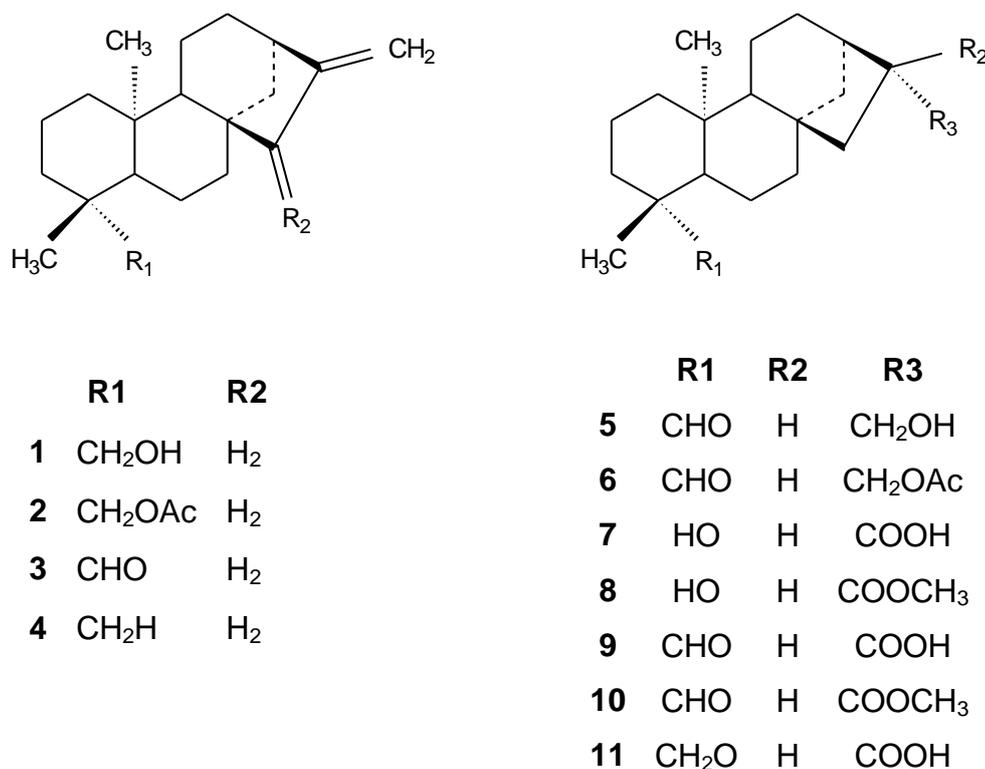


Figura 17: Exemplos de terpenos isolados de espécies de *Annona*.

Em *Annona squamosa* e *Annona senegalensis* foram isolados monoterpenos, enquanto diterpenos foram descritos em *A. squamosa* e sesquiterpenos em *Annona bullata*. Inúmeros compostos terpenóides foram isolados do fruto de *A. muricata* e de *Annona reticulata* (Rinaldi, 2007).

Porém, a maioria das pesquisas tem partido da análise das folhas, sementes e raízes. O levantamento bibliográfico realizado (Pub med, Science Direct, e Web of Science entre o período de 1980 a 2010) não evidenciou relatos quanto à existência de flavonóides a partir da polpa dos frutos da *A. muricata* L. o que torna esta dissertação de mestrado valiosa sob o enfoque do avanço de conhecimento químico acerca desta espécie vegetal no que se refere às substâncias polares, e mais precisamente aos compostos fenólicos, bem como acerca dos ácidos aromáticos presentes na polpa do fruto.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos relacionados a parte química foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA / UENF). Para os experimentos relacionados à parte biológica como a imunofarmacologia e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), contou-se com a colaboração do Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

### **4.1 Coleta de Material Vegetal e Identificação Botânica**

O material vegetal foi coletado no Município de Bom Jesus do Itabapoana – RJ (Latitude =  $-21^{\circ} 08' 02''$ . Longitude =  $41^{\circ} 40' 47''$ ) nos períodos de frutificação, os quais correspondem aos meses de dezembro a fevereiro de 2009. A exsicata foi depositada sob o código H5488 no Herbário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

## 4.2 Parte Química: Aspectos Experimentais Gerais

Todas as amostras foram, em princípio, avaliadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a qual se constitui numa técnica rápida e de baixo custo para uma análise qualitativa e semiquantitativa. Neste método cromatográfico, o solvente ou a mistura dos solventes a serem utilizados como fase móvel devem ser cuidadosamente selecionados, pois terão papel fundamental na separação de misturas (Luna, 2006).

Foram usadas na análise e separação das substâncias placas cromatográficas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> em alumínio, espessura 0,2 mm da MERCK (20X20 cm). Estas foram cortadas com 4 cm de comprimento e as aplicações das amostras feitas a cerca de 0,7 cm acima da borda inferior da placa e 0,5 cm de distância das bordas laterais para a realização da Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para a separação, a fase móvel preparada foi butanol: ácido acético: água (8:1: 1) (Mabry et al., 1970).

Após o desenvolvimento da cromatografia é requerido o uso de reveladores químicos e físicos. Como as placas cromatográficas se encontravam pré-impregnadas com material fluorescente, foram reveladas com lâmpada de UV em comprimentos de onda de 254 e 350 nm (método físico) e também foram reveladas com a solução ácida de sulfato cérico, um revelador químico preparado com ácido sulfúrico e água (método químico). Depois de preparado, o sulfato cérico é aplicado na placa cromatográfica e, em seguida, a placa é aquecida (Sabudak et al., 2005).

Decorrida a análise por CCD, a amostra que ofereceu manchas de interesse foi fracionada por cromatografia em coluna para purificação. Desta forma, o sumo foi fracionado e as frações oriundas foram acompanhadas por CCD seguindo o protocolo descrito acima. As sílicas para a montagem das colunas para a cromatografia empregadas foram:

- *Sílica para cromatografia de fase inversa RP-2.* Consiste numa fase estacionária não-polar e a fase móvel relativamente polar, o oposto do que ocorre no sistema cromatográfico de fase normal, no qual a fase estacionária é altamente polar, suportada em partículas de sílica, e a fase móvel é relativamente não-polar (Skoog et al., 2002).
- *Sílica para a cromatografia de exclusão por tamanho.* O gel de dextrana utilizado foi a Sephadex LH-20, a qual consiste de partículas pequenas (~ 10 µm) de sílica ou de polímero contendo uma rede de poros uniformes nos

quais moléculas do soluto e do solvente podem se difundir. Assim, moléculas maiores do que o tamanho médio dos poros da fase estacionária são excluídas e essencialmente não sofrem retenção, sendo as primeiras a serem eluídas. Já as moléculas com diâmetro menores que dos poros podem penetrar pelo emaranhado de poros e ficar retidas por tempos maiores, sendo as últimas a serem eluídas (Skoog et al., 2002).

Além desta, outras técnicas cromatográficas foram empregadas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a fim de se avaliar e estabelecer o perfil químico. Esta é uma técnica valiosa, pois apresenta alta sensibilidade, resposta rápida aos solutos dependendo do detector utilizado, com resposta dependente da fase móvel, informação qualitativa do pico desejado entre outros fatores (Baggio e Bragagnolo, 2004).

As análises foram realizadas no equipamento Shimadzu Class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, sendo a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 332 nm (detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A) e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20  $\mu$ L. Utilizou-se a coluna RP-18 da Macherey-Nagel (5 $\mu$ m, 4,0 x 250mm). O sistema de solvente usado foi água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) e acetonitrila, sendo a eluição gradiente, conforme ilustrado na tabela 3, com fluxo de 1 ml/min. As amostras foram preparadas na concentração de 5 mg/ml (p/v).

Tabela 3: Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE.

Tempo (min)	Concentração de A Água Acidificada (pH 3,2)	Concentração de B Acetonitrila
0	100	0
5	90	10
10	80	20
15	70	30
20	60	40
25	50	50
30	30	70
40	20	80
45	0	100
50	50	50
55	0	100

Duas curvas padrão com diferentes concentrações foram feitas para a quantificação dos flavonóides nas amostras (área do pico X massa em  $\mu\text{g}$ ) utilizando-se uma amostra pura de rutina (Sigma-Aldrich, Brasil) (Tabela 4; Figura: 18) e quercetina (Sigma-Aldrich, Brasil) (Tabela 5; Figura 19) sendo o resultado expresso em relação ao flavonóide específico.

Tabela 4: Dados de massa (em  $\mu\text{g}$ ) injetada de rutina e as respectivas médias das áreas obtidas (n=3).

Concentração de rutina injetada (em $\mu\text{g}$ )	Área correspondente ao pico
1000	38839151
500	27354427
250	15863005
125	10674778

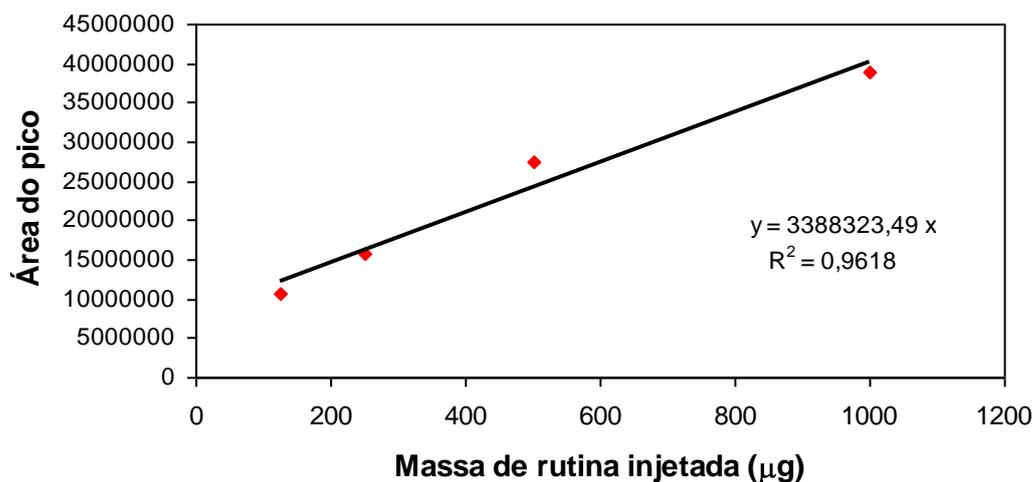


Figura 18: Gráfico da área do pico X massa (em  $\mu\text{g}$ ) injetada de rutina.

Tabela 5: Dados de massa (em  $\mu\text{g}$ ) injetada de quercetina e as respectivas médias das áreas obtidas (n=3).

Concentração de quercetina injetada (em $\mu\text{g}$ )	Área correspondente ao pico
1000	43219154
500	22647927
250	11705644
125	5211644

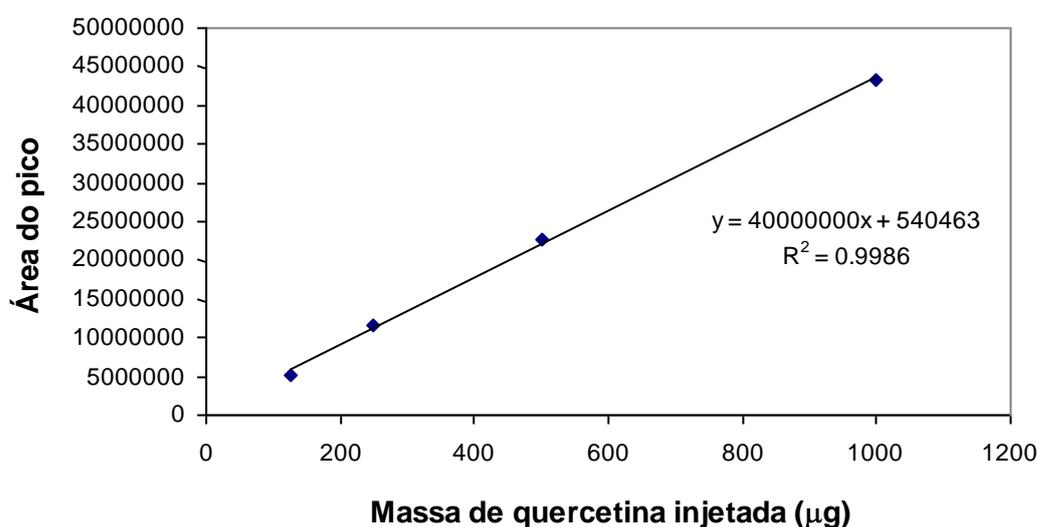


Figura 19: Gráfico da área do pico X massa (em  $\mu\text{g}$ ) injetada de quercetina.

Para a identificação e caracterização da substância isolada foram usados os métodos espectroscópicos como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , além das técnicas bidimensionais como COSY  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$ , HMQC e HMBC, sendo a amostra solubilizada em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Para a técnica de APT a amostra foi solubilizada em dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-d}_6$ ). O equipamento utilizado para as análises foi:

- Varian 400 MHz, do LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por RMN)
- Bruker 400 MHz do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jones (Departamento de Bioquímica - UFRJ).

A espectrofotometria de infravermelho também foi empregada. Para tal, foi feita uma pastilha de KBr (seco), a qual foi prensada com 8 toneladas por 10 minutos. Esta pastilha foi usada como branco (background). Após, a pastilha foi impregnada com substância isolada e feita a leitura. O equipamento usado foi:

- Modelo IRAffinity-1 de Transformada de Fourier (Shimadzu) do CCT – UENF com software IR solution.

#### 4.2.1 Preparação do Sumo e Frações

Para o preparo do sumo, os frutos de *Annona muricata* L. foram limpos, lavados com água destilada e separadas as suas partes (casca, semente e polpa). A polpa foi submetida à extração com água, originando o sumo expresso (GS).

O sumo foi preparado na proporção de 75% (p/v), em liquidificador comercial, sendo depois centrifugado e liofilizado. Uma parte do sumo foi submetida a uma precipitação com etanol (1:1) e, em seguida, realizou-se uma extração líquido-líquido a partir do sobrenadante (GSS), oriundo do sumo dos frutos com solventes em ordem crescente de polaridade, originando as seguintes frações: hexano (FH), acetato de etila (FACeT), butanol (FB) e resíduo (Figura 20). A outra parte foi direcionada para os demais ensaios (imunofarmacológicos e biológicos).

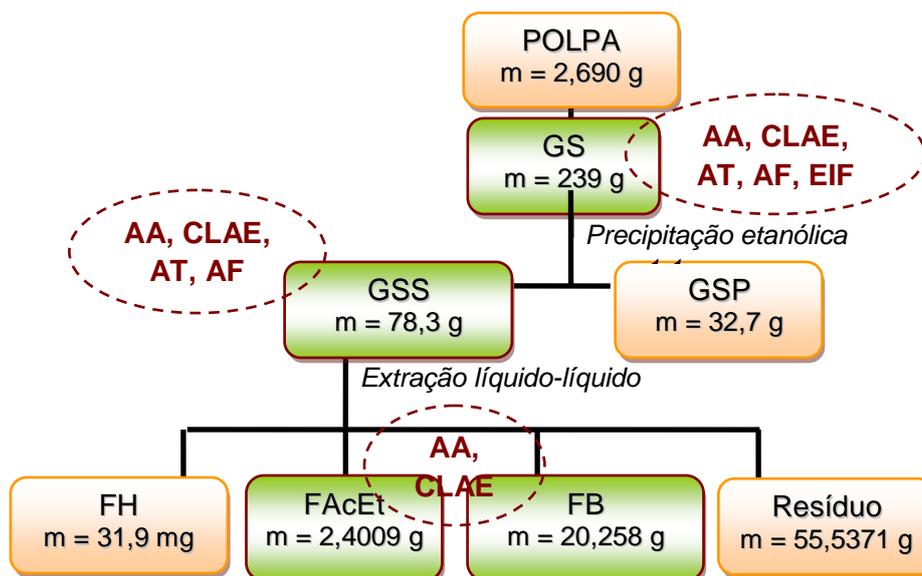


Figura 20: Esquema da obtenção do sumo e frações a partir da polpa de *A. muricata* L. GSP= precipitado. AA = Atividade Antioxidante. AT= Análise de Taninos. AF= Análise de Fenóis totais. EIF = Ensaios Imunofarmacológicos.

As frações FAcEt e FB foram selecionadas para as purificações e outros ensaios por serem aquelas que apresentam as substâncias mais polares, como as moléculas fenólicas.

#### 4.2.2 Fracionamento, Isolamento e Identificação de Substâncias

Após o preparo e obtenção, o sumo e as frações (FAcEt e FB) foram submetidos às técnicas cromatográficas como exemplificados no item 4.2. A Tabela 6 apresenta a fase móvel empregada nas colunas cromatográficas até a obtenção das frações.

Tabela 6: Sistema de solventes utilizado na cromatografia em coluna aberta aplicado nas frações.

Concentração de A Água	Metanol
100	0
70	30
50	50
30	70
0	100

A figura 21 mostra as fases estacionárias utilizadas para a montagem das colunas cromatográficas empregadas, bem como as subfrações resultantes e seus rendimentos. Este processo de fracionamento foi direcionado pelas placas em CCD, onde as frações eluídas da cromatografia em coluna aberta foram agrupadas em conjuntos de acordo com as manchas semelhantes entre em si.

A subfração F6, oriunda da fração FB (fase eluída em 100% metanol), foi submetida a cromatografia de adsorção (Sephadex LH-20), a qual originou 3 conjuntos, sendo G1 (substância purificada) proveniente de F6b (Figura 21).

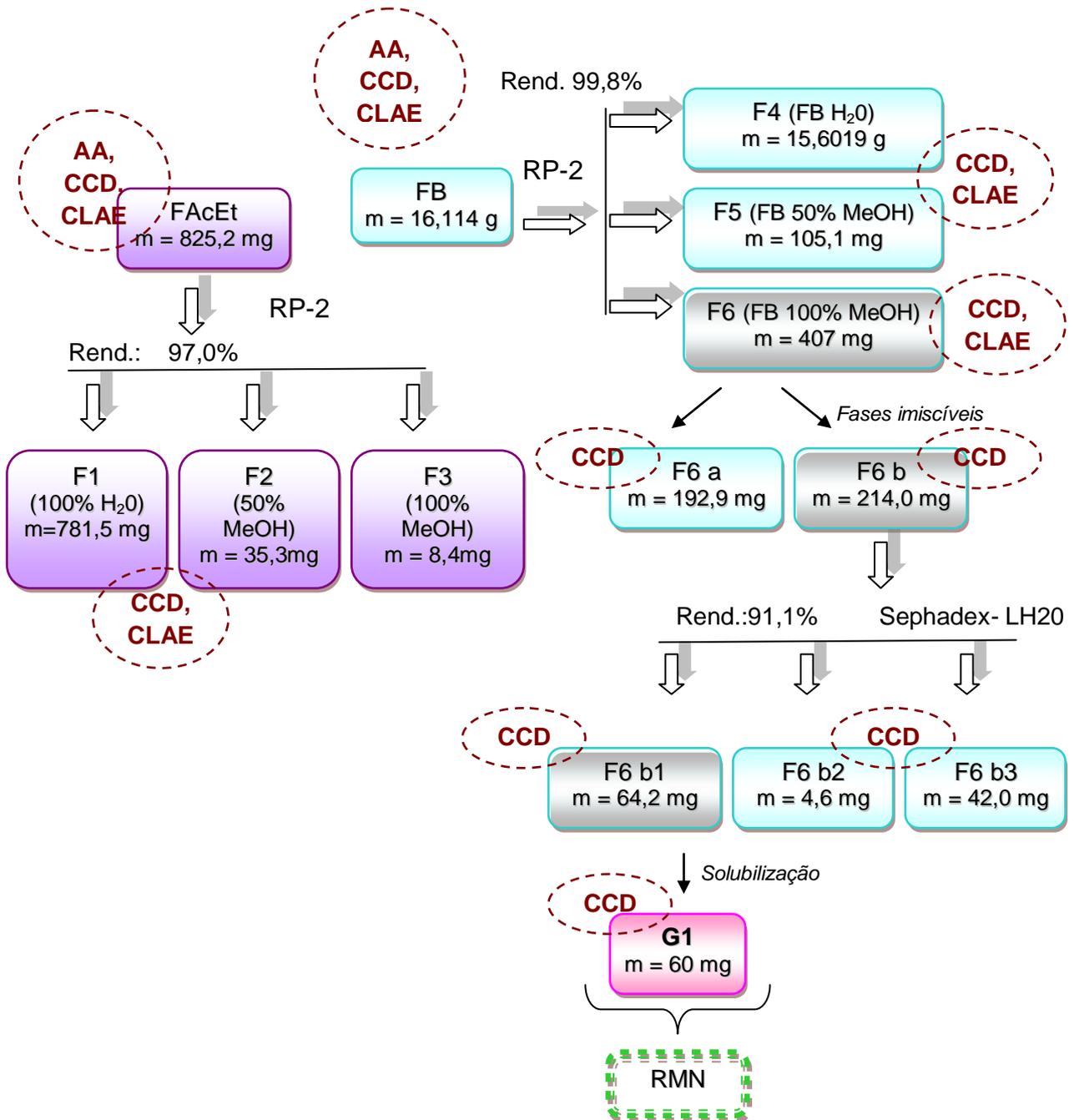


Figura 21: Esquema do fracionamento e purificação do sumo. F1 = Subfração 0% MeOH oriunda da FAcEt. F2 = Subfração 50% MeOH oriunda da FAcEt. F3 = Subfração 100% MeOH oriunda da FAcEt. F4 = Subfração 0% MeOH oriunda da FB. F5 = Subfração 50% MeOH oriunda da FB. F6 = Subfração 100% MeOH oriunda da FB. F6 a = fase A oriunda da subfração 100% MeOH oriunda da FB. F6 b = fase B oriunda da subfração 100% MeOH oriunda da FB. F6 b1 = Subfração 0% MeOH oriunda da Fase B. F6 b2 = Subfração 50% MeOH oriunda da Fase B. F6 b3 = Subfração 100% MeOH oriunda da Fase B. G1 = Substância isolada.

### 4.2. 3 Atividade Antioxidante

O sumo e as frações obtidas (GSS, FH, FAcEt, FB) foram submetidas à avaliação quanto à atividade antioxidante pelo método fotocolorimétrico do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH – 0,1mM).

A capacidade de seqüestrar radicais livres em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi inicialmente escolhida por se tratar de uma metodologia simples, rápida e sensível. As substâncias antioxidantes presentes nas amostras reagem com o DPPH, que é um radical estável, e converte-o em 2,2-difenil-1-picril-hidrazina. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, a forma reduzida do radical gerado é acompanhada de perda de cor (Ali et al., 2009; Amié et al., 2003). Desta forma, o grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato (Figura 22).

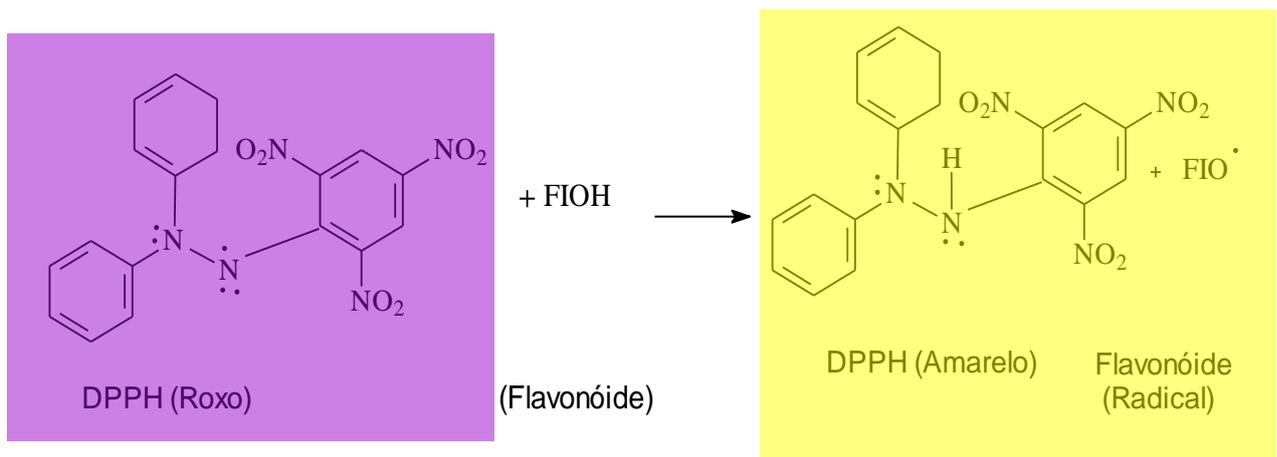


Figura 22: Representação da reação do radical DPPH com um antioxidante (Flavonóide).

Este método consiste na adição de 1 mL do extrato em concentrações que variam de 0,1 - 1000 µg/mL, em 1 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM), sendo a reação processada em 1h à temperatura ambiente. Imediatamente, a absorção do DPPH foi verificada em 515 nm em um espectrofotômetro UV-Vis.

A atividade sequestrante de radicais livres de cada amostra foi expressa pela relação da absorção de DPPH, baseado na solução de DPPH ausente do extrato (controle negativo) e uma solução de um padrão de substância aromática (controle positivo), o 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT). Após, o percentual seqüestrador

(PS%) de radicais livres foi calculado (Koleva et al., 2002). A capacidade de seqüestrar radicais livres foi expressa como percentual de inibição da oxidação do radical e foi calculada mediante a seguinte fórmula (Yen & Duh, 1994):

$$\% \text{ de inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}})/A_{\text{DPPH}}) * 100$$

Onde  $A_{\text{DPPH}}$  é a absorvância da solução de DPPH e  $A_{\text{Extr}}$  é a absorvância da amostra em solução.

#### 4.2.4 Avaliação e Dosagem do Teor de Taninos e Fenóis Totais

##### 4.2.4.1 Método para Dosagem de Taninos Hidrolisáveis

Na determinação de taninos hidrolisáveis (Figura 23), o sumo e o sobrenadante da polpa dos frutos *A. muricata* L. (500 mg) foram macerados com 4 porções de 5 ml de solução de acetona/ água (7:3). As porções foram unidas em balão volumétrico e o volume completado para 25 ml. Uma alíquota de 1 mL da amostra foi hidrolisada com 5 ml de ácido sulfúrico 1 M ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e aquecida em banho-maria a 95°C por 24 horas. Após este processo, foi resfriada em temperatura ambiente, avolumada para 10 ml e reagiu com solução de rodanina ( $\text{C}_3\text{H}_3\text{NOS}_2$ ) e hidróxido de potássio 0,5M (KOH). As amostras foram analisadas em triplicata e as positivas desenvolveram coloração vermelho-rósea. A leitura de absorvância foi feita a 520 nm depois de 5 a 10 minutos (Moreira, 2000) e os resultados foram expressos em porcentagem (p/v).

##### 4.2.4.2 Método para Dosagem de Taninos Condensados

Na determinação de taninos condensados (Figura 23), o sumo e o sobrenadante da polpa dos frutos *A. muricata* L. (500 mg) foram macerados com 4 porções de 5 ml de solução de acetona/ água (7:3). As porções foram unidas em balão volumétrico e o volume completado para 25 ml. Prosseguindo, para 1 mL de amostra foram adicionados 4mL de solução de butanol (BuOH) em ácido clorídrico 5% (HCl) e aqueceu-se em banho-maria a 95°C por 2 horas. As amostras positivas desenvolveram coloração vermelha ou violeta e a absorvância das amostras foi feita

a 540 nm após 5 a 10 minutos (Moreira, 2000), sendo os resultados expressos em porcentagem (p/v).

#### 4.2.4.3 Método para Determinação de Fenóis Totais

Para a determinação do teor de fenóis totais (Figura 23), o sumo e o sobrenadante da polpa dos frutos *A. muricata* L. (500 mg) foram macerados com 4 porções de 5 ml de solução de acetona/ água (7:3). As porções foram unidas em balão volumétrico e o volume completado para 25 ml. Usou-se o método de Folin-Denis, o qual envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul (Moreira, 2000; Swain & Hills, 1959).

Adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Denis em 0,5 mL da amostra e 3 mL de água destilada e avolumou-se para 10mL. Após 1 hora, 1 mL da solução de carbonato de cálcio saturada ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) foi adicionada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 760nm e os resultados foram expressos em mg/mL. A quantidade total de fenóis de cada extrato foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido tânico (Moreira, 2000).

O espectrofotômetro utilizado foi da marca UV-VIS Shimadzu Mini 1240 para todas as amostras e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

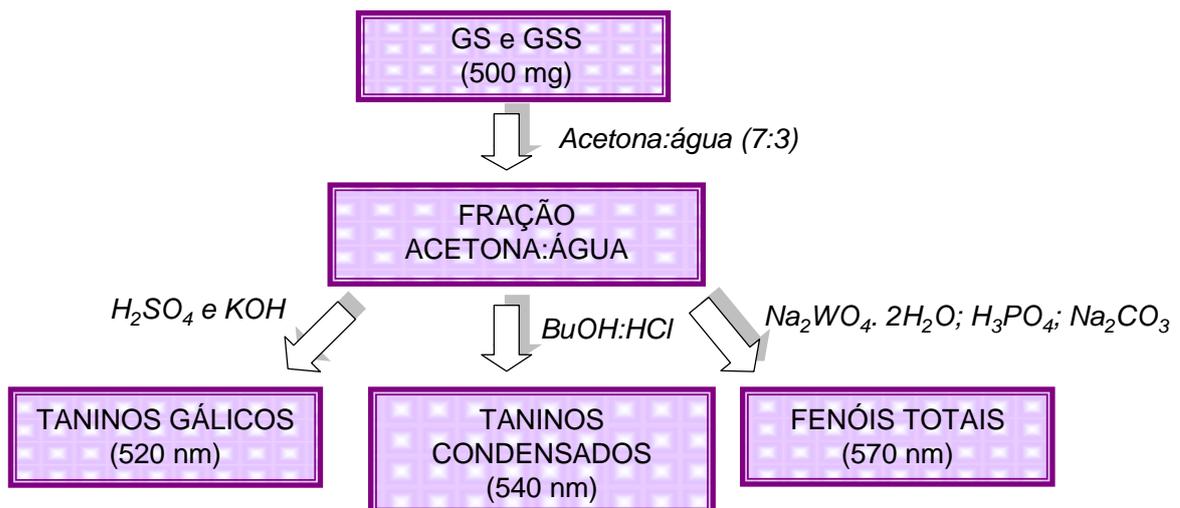


Figura 23: Fluxograma representativo para a dosagem de taninos e fenóis totais da polpa dos frutos de *A. muricata* L.

## **4.3 Parte Biológica**

### **4.3.1 Ensaios Imunofarmacológicos**

#### **4.3.1.1 Cultivo Celular**

Macrófagos murinos peritoneais da linhagem celular RAW 264.7 e células leucêmicas humanas U937 foram obtidos da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) e cultivados a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em DMEM-F12 suplementado com 10% SBF e gentamicina (50 µg/mL).

#### **4.3.1.2 Avaliação da Atividade Imunomodulatória na Produção de Óxido Nítrico em RAW 264.7**

Células RAW 264.7 ( $5 \times 10^5$  células/mL) foram plaqueadas em placa de 96 poços (Corning Inc., Corning, NY, USA) na presença ou ausência do sumo da polpa dos frutos de *Annona muricata* L. (500µg/mL) diluídos em PBS e/ou LPS (*Escherichia coli* 055:B5; Sigma, St. Louis, MO, USA).

Após 24h de incubação, 50µL do sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação da inibição da produção de NO. Como controle positivo da inibição foi usado sobrenadante da cultura de macrófagos não tratado e não estimulado com LPS e como controle negativo macrófagos estimulados com LPS (1 µg/mL) e não tratado (Zhao et al., 2008).

Nitrito, um metabólito estável de NO, foi determinado pelo método de Griess. Inicialmente, as amostras foram incubadas com um volume igual de reagente de Griess e a absorbância mensurada a 540nm. A concentração de nitrito total foi determinada por comparação com curva padrão de NaNO<sub>2</sub> (Griess, 1864).

#### **4.3.1.3 Avaliação da Citotoxicidade e Viabilidade Celular em RAW 264.7 e Células U937**

Células RAW 264.7 ( $5 \times 10^5$  células/mL) foram cultivadas e estimuladas como descrito nos subitens 4.3.1.1 e 4.3.1.2 e incubadas por 24h (Muzitano et al., 2006) e as células U937 ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram incubadas com o sumo nas

concentrações finais de 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/ml, 125µg/mL e 62,5µg/mL por 48h.

O teste de citotoxicidade do sumo foi efetuado utilizando o ensaio de LDH e o de viabilidade celular através do ensaio de MTT. No ensaio de MTT com RAW 264.7 o percentual de viabilidade obtido foi convertido à percentual de citotoxicidade a fim de comparação com o método de LDH (Muzitano et al., 2006).

O teste de citotoxicidade pelo método de MTT é rápido, sensível e barato e que visa analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. Consiste numa análise colorimétrica baseada na conversão do MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes nas células metabolicamente ativas, que permite quantificar a percentagem de células vivas. Desta forma, o teste de MTT permite definir a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (Barbosa, 2009).

Sendo assim, para o MTT, ao final do período de incubação, 5 µl de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol (MTT, 5mg/ml) foi adicionado em cada poço e 2h depois o sobrenadante da placa foi removido e os cristais formados foram solubilizados por HCl (4mM) adicionado em isopropanol. A absorbância foi obtida a 570nm.

A liberação de LDH (enzima citoplasmática lactato desidrogenase) foi determinada utilizando 50µL do sobrenadante da cultura acrescido de 100µL de solução de alumen férrico e substrato, a 37°C por 3 min. Após, acrescentou-se 100µl da solução de NAD e fenasina metasulfato, mantendo-se a 37°C por 5min (Kit comercial Labrax). A concentração de LDH, que representa uma indicação indireta de citotoxicidade, foi determinada colorimetricamente a 492nm. A liberação específica foi calculada como porcentagem dos controles (células não-tratadas como controle negativo e células tratadas com 1% de Triton X-100 como controle positivo).

#### **4.3.1.4 Análises Estatísticas**

A significância estatística dos resultados obtidos foi analisada empregando o teste ANOVA. Valor de  $p < 0.05$  foi considerado indicativo de significância. Para a realização dos calculos foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.01, EUA.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Perfil Cromatográfico e Fracionamento

A princípio, as frações oriundas do sumo da polpa dos frutos de *A. muricata L.* foram submetidas à Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Verificou-se que o sistema de solventes empregado foi satisfatório, pois houve separação de algumas manchas. Também foi possível verificar que o teor de substâncias fenólicas é considerável, uma vez que foi possível notar manchas características para tais substâncias, como descrito no item 4.2 (página 39).

Pela CCD com a FH (fração hexânica), FAcEt (fração acetato de etila) e FB (fração butanólica) observaram-se manchas de interesse. Contudo, como não havia massa suficiente para proceder a purificação da FH e FAcEt, optou-se pela purificação da FB (Figura 24).

De acordo com esta CCD (Figura 24), pode-se notar a diferença de polaridade nas manchas observadas na FB, as quais possuem  $R_f$  de 0,87 e  $R_f$  de 0,36, indicando que a  $R_f$  0,87 é a mais apolar para o sistema de solventes utilizado, e suporte e a mancha cujo  $R_f$  é 0,36 já apresenta características de maior polaridade.

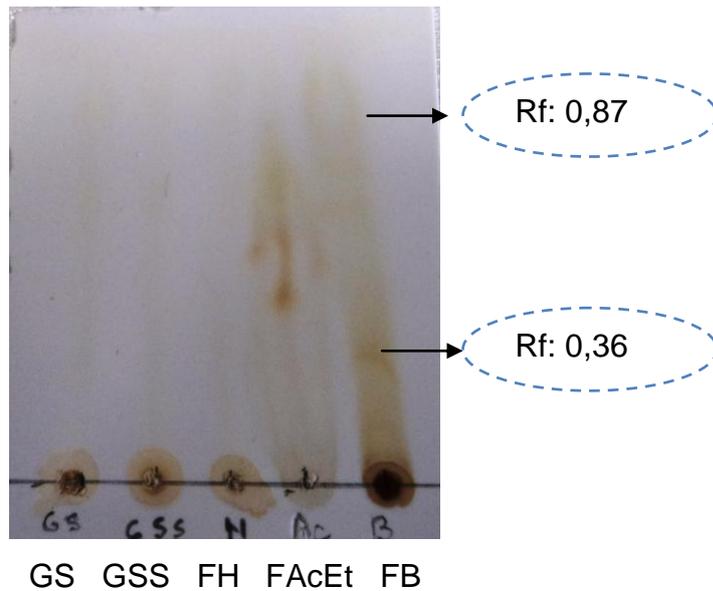


Figura 24: Cromatograma das frações obtidas a partir do sumo da polpa dos frutos de graviola realizada por CCD, mostrando as manchas características. Fase móvel: butanol: ácido acético: água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.

Com o intuito de conhecer o perfil químico, o sumo e as frações foram submetidos a outra técnica cromatográfica, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para conhecer as substâncias presentes. Esta é uma técnica extremamente útil e desempenha um papel valioso na separação de misturas complexas como, por exemplo, os flavonóides e outras substâncias aromáticas. Pesquisas relacionadas ao tempo de retenção (TR) com diversos suportes e eluentes têm sido aperfeiçoados e tabelados, a fim de se obter condições ótimas de análise (Oliveira, 2005).

Para direcionar as análises por CLAE foram usados 2 padrões de substâncias fenólicas, pois esses representam moléculas geralmente detectadas em frutas (O'Prey et al., 2003), a saber:

- *Rutina*: flavonóide que possui o esqueleto semelhante ao da quercetina, se diferenciando pela presença de duas unidades de açúcares (glicose interna e ramnose externa) ligados na posição 3 do flavonóide (Figura 25, cromatograma 1).
- *Quercetina*: flavonol penta-hidroxilado nas posições 3, 5, 7, 3' e 4', (Figura 26, cromatograma 2).

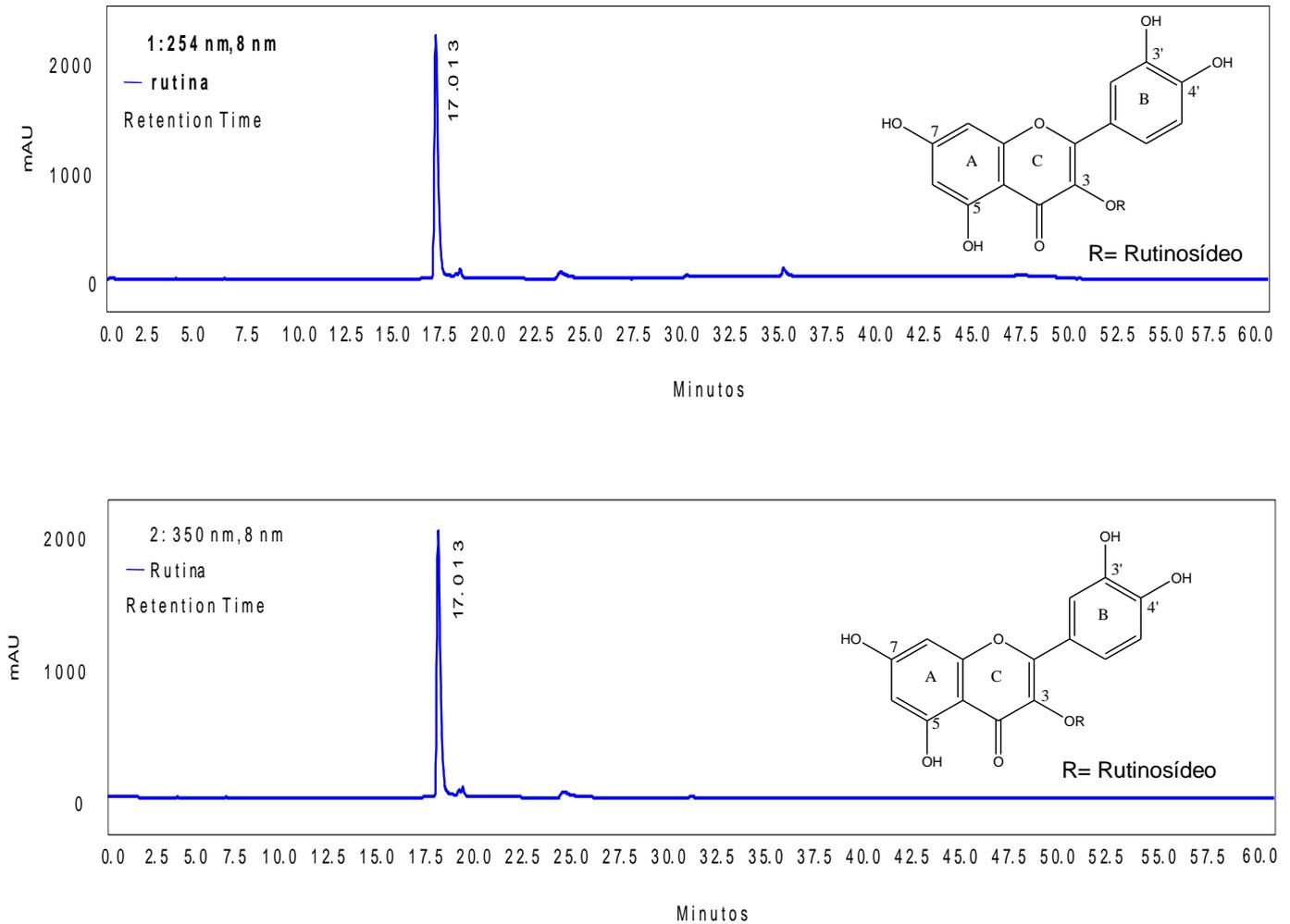


Figura 25: Cromatograma 1: perfil químico da rutina avaliado por CLAE e estrutura química da rutina. O equipamento usado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, sendo a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20  $\mu$ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 $\mu$ m, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.

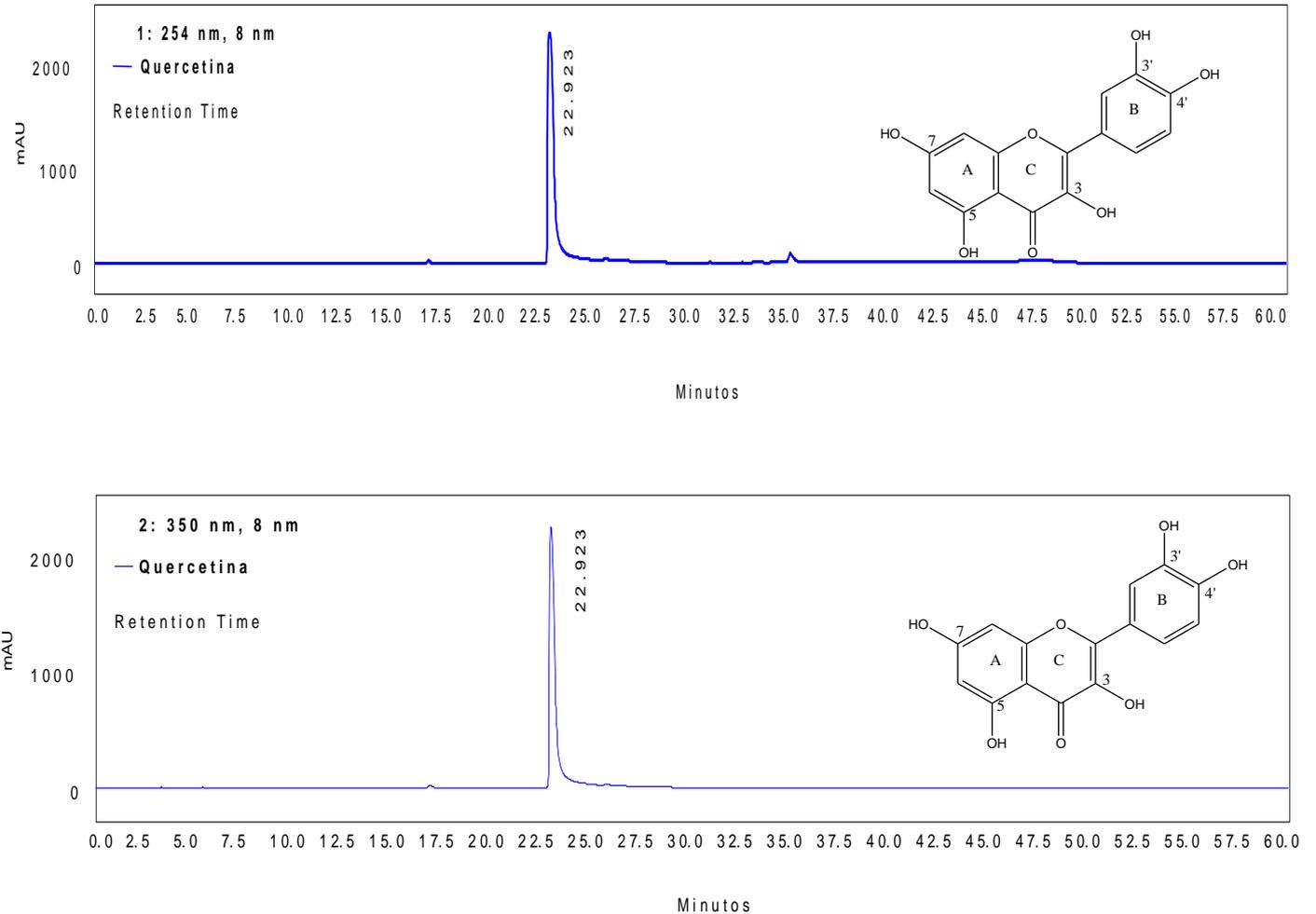


Figura 26: Cromatograma 2: perfil químico da rutina avaliado por CLAE e estrutura química da quercetina. O equipamento usado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, sendo a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20  $\mu$ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 $\mu$ m, 4,0 x 250mm). C= 1mg/mL.

Pode-se observar, conforme as figuras 25 e 26, que ambas as substâncias padrões absorvem nos comprimentos de onda de 254 e 350 nm, e que para o sistema de solventes empregados, os picos de ambos os flavonóides (rutina e quercetina) foram tabelados, respectivamente, em 17,013 minutos e 22,923 minutos.

Desta forma, os tempos de retenção e as áreas correspondentes aos flavonóides rutina e quercetina são mostrados na Tabela 7. A rutina possui um percentual de área de 84,3 % e a quercetina representa 96,8 %. Este resultado avalia o quão puros são os flavonóides em questão, além de estabelecer o tempo de retenção nas condições de análise mencionadas.

Tabela 7: Tempos de retenção e áreas correspondentes dos flavonóides quercetina e rutina.

Rutina			Quercetina		
Tempo (min)	Área (%)	Área	Tempo (min)	Área (%)	Área
17.013	84,3	31125938	22.923	96,8	56613068

Os flavonóides (rutina e quercetina) quando solubilizados em metanol (MeOH) produzem no espectro de ultravioleta (UV) duas bandas de absorção características na região de 240 à 400 nm (Figura 27), o que corrobora com os picos observados nestas análises por CLAE. Essas bandas são conhecidas como banda I e banda II: a banda I (300-380 nm) está associada à absorção do sistema cinamoil do anel B e a banda II (240-280 nm) se dá pela absorção do sistema benzoil do anel A (Alonso-Salces et al., 2004; Mabry et al., 1970).

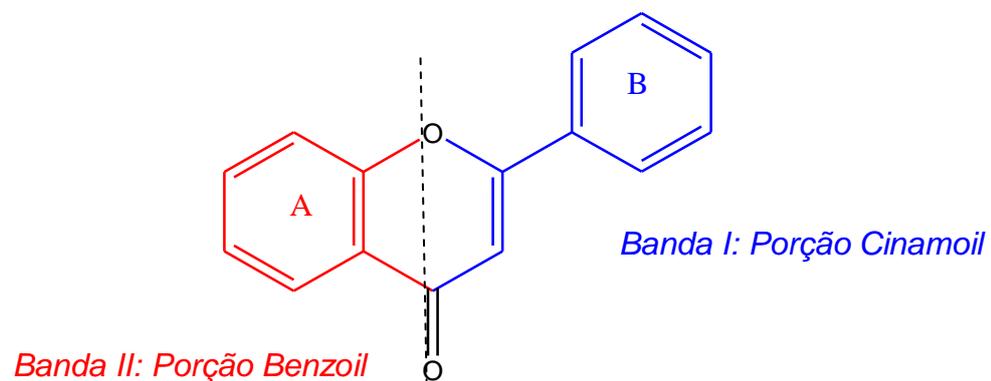


Figura 27: Estrutura química de um flavonóide com as partes que originam as bandas de absorção características no UV.

Neste sentido, o espectro de ultravioleta dos flavonóides rutina (A) e quercetina (B) é apresentado na figura 28. Destaca-se as bandas características dos picos em 350nm (que corresponde a banda I do anel B) e a banda próximo a 240 nm (que representa a banda II do anel A), o que corrobora com os picos observados em ambos os flavonóides em 254 e 350 nm nas análises por CLAE (Figuras 25 e 26 respectivamente).

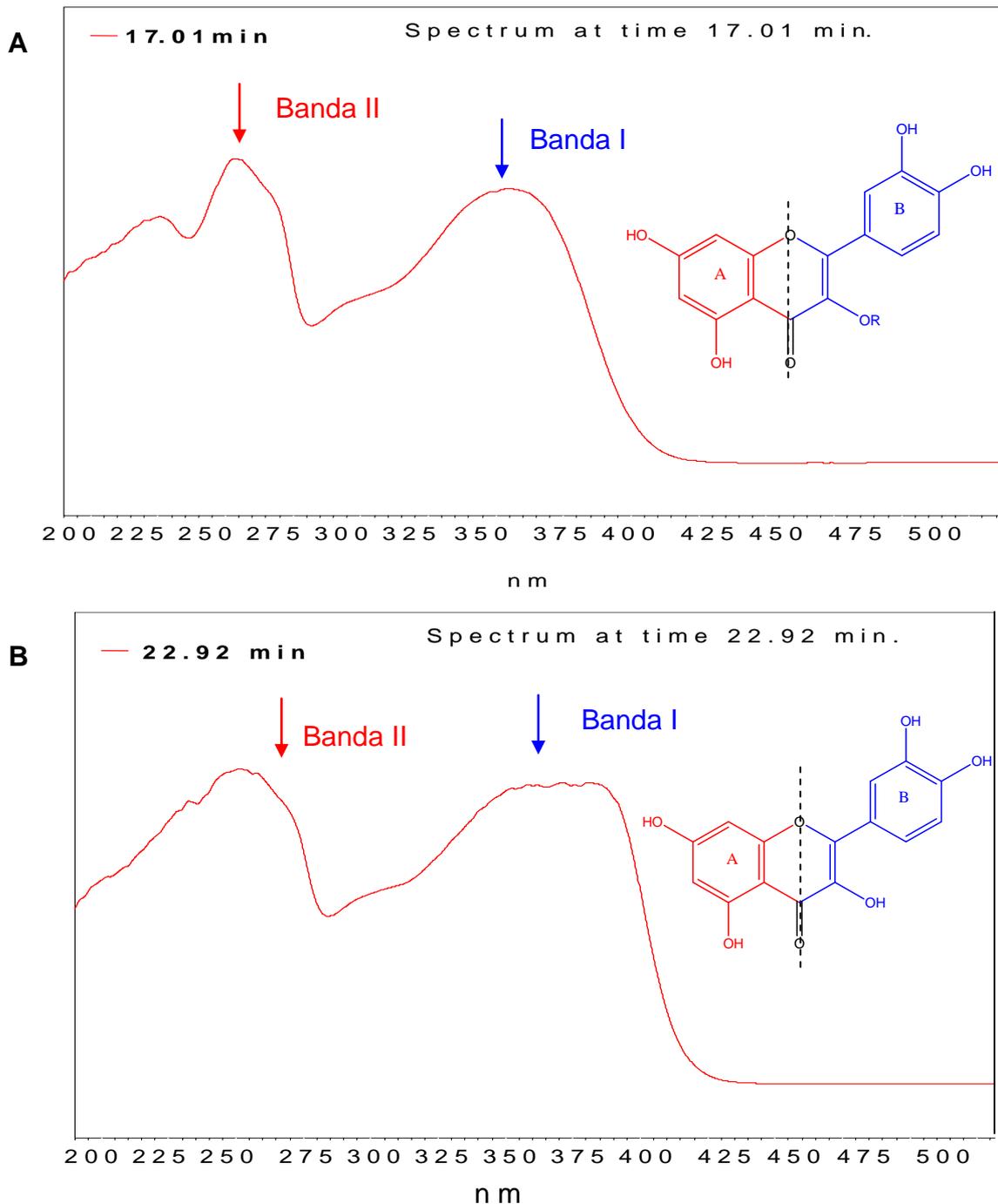


Figura 28: Espectros de ultravioleta dos flavonóides rutina (A) e quercetina (B).

Verificados os tempos de retenção dos flavonóides rutina e quercetina, o sumo, frações e subfrações foram submetidas à análise por CLAE para o conhecimento do seu perfil químico. Após a realização da CLAE pode-se observar nos cromatogramas referentes às frações e subsfrações de acetato de etila (FACeT, F1 e F2) a indicação da presença dos flavonóides rutina e quercetina (Figura 29, 30 e 31). No sumo e nas demais frações e subfrações advindas da purificação não foram observados indícios da presença de flavonóides (dados não mostrados).

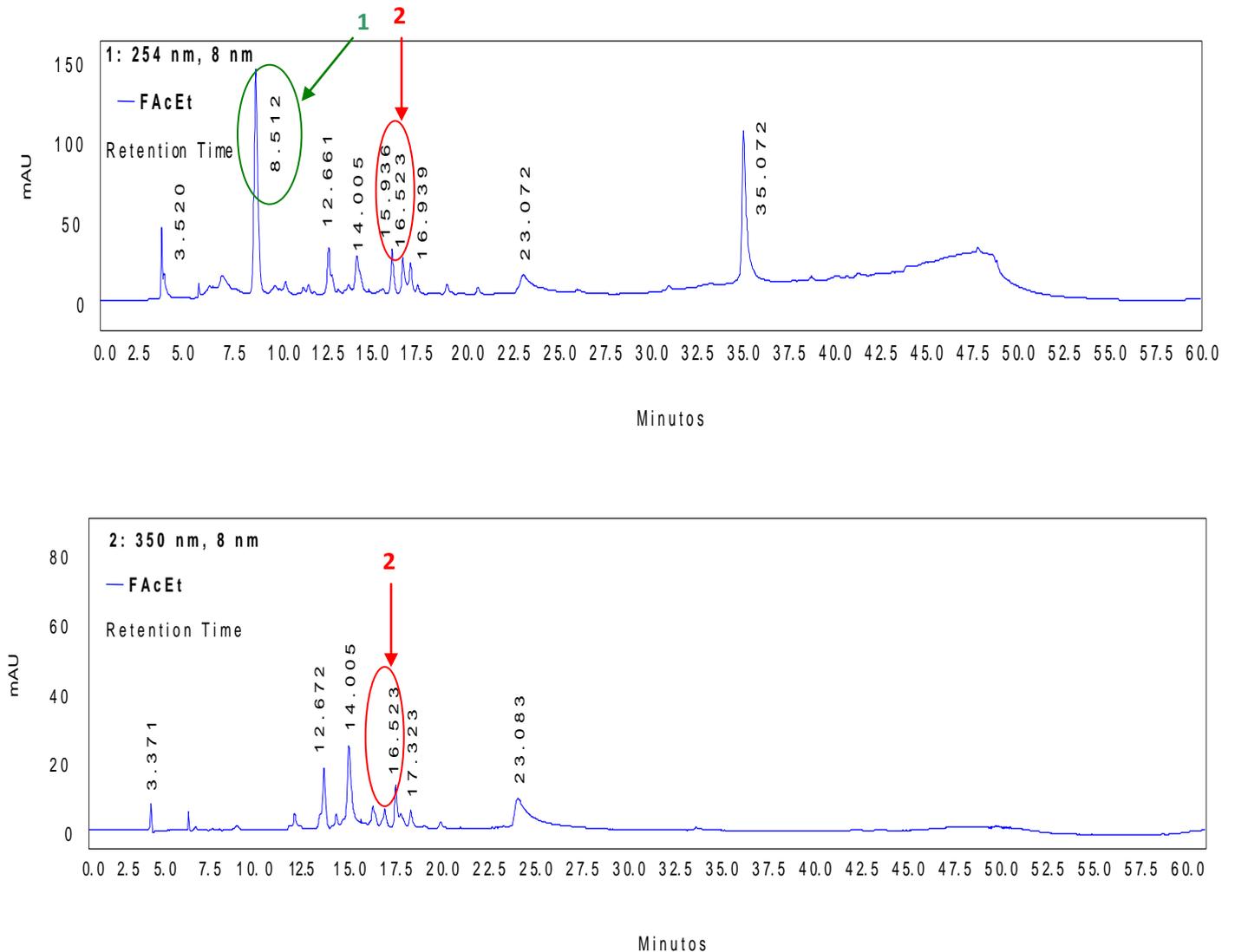


Figura 29: Cromatograma 3, perfil químico da fração acetato de etila (FACeT) avaliada por CLAE. Seta 1: Pico majoritário; Seta 2: Pico com tempo de retenção característico para a rutina.

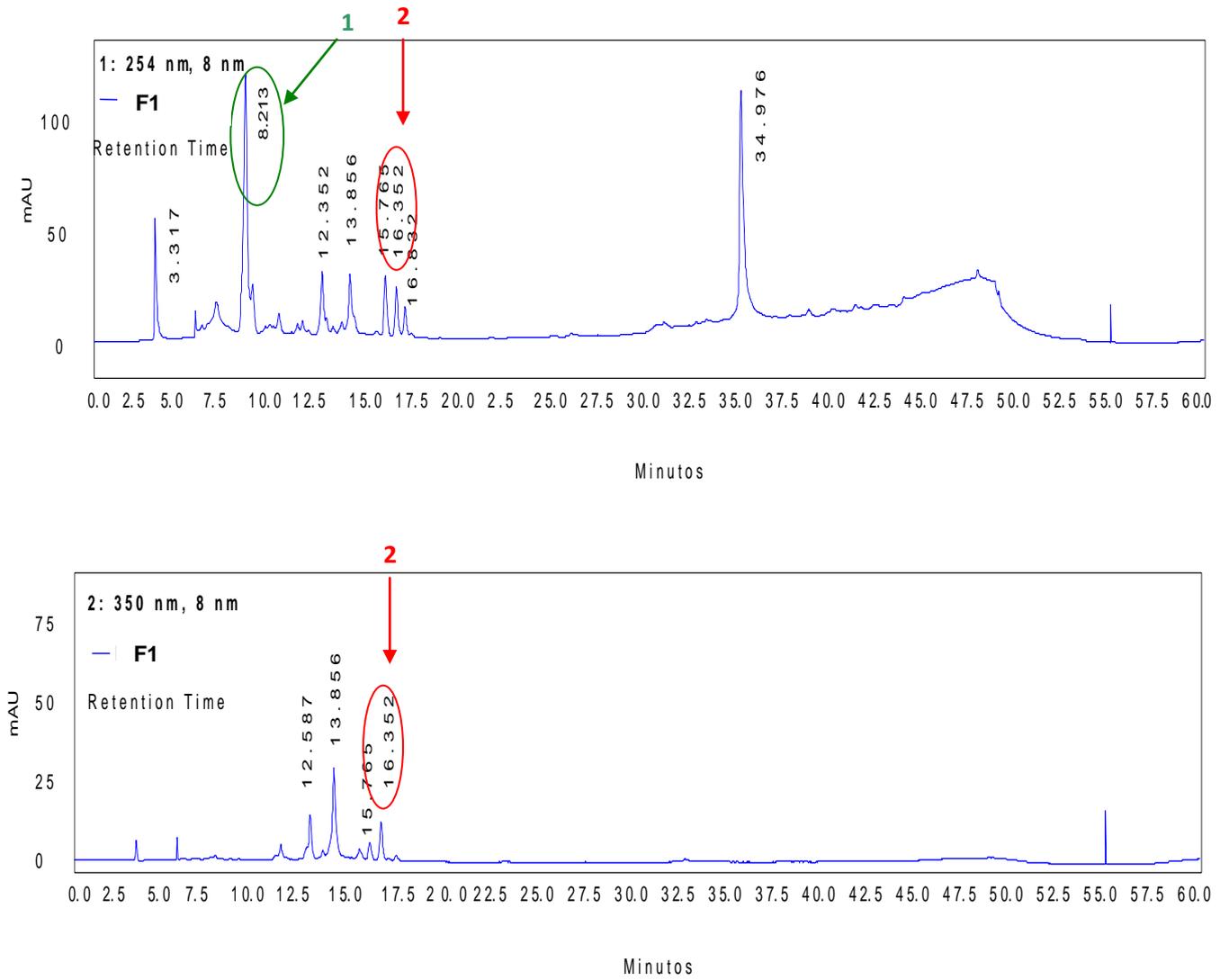


Figura 30: Cromatograma 4, perfil químico da subfração F1 avaliada por CLAE. Seta 1: Pico majoritário; Seta 2: Pico com tempo de retenção característico para a rutina.

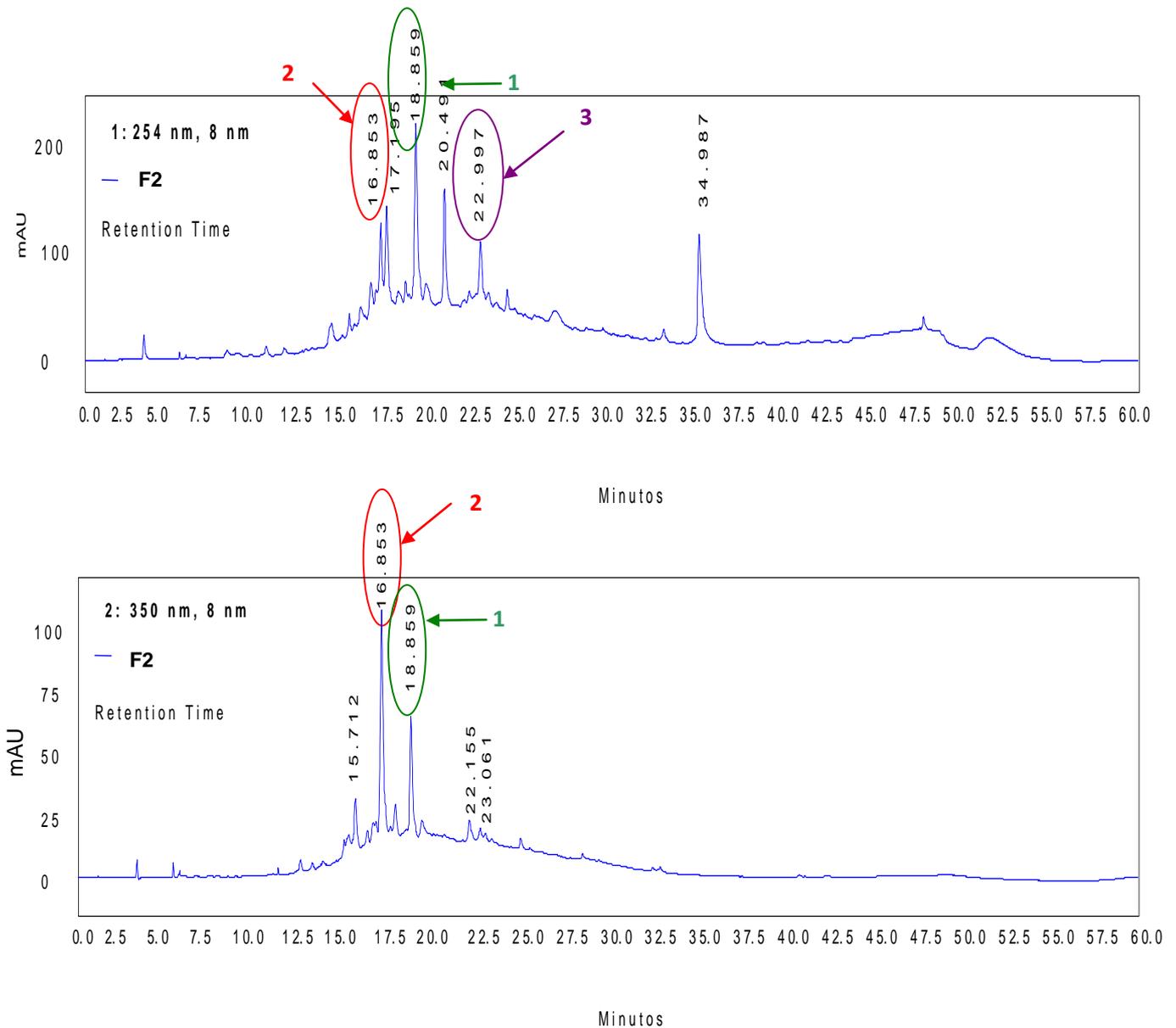


Figura 31: Cromatograma 5, perfil químico da subfração F2 avaliada por CLAE. Seta 1: Pico majoritário; Seta 2: Pico com tempo de retenção característico para a rutina; Seta 3: Pico com tempo de retenção característico para a quercetina.

Realizada a CLAE pode-se observar um pico majoritário no tempo de retenção em 8,512 minutos para a FAcEt e em 8,213 minutos para a subfração F1, (seta 1: circulado em verde) no comprimento de onda de 254 nm, com áreas correspondentes a 2.181.602 e 1.802.025, sendo que estes mesmos picos não são observados no comprimento de onda de 350 nm e não correspondem aos padrões

aromáticos existentes no laboratório (Figura 29 e 30). Portanto, não puderam ser identificados.

Na CLAE realizada com a subfração F2, observa-se um pico majoritário no tempo de retenção de 18,859 minutos (seta 1: circulado em verde) no comprimento de onda de 254 nm, com área de 4.114.065, sendo este pico também observado no comprimento de onda de 350 nm, com área de 1.084.813 (Figura 31).

É nítido que os picos com tempos de retenção de 35,072 minutos (para a FAcEt), 34,976 minutos (para a F1) e 34,987 minutos (para a F2) se apresentam também significativos no comprimento de onda de 254 nm, com áreas de 3.372.447, 3.287.259 e 3.945.180. Contudo, estes picos não são observados no comprimento de 350 nm.

Nos cromatogramas 3 e 4 ( Figuras 29 e 30) observa-se também que os picos com tempos de retenção de 16,523 minutos para a FAcEt, 16,352 minutos para a F1 e 16,853 minutos para a F2 (seta 2: circulado em vermelho) são indicativos da presença do flavonóide glicosilado rutina, como se pode comprovar no cromatograma 1 (Figura 25) e tabela 7.

Já no cromatograma 5 (Figura 31) observa-se que o pico com tempo de retenção de 22,997 minutos, o qual caracteriza o flavonóide quercetina (seta 3: circulado em roxo), é pouco representativo no comprimento de onda de 254 nm, sendo que este mesmo pico não foi observado para o comprimento de onda de 350 nm, devido a sua baixa concentração.

Com o intuito de confirmar a presença destes flavonóides (rutina e quercetina) na fração acetato de etila e suas subfrações foi realizada uma co-cromatografia dos padrões junto com estas frações, a fim de verificar os tempos de retenção e o perfil cromatográfico das amostras unidas aos padrões (Figuras 32, 33 e 34). A subfração F3 não foi submetida a este processo cromatográfico devido à insuficiência de massa.

De acordo com esta co-cromatografia dos padrões junto com as amostras (FAcEt, F1 e F2), pode-se notar que nas amostras há a presença de picos compatíveis com os tempos de retenção da rutina e da quercetina. Todavia, quando os padrões foram injetados juntos com as amostras, observou-se um pequeno deslocamento dos tempos de retenção da amostra, o que provavelmente ocorre devido a existência de uma interação entre as substâncias presentes nas amostras e os padrões (rutina e quercetina).

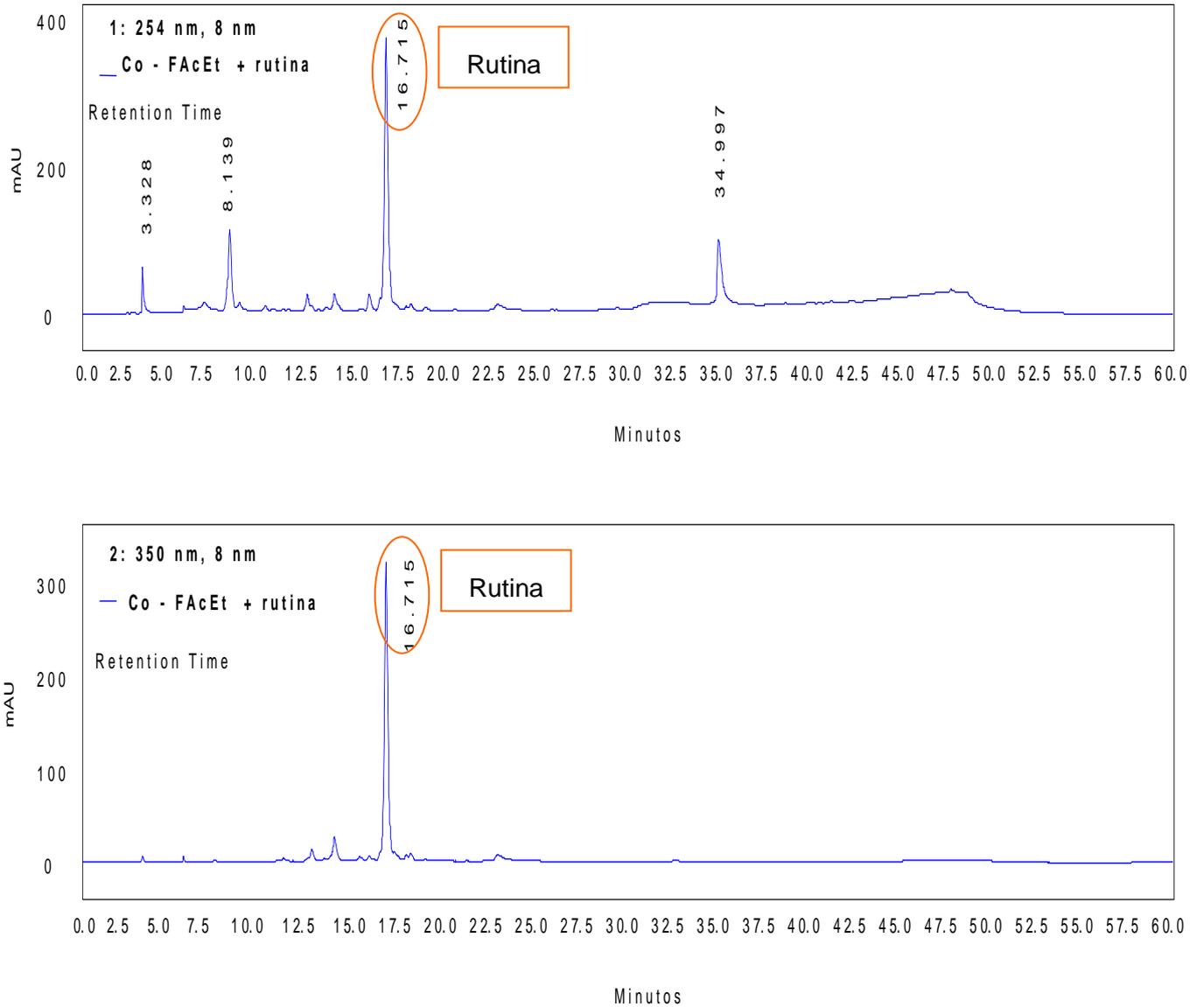


Figura 32: Cromatograma 6, perfil químico da co-cromatografia da fração acetato de etila (FACet) junto com o flavonóide rutina avaliados por CLAE.

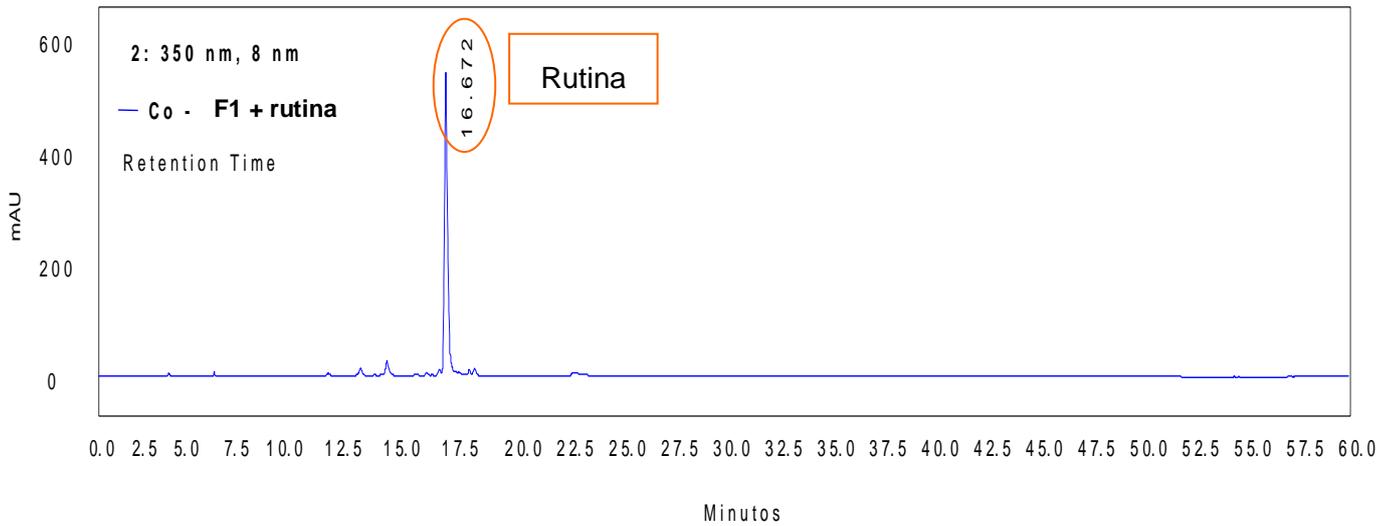
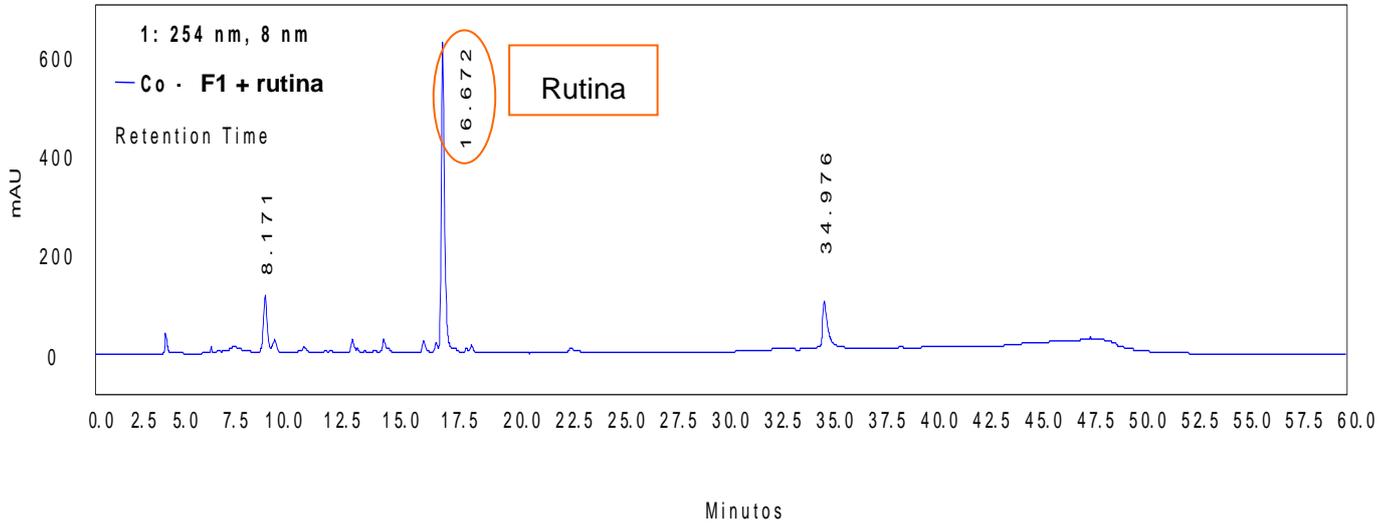


Figura 33: Cromatograma 7, perfil químico da co-cromatografia da subfração F1 junto com o flavonóide rutina avaliados por CLAE.

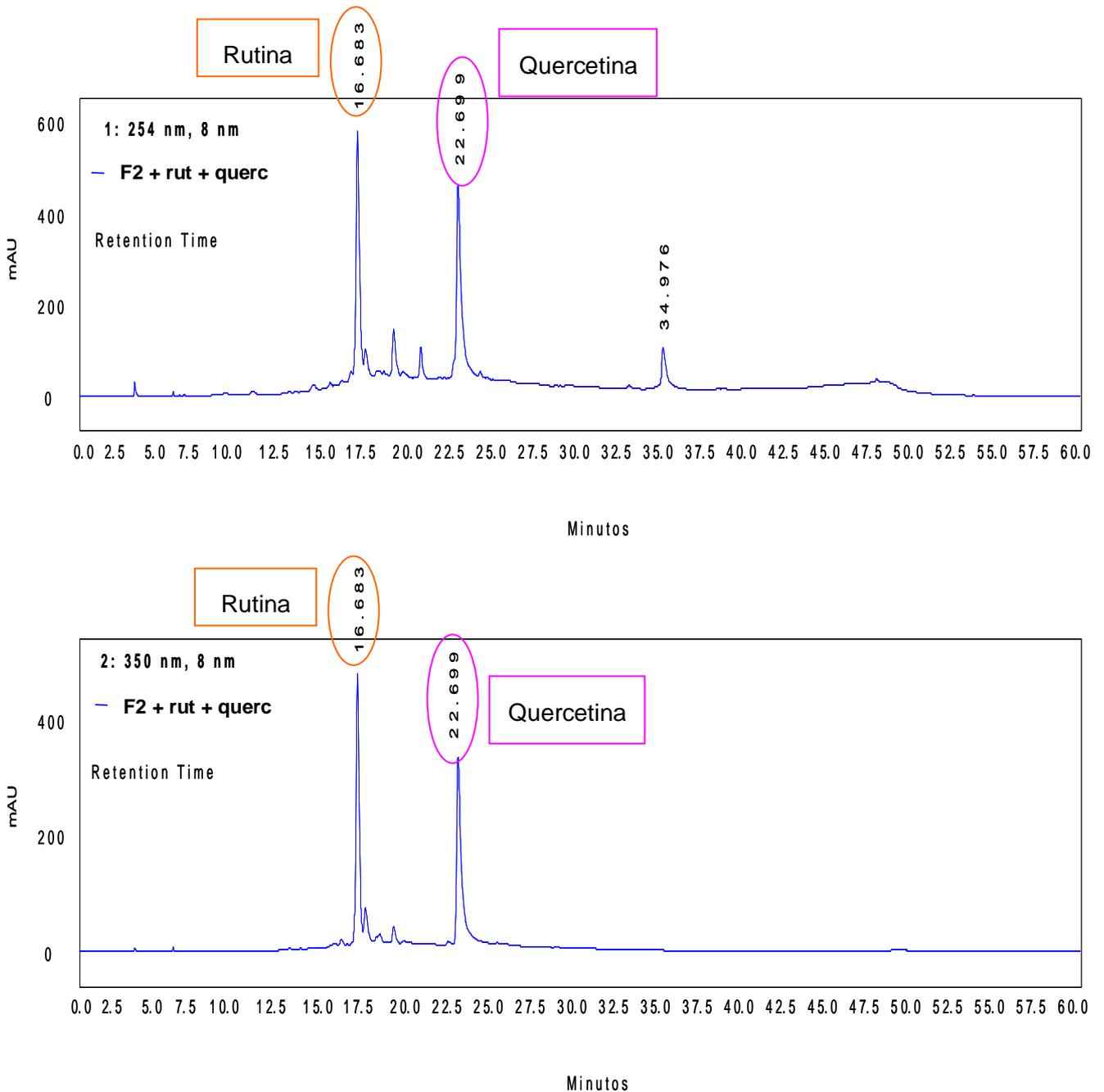


Figura 34: Cromatograma 8, perfil químico da co-cromatografia da subfração F2 junto com os flavonóides rutina e quercetina avaliados por CLAE.

Os espectros de UV para estes picos que indicam a presença da rutina e da quercetina (Figura 34) revelam as bandas em aproximadamente 240 e 350 nm, o que em tese confirmam a presença de flavonóides com características para as bandas I e II.

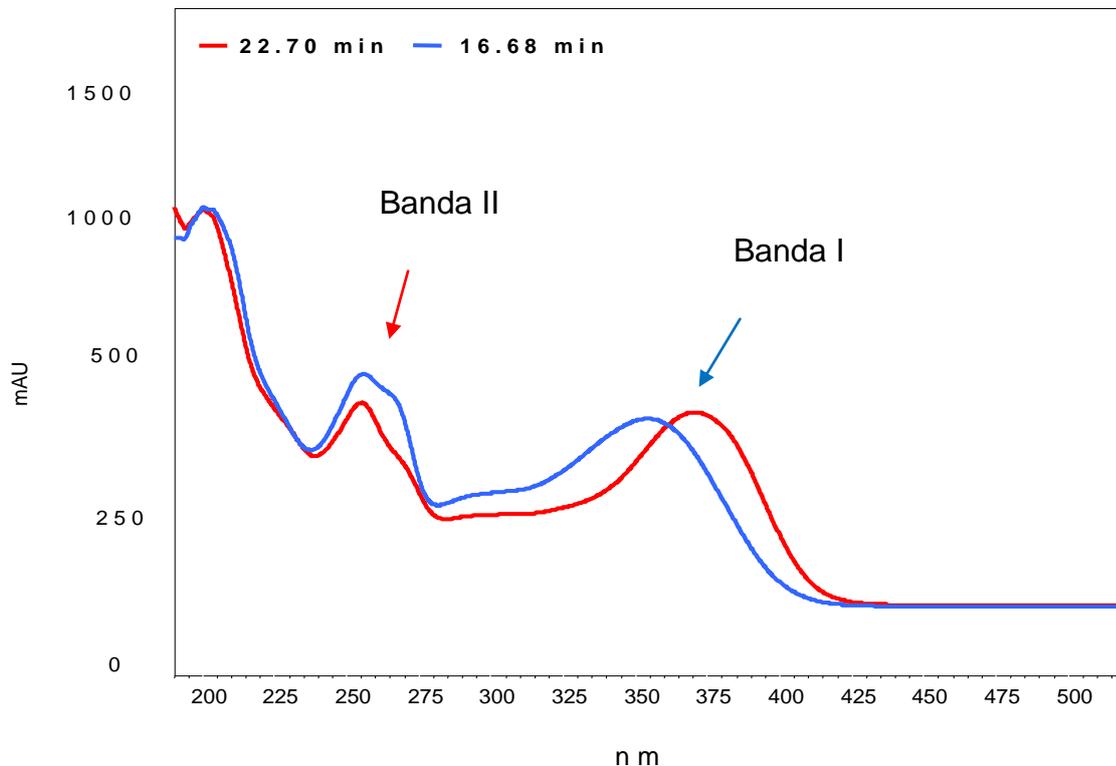


Figura 35: Espectros de Ultravioleta dos picos de tempo de retenção (TR) igual a 16,683 minutos, correspondente ao pico 1 (azul) indicativo da presença de rutina; 22,70 minutos, correspondente ao pico 2 (vermelho) indicativo da presença de quercetina pela co-cromatografia.

Tendo em vista a existência dos picos correspondentes aos flavonóides rutina e quercetina na fração acetato de etila e sua subfrações oriundas da polpa dos frutos de *A. muricata* L. (Figuras 29, 30 e 31), avaliou-se a representatividade dessas substâncias nas frações, sendo que a rutina se mostrou majoritária em relação à quercetina.

Assim, a partir da elaboração de uma curva padrão da rutina e da quercetina (descrita no item 4.2, páginas 41 e 42) foi possível quantificar a concentração dos flavonóides presentes nas amostras, sendo os resultados obtidos mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Quantificação dos flavonóides presentes nas frações da polpa dos frutos de *A. muricata* L.

TR dos Flavonóides		Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )		% p/p		
Frações	Rutina	Quercetina	Rutina	Quercetina	Rutina	Quercetina
FACeT	16,523	–	0,103	–	1,12	–
F1	16,352	–	0,080	–	0,87	–
F2	16,853	22,997	0,591	0,021	6,43	2,90

A FB foi submetida a um fracionamento (Figura 21, item 4.2.2, página 45) em coluna cromatográfica aberta em fase inversa RP-2, no qual se obteve três subfrações, sendo que estas foram unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado por CCD, a saber:

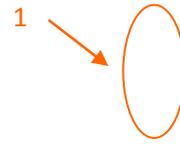
- Subfração F4: porção eluída da coluna com 100 % de água;
- Subfração F5: porção eluída com 50 % água e 50 % metanol;
- Subfração F6: porção eluída com 100 % metanol.

A subfração F6 apresentou 2 fases imiscíveis (F6a e F6b). Assim, com o intuito de direcionar o processo de fracionamento foi realizada a CLAE para estas amostras, a qual indicou ser a F6b a mais promissora, como mostra o cromatograma na figura 36.

Observa-se que no cromatograma 9 (Figura 36) que a F6b possui características pouco polares (eluída em 100% de metanol) e por CLAE, após 47 minutos, o eluente na coluna cromatográfica está torna de 100 % de acetonitrila (item 4.2 página 40, Tabela 3). Contudo, é nesta subfração que se encontra o pico majoritário da subfração, com tempo de retenção em 47,787 minutos (seta 1).

Em relação ao pico observado no tempo de retenção de 55,957, o espectro de ultravioleta indica ser, possivelmente algum ruído ou sujeira.

FB6



FB6

Figura 36: Cromatograma 9, perfil químico da amostra F6b avaliado por CLAE. Seta 1: Pico majoritário.

## 5.2 Isolamento da Substância

Com o objetivo de isolar a substância evidenciada pelo cromatograma 9, a F6b, por ter massa suficiente e possuir um pico bastante concentrado, foi fracionada em coluna cromatográfica aberta em Sephadex LH-20 (conforme indicado na Figura 21, item 4.2.2, página 45), obtendo-se três subfrações, sendo que estas foram unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado por CCD, a saber:

- Subfração F6b1: porção eluída da coluna em 100% água;
- Subfração F6b2: porção eluída em 50% água e 50% MeOH;
- Subfração F6b3: porção eluída com 100 % MeOH.

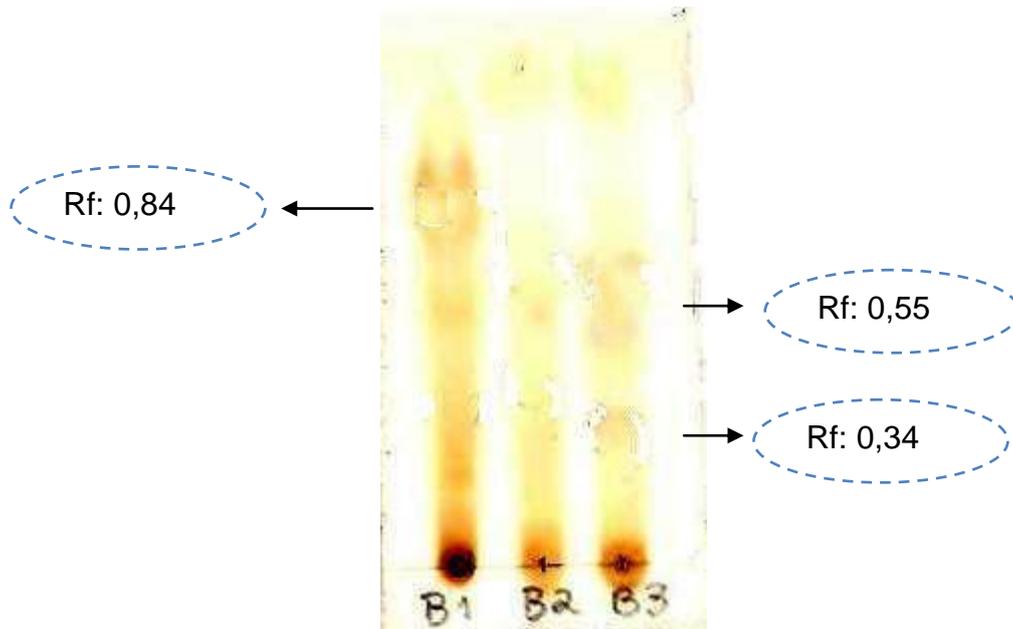


Figura 37: Cromatograma das subfrações F6b1, F6b2 e F6b3 realizado em CCD, mostrando as manchas majoritária. Fase móvel: butanol: ácido acético: água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.

De acordo com a CCD (Figura 37) realizada logo após fracionamento (Sephadex LH-20), notou-se que as manchas de interesse se concentravam nessas três últimas subfrações (F6b1, F6b2 e F6b3), sendo que F6b2 e F6b3 apresentaram um perfil cromatográfico muito semelhante e F6b1 mostrou-se praticamente purificada por CCD (Figura 38), com Rf de 0,84. As subfrações F6b2 e F6b3 apresentaram cada uma manchas com Rf de 0,34, de característica mais polar, e outra mancha com Rf de 0,55 de polaridade intermediária, para o sistema de solventes utilizado.

De acordo com a CCD, mostrada na figura 38, a mancha característica para a substância isolada é muito pronunciada, e possui Rf de 0,84. Esta mancha quando submetida a revelação sob luz UV (332 nm) apresenta coloração esverdeada.

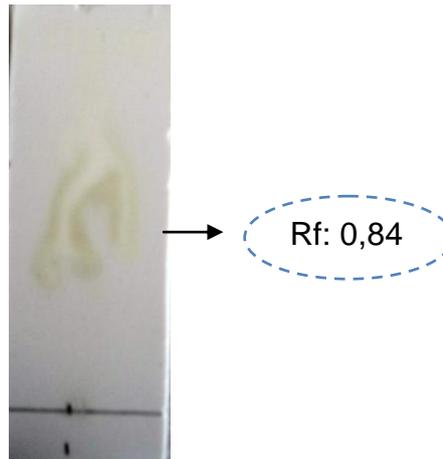


Figura 38: Cromatograma da subfração F6b1 realizado em CCD, mostrando a mancha da substância isolada. Fase móvel: butanol: ácido acético: água (8:1:1) e revelado com sulfato cérico.

De acordo com a CLAE (Figura 39), esta substância isolada foi codificada como G1 e apresenta um único pico com tempo de retenção em torno de 47 minutos.

Figura 39: Cromatograma 10, perfil químico da substância isolada, avaliado por CLAE.

Observa-se que a substância isolada absorve apenas no comprimento de onda de 254 nm, no tempo de retenção de 47,723 minutos com área de 7.626.742.

O espectro de UV para este pico (Figura 40) revela uma banda em aproximadamente 225 e outra em 275 nm, o que em tese parecem estar presentes em moléculas aromáticas (275 nm) e em carbonilas conjugadas (225 nm).

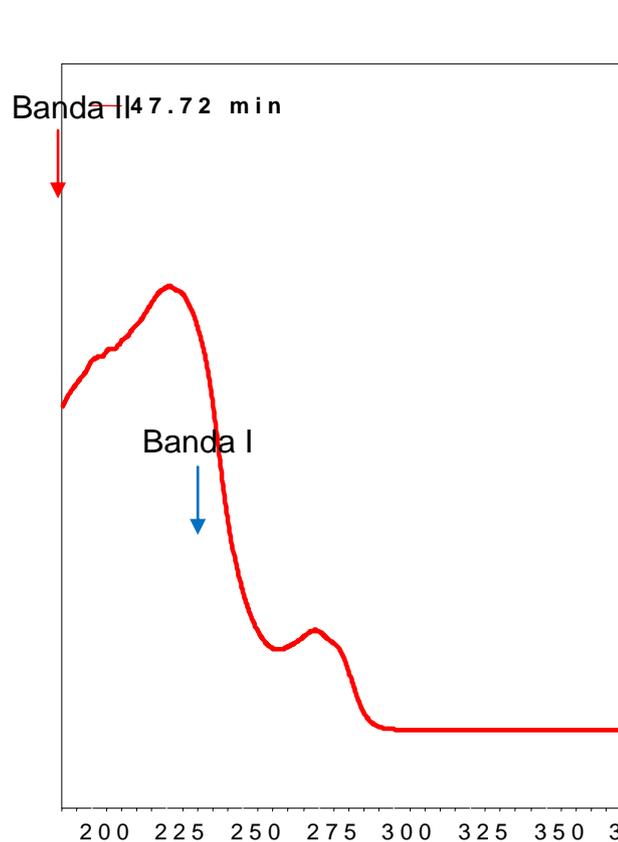


Figura 40: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 47,72 minutos, correspondente à substância isolada G1.

Desta forma, observa-se no cromatograma mostrado para a F6b que a purificação no sentido de se isolar uma molécula foi eficiente, pois se obteve uma substância isolada.

### 5.3 Elucidação Estrutural da Substância G-1

#### 5.3.1 Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) identifica os grupos funcionais presentes na molécula e envolve a interação da molécula com a radiação eletromagnética (McMurry, 2005).

No espectro da substância G1 (Figura 41) destacam-se nove picos bem pronunciados (Tabela 9). Observa-se uma banda de absorção de aproximadamente  $1726,36\text{ cm}^{-1}$ . Segundo Silverstein e Webster (1998), a absorção na região entre  $1850\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$  é indicativa do estiramento da carbonila alusivo a deformação axial de C - O, sendo esta uma carbonila de éster (pico de  $1273,07\text{ cm}^{-1}$ ) do sistema aromático (região entre  $3000\text{ cm}^{-1}$  e  $2500\text{ cm}^{-1}$ ).

Os sinais em  $2958,93\text{ cm}^{-1}$ ,  $2928,07\text{ cm}^{-1}$  e  $2872,13\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos à deformação axial do H do anel aromático e a  $\text{CH}_3$  alcanos alifáticos. A região entre  $1450\text{ cm}^{-1}$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$ , onde se pode observar o pico de intensidade média  $1462,11\text{ cm}^{-1}$ , corresponde ao estiramento da ligação C = C (Silverstein e Webster, 1998).

O espectro de IV também apresenta um pico em  $762,63\text{ cm}^{-1}$ , o qual corresponde ao C-H aromático monosubstituído. Além disso, observa-se também bandas de absorção em  $1122,62\text{ cm}^{-1}$  e  $1072,47\text{ cm}^{-1}$  que são alusivas à deformação angular de C-H.

Tabela 9: Bandas e suas respectivas intensidades observadas no infravermelho.

<b>Nº</b>	<b>Bandas (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Intensidade (% de Transmitância)</b>
1	742,63	85,534 <i>m</i>
2	1072,47	82,195 <i>m</i>
3	1122,62	80,880 <i>m</i>
4	1273,07	76,267 <i>F</i>
5	1462,11	86,309 <i>m</i>
6	1726,36	73,958 <i>F</i>
7	2872,13	83,883 <i>m</i>
8	2928,07	79,692 <i>F</i>
9	2958,93	79,321 <i>F</i>

*F*= forte, *m* = médio, *f* = fraco.

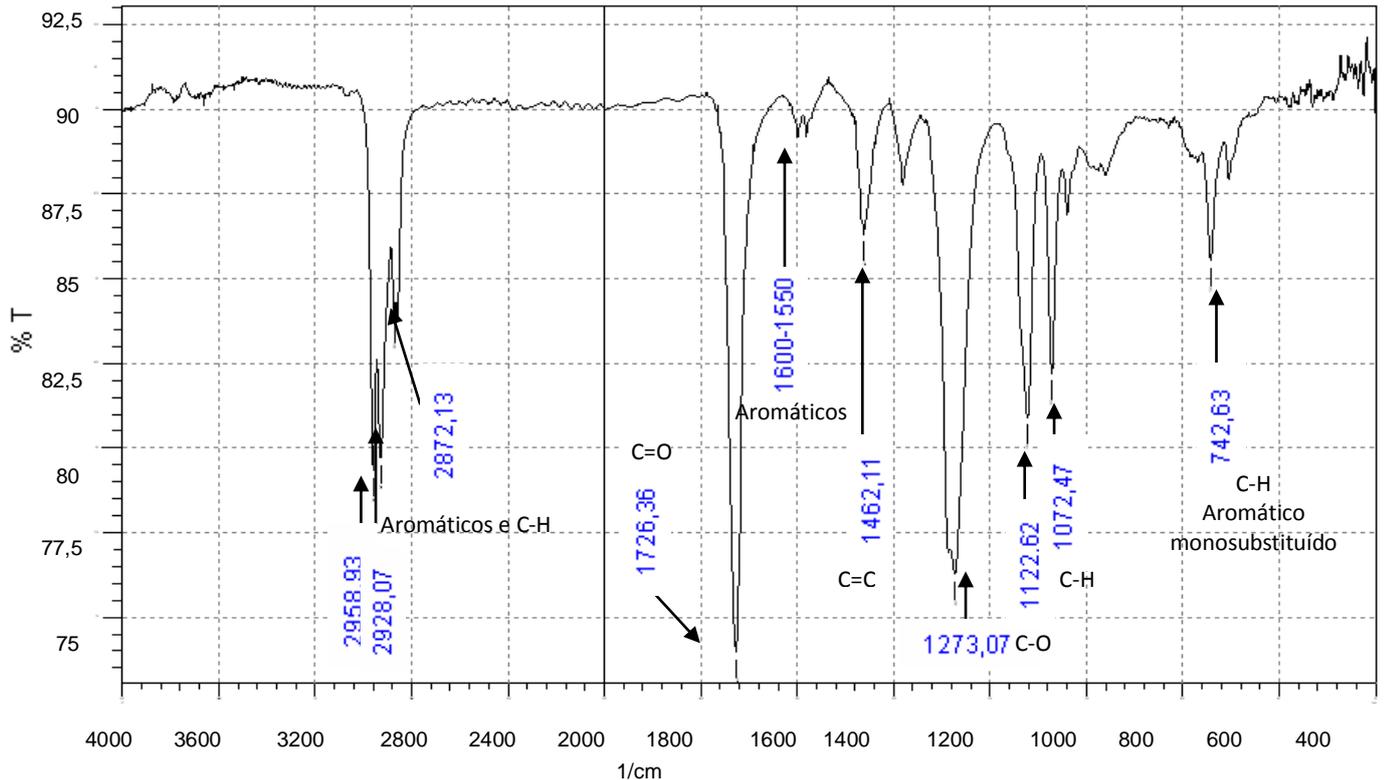


Figura 41: Espectro de Infravermelho da substância G1.

De acordo com McMurry (2005), os compostos aromáticos têm uma absorção de estiramento fraca na faixa de  $1600$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$  e no espectro de G-1 é possível observar os picos referentes a essa região, sendo esta mais uma evidência de G-1 ser uma substância aromática.

Esses dados corroboram com os sinais encontrados na literatura (dos Santos, 2008; McMurry, 2005; Carvalho et al. 1998).

### 5.3.2 Técnicas Monodimensionais

A purificação da subfração F6b conduziu ao isolamento da substância G-1, a qual foi submetida à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , e os dados estão listados para ambos os sinais na Tabela 10 e 11 (página 74 e 76, respectivamente).

### 5.3.2.1 RMN $^1\text{H}$

Primeiramente, analisou-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância G-1 obtida em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz) (Figura 42). Este espectro apresentou sinais ( $\delta_{\text{H}}$ ) correspondentes aos grupos metilênicos, metila e aromático.

Na região do espectro correspondente aos núcleos aromáticos (6,00 - 8,00 ppm), pode-se observar a presença de dois sinais, sendo correspondentes a região do anel (7,50 e 7,70 ppm)(Mabry et al., 1970). Os sinais para os hidrogênios em 7,70 ppm correspondem aos sinais de H-2 e H-6, bem como o sinal em 7,50 se refere aos hidrogênios H-3, H-4 e H-5.

A figura 43 mostra a expansão da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos, no qual se observa dois duplos dupletos (dd) na região do anel, sendo os sinais em 7,50 ppm (H-3, H-4, H-5) e em 7,70 ppm (H-2, H-6) aproximadamente, com constante de acoplamento ( $j$ ) de 3,4; 6,0 Hz e de 3,4; 6,0 Hz, respectivamente, indicando acoplamento em *orto* e *meta* entre esses hidrogênios.

Na ampliação da região do sinal de 4,20 ppm (H-8) observa-se um duplo duplo com constante de acoplamento de ( $j$ ) de = 5,8; 8,7 Hz, sendo a região do espectro entre 4,0 e 4,5 ppm correspondente ao grupo éster aromático (Figura 44).

Na região do espectro correspondente ao deslocamento químico entre 0,8 e 1,6 ppm, referentes a hidrogênios de grupos metílicos, alguns sinais foram observados e se pode destacar para essa porção alifática da molécula a presença de um multipeto nos sinais em 1,34 ppm (H-11) e 1,30 ppm (H12 e H-13), um outro multipeto nos sinais em torno de 0,87 ppm (H-14) e 0,91 ppm (H-15), e um sinal característico de hidrogênio ligado a carbono em 1,42 ppm (H-10; m)(Argondizo et al., 2007).

Os sinais de  $^1\text{H}$  encontrados (Tabela 10) foram comparados com os dados da literatura (Tabela 13, página 84), porém não permitiram identificar a estrutura (Argondizo et al., 2007; Araújo e Chaves, 2005; Correia, 2002).

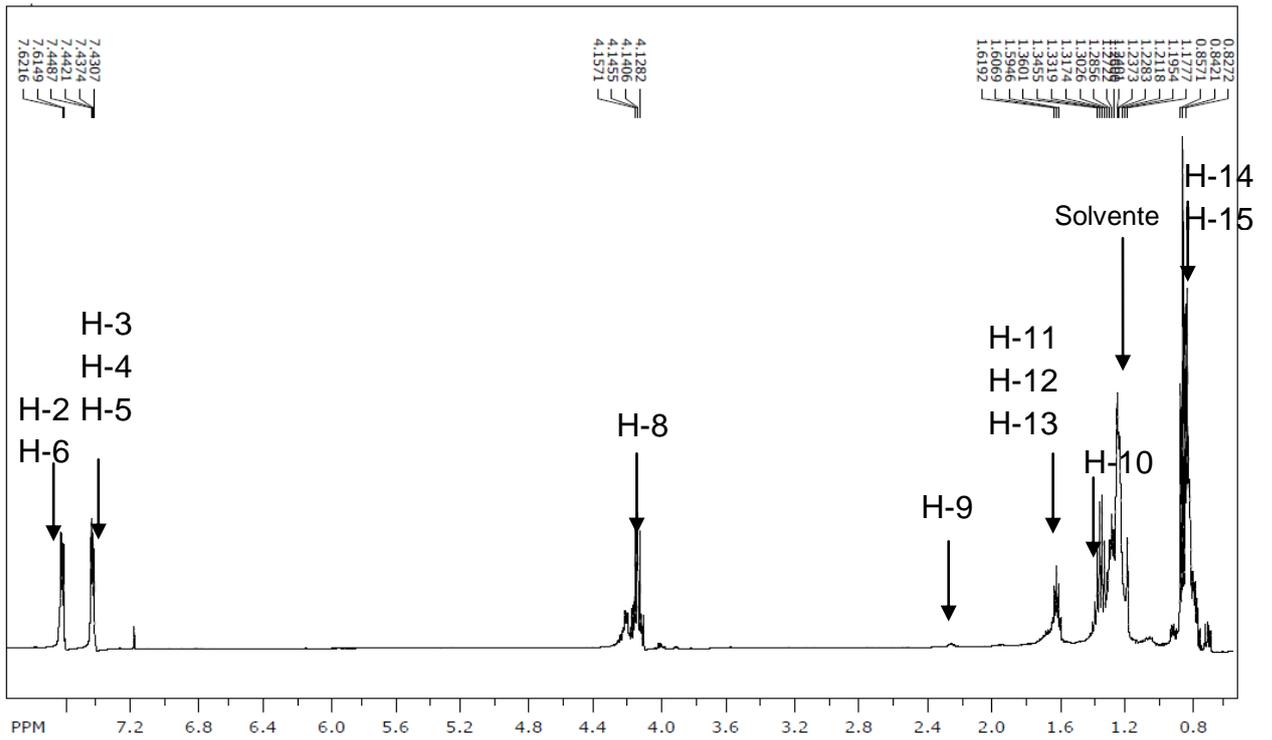


Figura 42: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de G-1 (400 MHz).

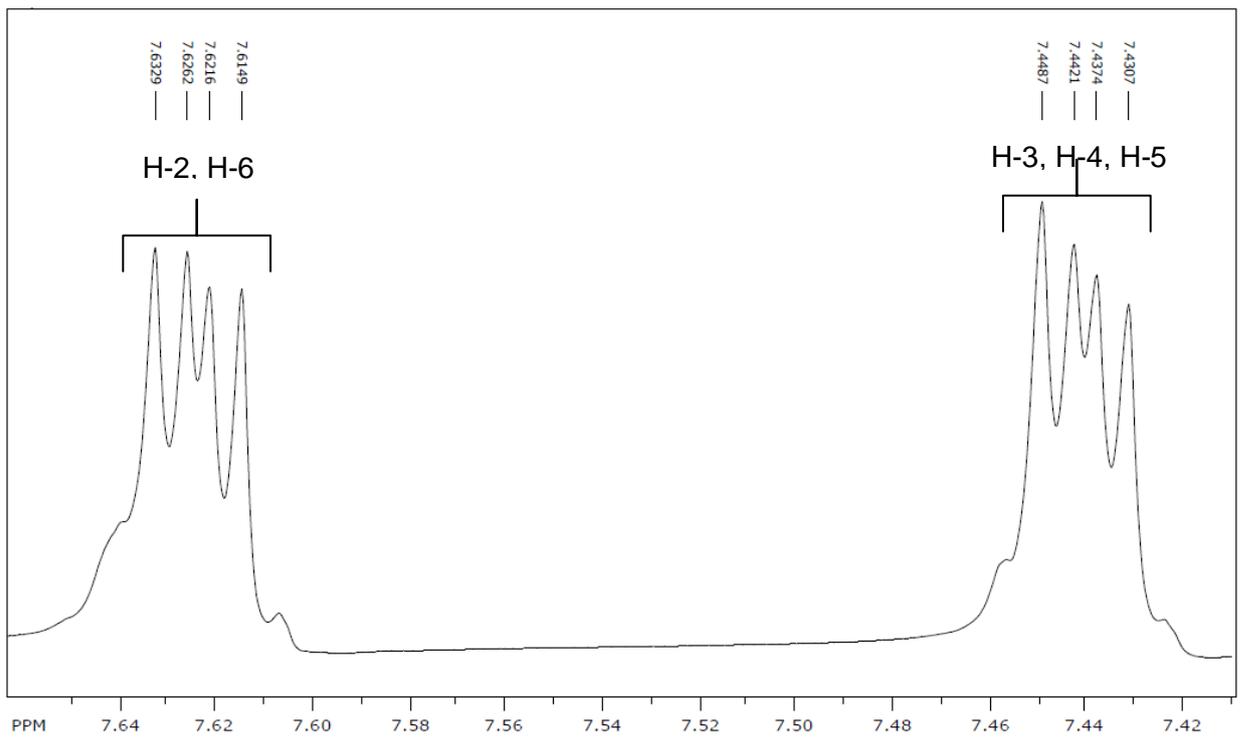


Figura 43: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de G-1 (400 MHz), com a expansão da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos.



### 5.3.1.2 RMN $^{13}\text{C}$

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  forneceu 15 sinais (Figura 45). O sinal em 130,9 corresponde aos carbonos C-2 e C-6, e o sinal em 128,8 corresponde aos carbonos C-3, C-4 e C-5, sendo estes sinais referentes a carbonos de compostos aromáticos, sugerindo a existência de um grupo aromático monosubstituído (Marchese, 2009; Argondizo et al. 2007).

Observa-se um sinal mais protegido do espectro, em 10,9 ppm, o que indica a presença de um metil em C-15.

A ocorrência de um grupo éster foi indicada pelo sinal mais desprotegido do espectro listado em 167,7 ppm, atribuído ao carbono carbonílico e que corresponde ao C-7 (McMurry, 2005; Argondizo et al., 2007).

Os sinais de 68,3 ppm, 23,7 ppm e 30,2 ppm foram atribuídos aos carbonos C-8, C-10 e C-11, respectivamente. O carbono 9 está ligado a um metil e seu sinal está em 38,7 ppm e o carbono 12 refere-se ao  $\text{CH}_2$  (Argondizo et al., 2007).

O sinal 14,0 ppm indica um metil simples terminal e é atribuído ao C-14. Por sua vez, o carbono 1 do anel encontra-se ligado ao éster e o carbono 13 está ligado a um outro grupo metil e aparece na região de 22,9 ppm. A Tabela 11 mostra os sinais encontrados para G-1 e a Tabela 14 compara os sinais de  $^{13}\text{C}$  do espectro obtido da amostra G-1 com os sinais encontrados na literatura (Marchese, 2009; Argondizo et al. 2007; Araújo e Chaves, 2005; Correia, 2002).



O espectro obtido pela técnica de APT (Figura 46) corrobora com as indicações das técnicas de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ . Contudo, algumas variações nos sinais são observadas pelo fato do solvente utilizado nas análises de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  ter sido o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), enquanto que na análise de APT o solvente empregado foi o dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO-d}_6$ ) deuterado.

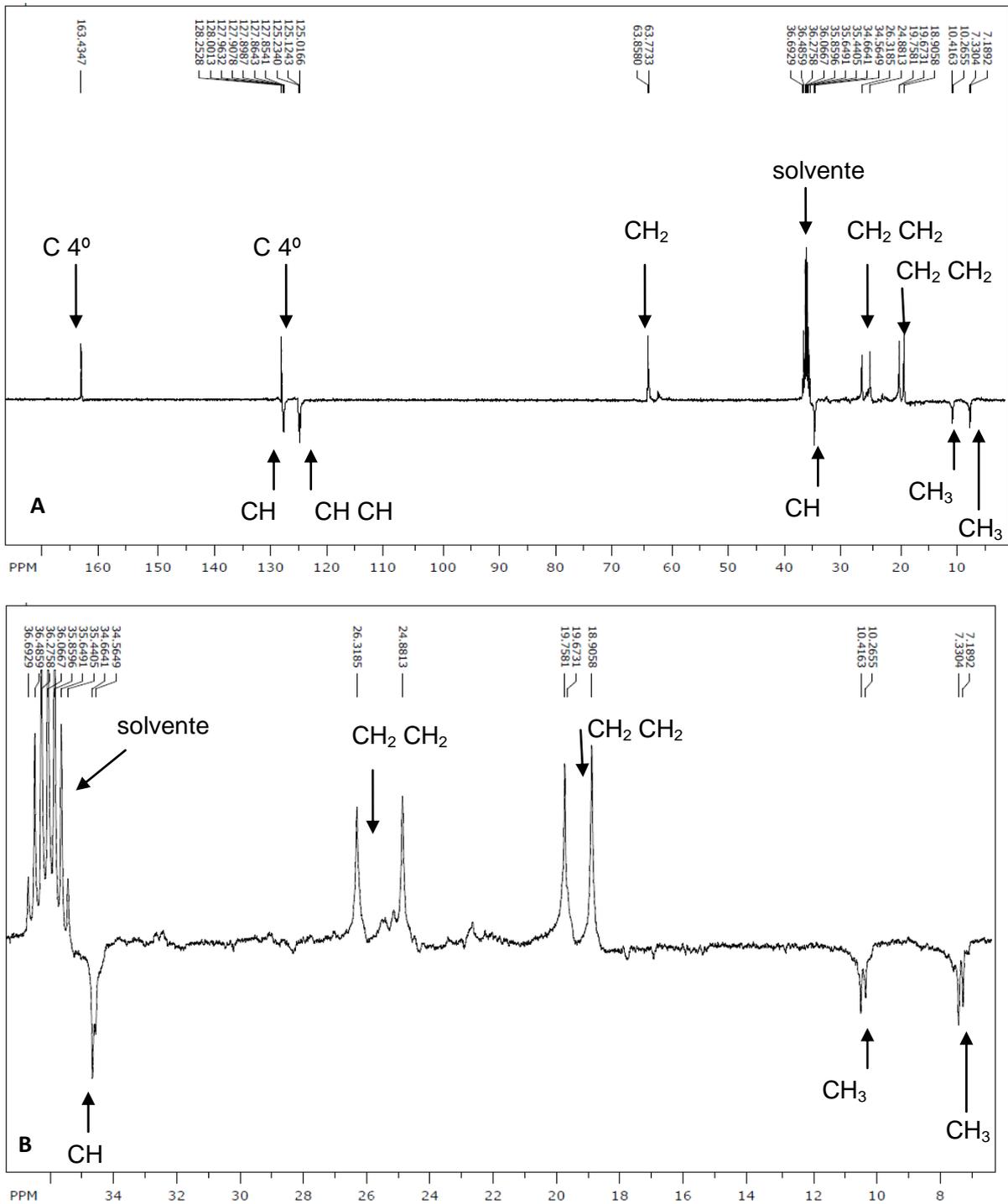


Figura 46: A) Espectro de RMN APT de G-1 (400 MHz); B) Expansão da região dos sinais.

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  sugerem que a molécula se trata de um éster aromático, o benzoato-2-metil-heptila. Entretanto, para confirmar essa proposta estrutural foram empregadas técnicas bidimensionais.

### 5.3.3 Técnicas Bidimensionais

#### 5.3.3.1 COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$

A partir da análise do COSY foi possível identificar a correlação entre os hidrogênios vizinhos, mostrando a sua correlação. A figura 47 mostra o espectro de COSY  $^1\text{H}$  - $^1\text{H}$  com essas correlações.

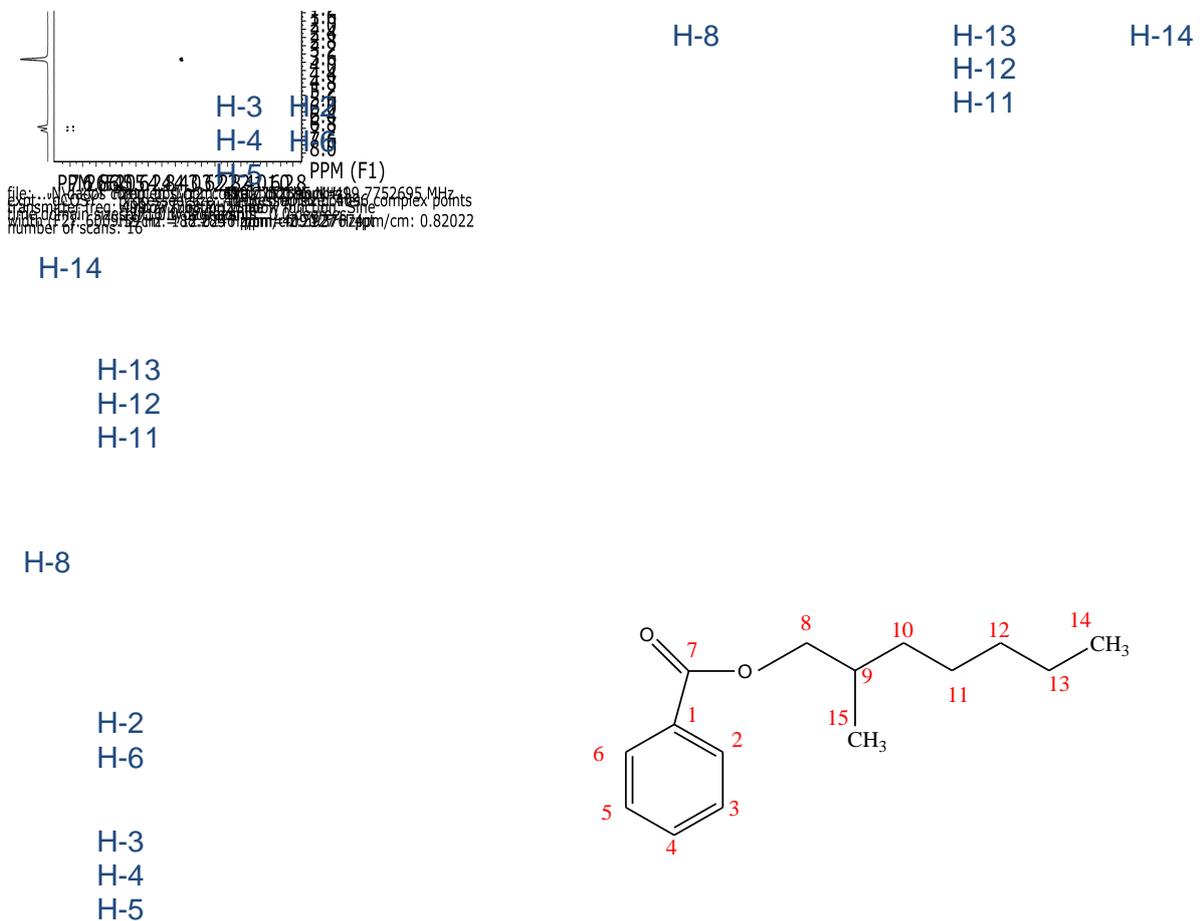


Figura 47: Espectro de RMN 2D- COSY para G-1.

### 5.3.2.2 HMQC

Com base nos dados do espectro de HMQC (Figuras 48, 49 e 50) foi possível estabelecer a correlação direta entre os núcleos de  $^1\text{H}$  com os núcleos de  $^{13}\text{C}$  a eles diretamente ligados. Dessa forma, através da avaliação dos resultados desta análise foi possível inferir que os valores dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos da substância isolada possuíam um hidrogênio a eles ligado.

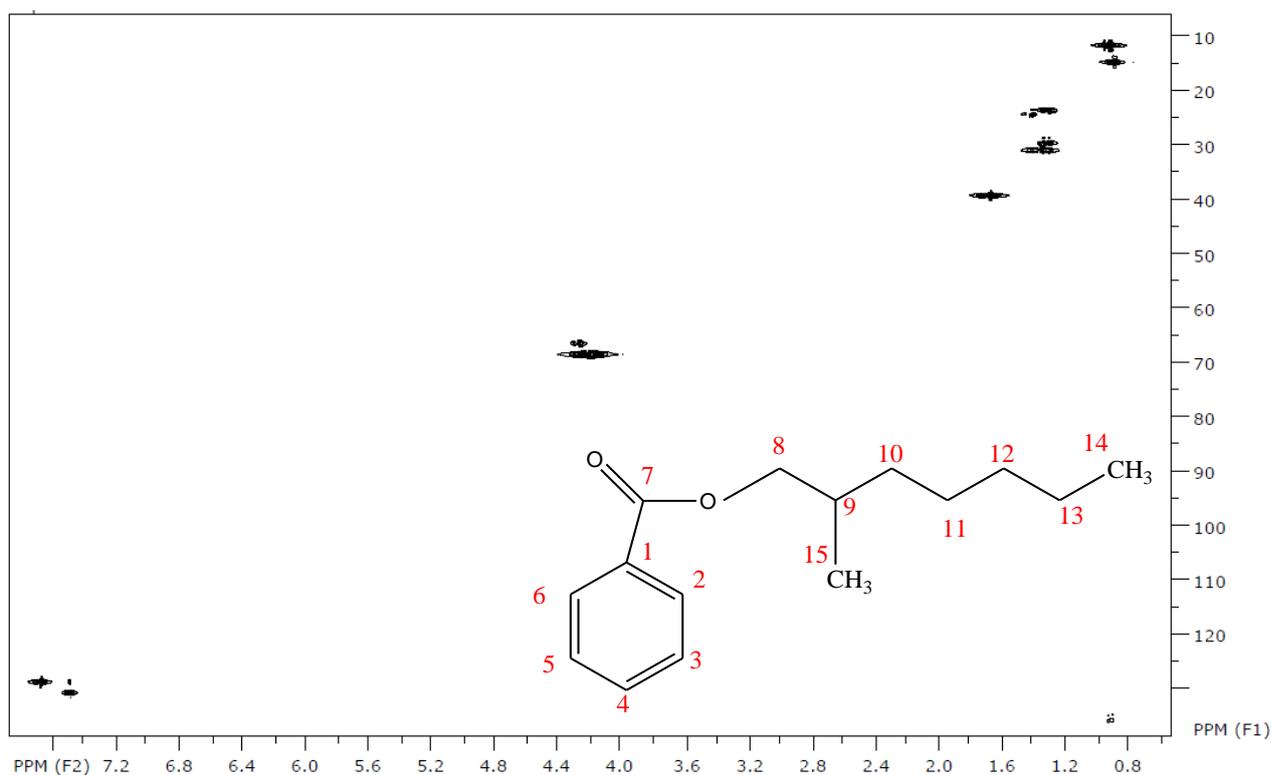


Figura 48: Espectro de RMN-2D HMQC para G-1.

Essas correlações e deslocamentos podem ser observadas na Figuras 49 e 50, a qual mostra em expansão o espectro de HMQC para G-1.

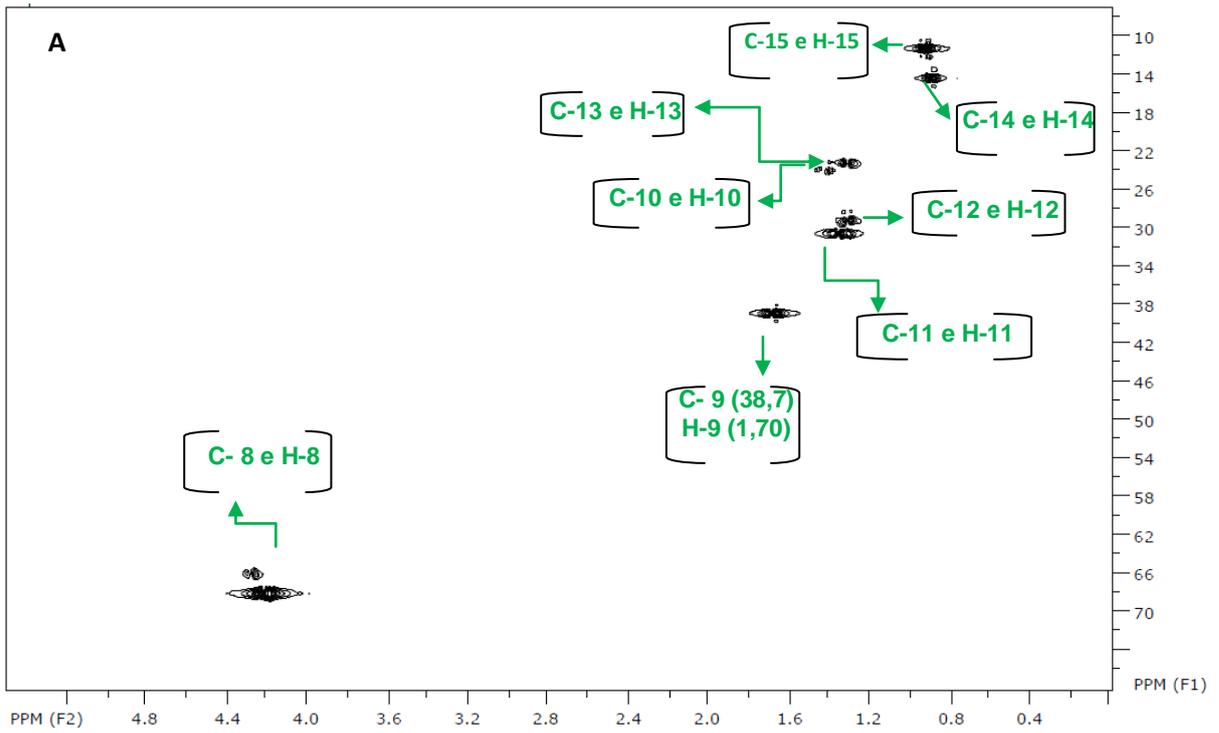


Figura 49: Expansão do espectro de RMN -2D HMQC para G-1 (400 MHz).

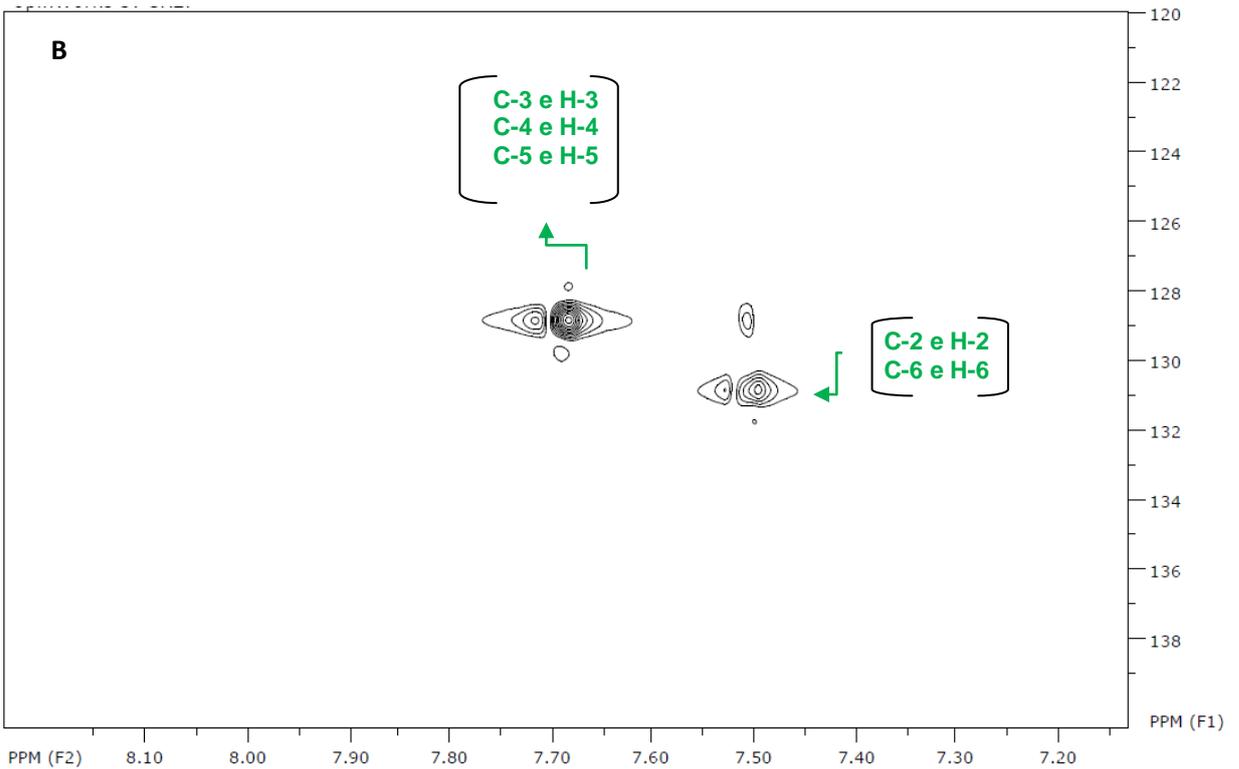


Figura 50: Expansão do espectro de RMN -2D HMQC para G-1 (400 MHz) para a região de 120 a 138 ppm.

### 5.3.2.3 HMBC

Por meio da análise das correlações a longa distância  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Figura 51) foi possível detectar a correlação entre os núcleos de  $^1\text{H}$  e os núcleos de  $^{13}\text{C}$ , a duas ou mais ligações de distância. Assim, partindo da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar a correlação entre os sinais de  $^1\text{H}$  com  $^{13}\text{C}$  conforme Tabela 12.

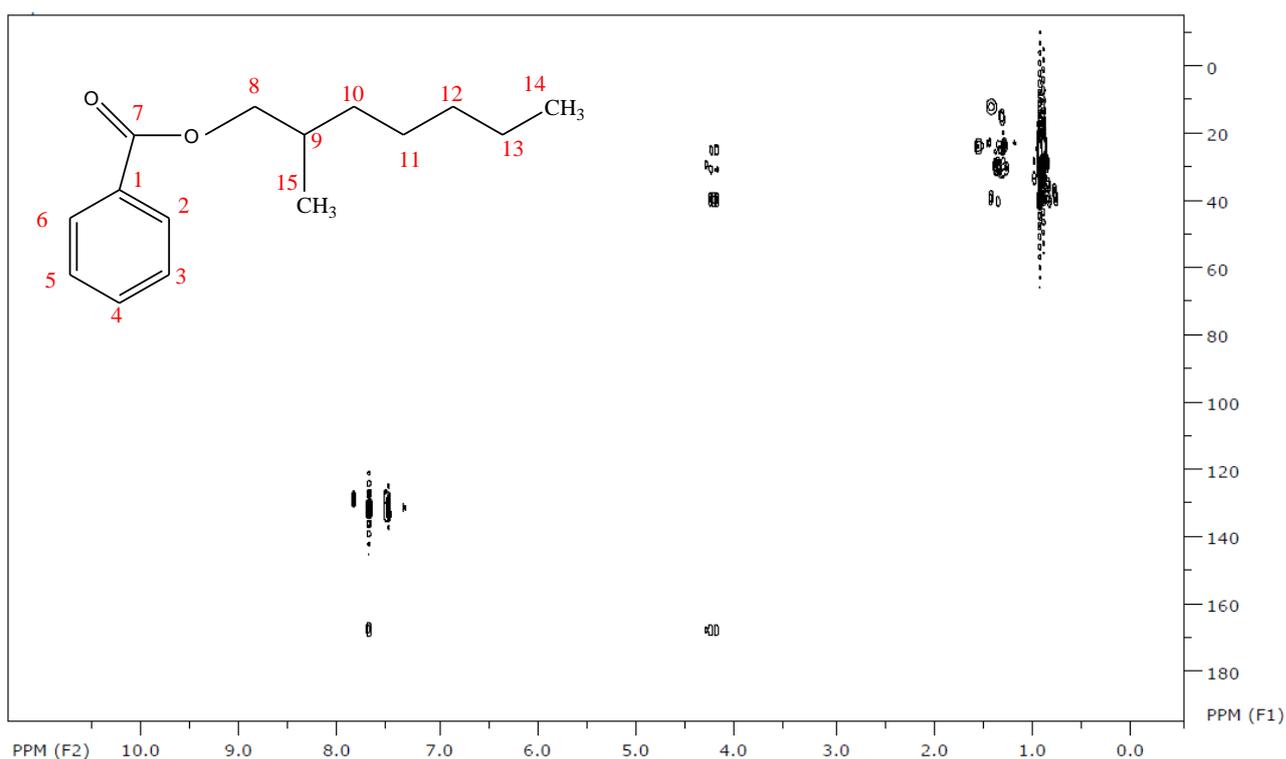


Figura 51: Espectro de RMN-2D HMBC para G-1(400 MHz).

A ampliação do espectro de RMN-2D HMBC para G-1(Figura 52, 53 e 54) possibilita uma melhor visualização das regiões onde se localizam as correlações.

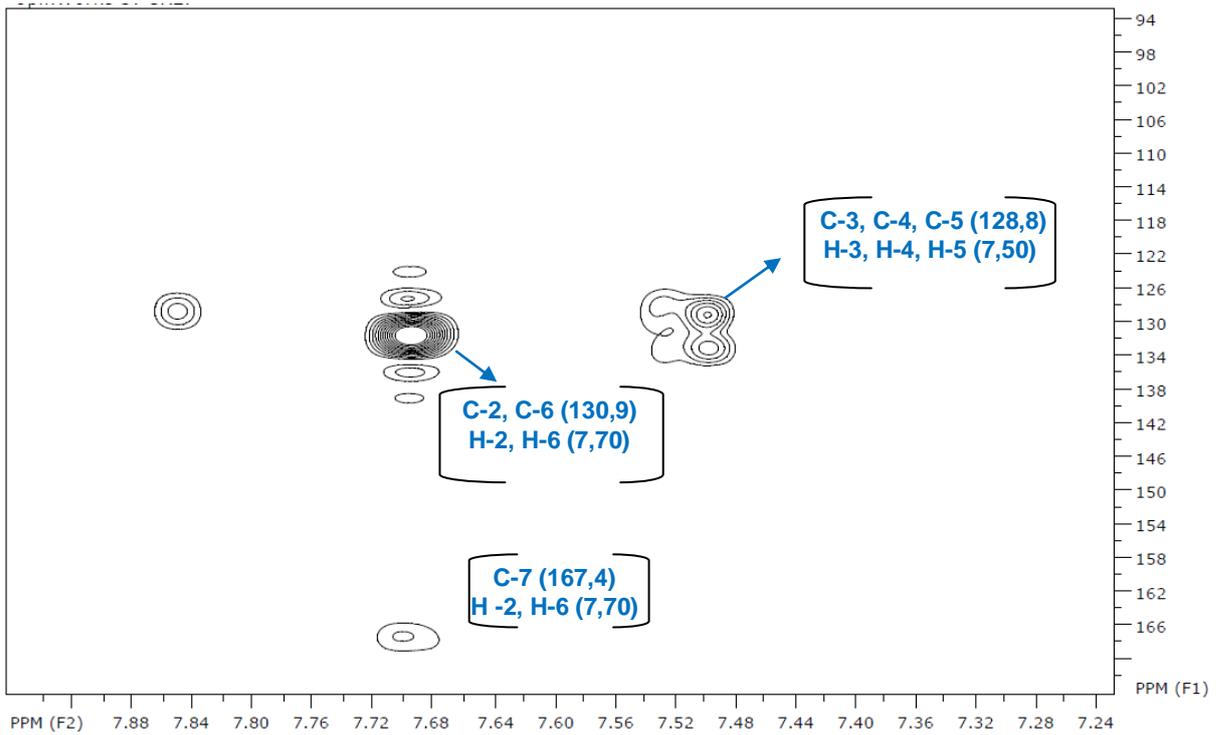


Figura 52: Ampliação do espectro de RMN-2D HMBC para G-1(400 MHz).

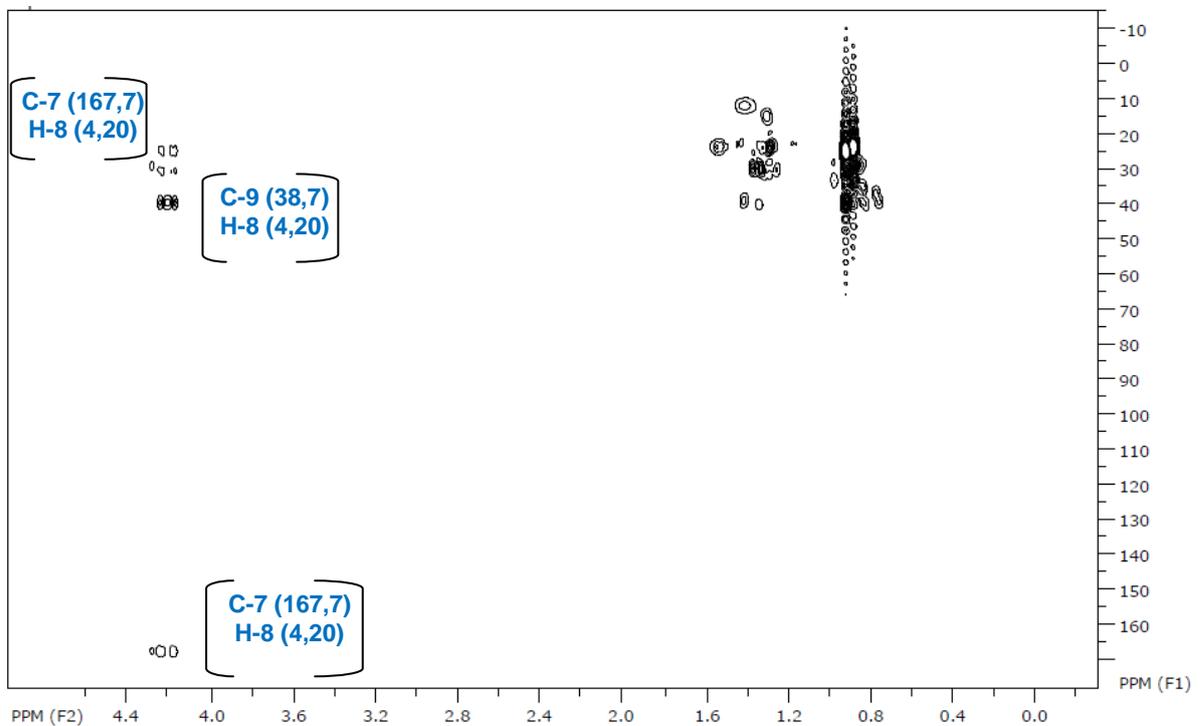


Figura 53: Ampliação do espectro de RMN-2D HMBC para G-1(400 MHz) para a região de -10 a 160 (F1) ppm.

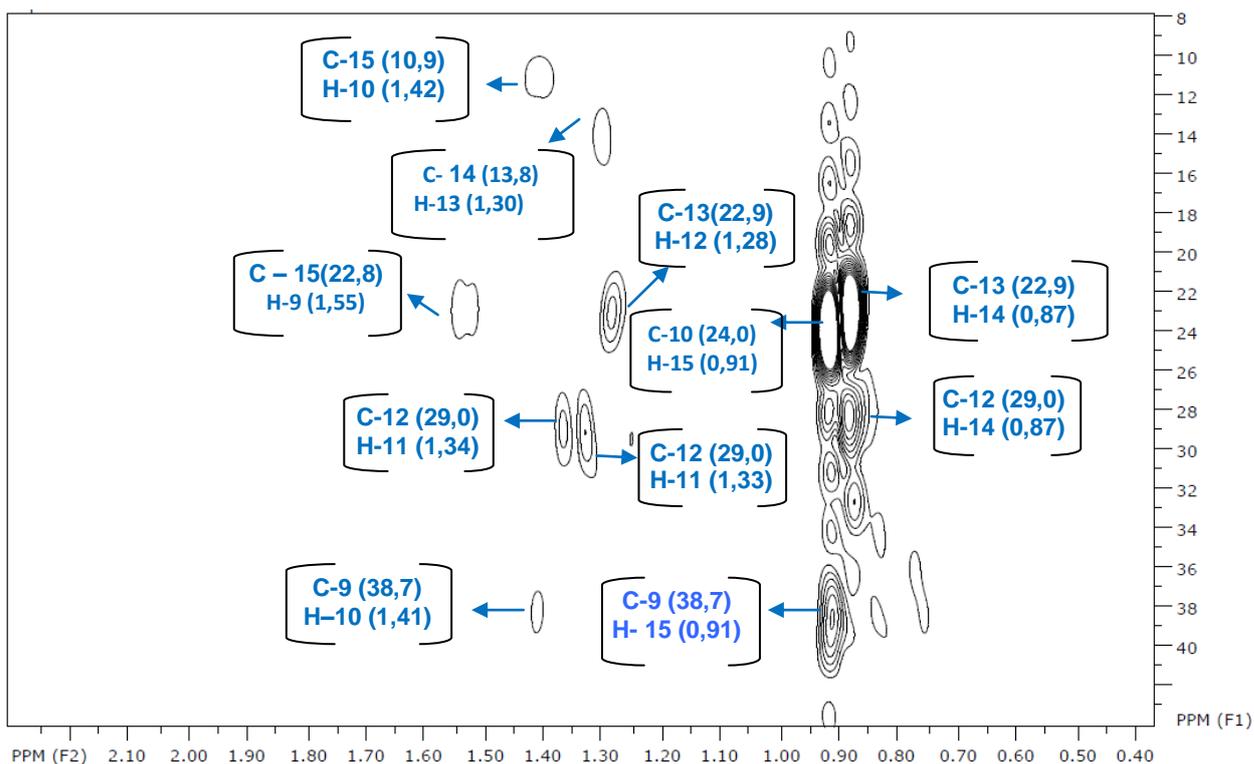


Figura 54: Ampliação do espectro de RMN-2D HMBC para G-1(400 MHz) para a região de 8 a 40 ppm (F1).

Assim, a Tabela 12 apresenta um resumo dos dados obtidos para a substância G-1 (benzoato-2-metil-heptila) a partir das análises realizadas pela técnica de RMN em experimentos mono e bidimensionais.

Desta forma, este é o primeiro relato para essa substância proveniente de uma espécie vegetal. A partir de buscas na literatura foi possível verificar a existência do benzoato de butila, do benzoato de etila e do benzoato de 2-propenila (Narain et al., 2004), bem como do metil benzoato ou benzoato de metila, o qual é um éster derivado do ácido benzóico e metanol (Ritter, 2005).

A literatura também relata a identificação de ácidos aromáticos derivados do benzoato como, por exemplo, os listados na Tabela 13.

Tabela 12: Sinais listados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância G-1.

N° C	HMQC		HMBC (ppm)
	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	
1	4 <sup>a</sup>	132,4	-
2	7,70	130,9	C6, C2 (130,9) e C7 (167,7)
3	7,50	128,8	C3, C4, C5 (128,8) e C1(132,4)
4	7,50	128,8	-
5	7,50	128,8	C3, C4, C5 (128,8) e C1(132,4)
6	7,70	130,9	C2, C6 (130,9) e C7 (167,7)
7	4 <sup>a</sup>	167,7	-
8	4,20	68,3	C9 (38,7) e C7 (167,7)
9	1,70	38,7	C13 (22,9)
10	1,42	23,7	C15(10,9) e C9 (38,7)
11	1,34	30,2	C12 (29,0)
12	1,30	29,0	C13 (22,9) e C14 (13,8)
13	1,30	22,9	C14 (14,0) e C12 (29,0)
14	0,87	14,0	C13 (22,9) e C12 (29,0)
15	0,91	10,9	C10 (24,0) e C9 (38,7)

Contudo, a estrutura mais próxima ao benzoato-2-metil-heptila relatada na literatura é o benzoato-1-metil-heptila (Figura 55).

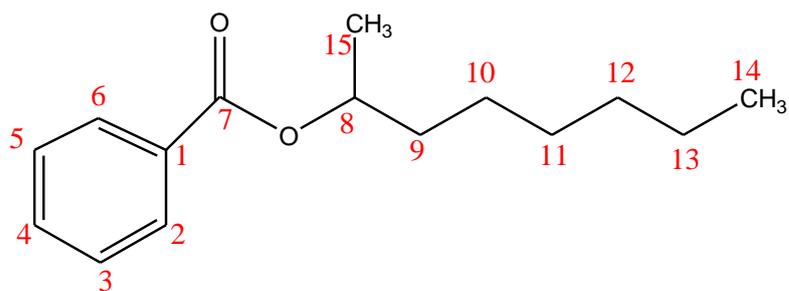


Figura 55: Estrutura química do benzoato-1-metil-heptila.

Tabela 13: Alguns ácidos aromáticos derivados do benzoato relatados na literatura.

Ácidos Aromáticos	Literatura
benzoato-6-metil-heptila	(Merchese, 2009)
2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila	
4-hidroxi-3,5-bis(3'-metil-2'-butenil) benzoato de metila	
o 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila	
(2-metóxi-6-(8-hidróxi-octanil)-benzoato de metila	(dos Santos, 2008)
(2-metóxi-6-(7-oxo-hepil)-benzoato de metila	
(2-(8-hidróxi-undec-10-enil)-metóxi-benzoato de metila	
(2-metóxi-6-(8-metóxi-undec-10-enil) benzoato de metila	
(2-(10-hidróxi-8-metóxi-undecil)-6-metóxi-benzoato de metila	
4,9-dimetóxi-7-metil-7,8,9,10,11,12,13,14,15,16-decahidro-6-oxa-benzociclotetradecen-5-ona	
2(7-[1,3]ditiano-2yl-heptil)-6-metóxi-benzoato de metila	(Gonzaga, 2008)
2-metóxi-6-pentacil benzoato de metila	
2-acetil-6-pentadecilbenzoato de metila	
4-hidroxibenzoato de metila	(Ritter, 2005)

Tendo em vista que as substâncias benzoato-1-metil-heptila e benzoato-2-metil-heptila (G-1) são isômeros de posição, se pode comparar os dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  para G1 com aqueles existentes na literatura para seu isômero, como pode ser observado na Tabela 14.

Tabela 14: Comparação dos sinais de G-1 e os sinais encontrados na literatura.

	$\delta_H$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_C$
	G-1	Literatura*	G-1	Literatura*
	(CDCl <sub>3</sub> )	(CDCl <sub>3</sub> )	(CDCl <sub>3</sub> )	(CDCl <sub>3</sub> )
1	----	----	----	----
2	7,70	7,69	130,9	130,4
3	7,50	7,52	128,8	128,7
4	7,50	7,52	128,8	128,7
5	7,50	7,52	128,8	128,7
6	7,70	7,69	130,9	129,9
7	----	----	167,7	167,2
8	4,20	4,20	68,3	67,6
9	1,70	1,78	38,7	38,7
10	1,42	1,40	23,7	24,6
11	1,34	1,31	30,2	29,6
12	1,30	1,31	29,0	29,5
13	1,30	1,31	22,9	25,8
14	0,87	0,83	14,0	14,1
15	0,91	0,90	10,9	11,7

Marchese, 2009; dos Santos, 2008; Argondizo et al., 2007;  
Araújo e Chaves, 2005; Raya, 2005; Ritter, 2005; Correia, 2002.

Um fator determinante para a posição da metila (C-15) na posição 9 da molécula foi a técnica bidimensional HMBC (Figura 51), em que se observa a correlação do hidrogênio 9 (H-9) com o carbono 15 (C-15) e dos hidrogênios 15 com o carbono 9, conforme exemplificado na figura 56 .

Na técnica de HMQC (bidimensional) foi possível verificar a correlação direta entre o carbono 8 (C-8) e o grupo metilênico (CH<sub>2</sub>) em H-8. Assim, a correlação observada por HMBC do H-8 com o carbono 7 (C-7) (Figura 54) não deixa dúvidas sobre o posicionamento da metila (CH<sub>3</sub>) na posição 15 da molécula (Figura 56).

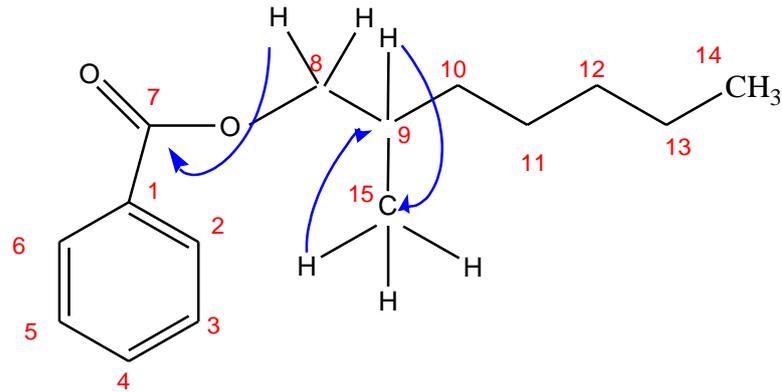


Figura 56: Correlações bidimensionais observadas por HMBC e HSQC.

Com base nos dados de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  aliados às técnicas bidimensionais foi possível confirmar a proposta da substância aromática benzoato-2-metil-heptila (Figura 57).

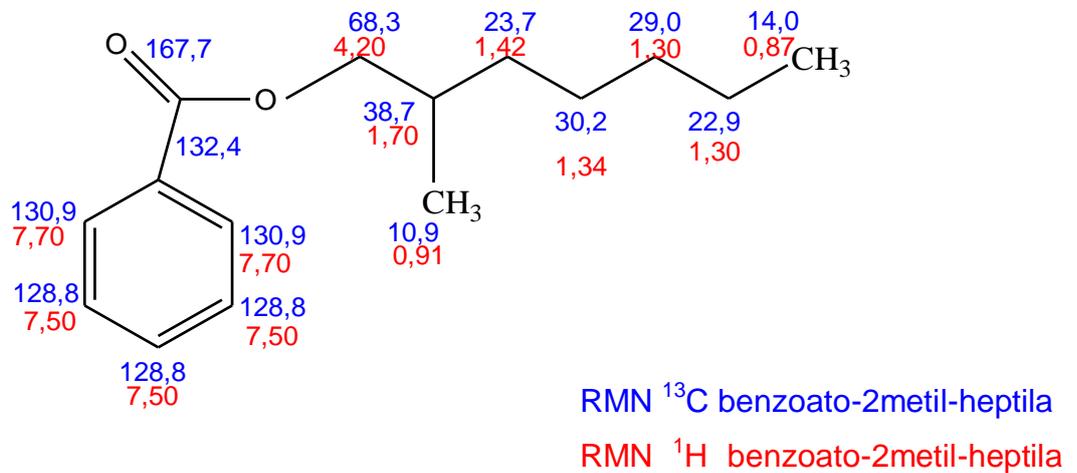


Figura 57: Estrutura do benzoato-2-metil-heptila (G-1).

A literatura relata que algumas espécies de *Annona* são aromáticas devido à presença de óleos essenciais e seus compostos aromáticos como, por exemplo, os

benzoatos. Das análises realizadas nesta família destaca-se se o isolamento dos óleos essenciais a partir de *Annona muricata* (Esquinca, 2005; Leboeuf et al. 1982).

## 5.5 Atividade Antioxidante

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Porém, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais. Assim, oxidantes são substâncias sintetizadas pelo metabolismo normal do organismo e, se não controlados, podem provocar danos extensivos (Roesler et al., 2007; Mccord, 1994).

O estresse oxidativo tem sido relacionado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas, doenças degenerativas como Alzheimer, bem como está envolvido no processo inflamatório. Além disso, o balanço entre o estresse oxidativo e as funções antioxidantes dos organismos vivos parece ter um papel na carcinogênese (Lachman et al., 2010; Shami e Moreira, 2004; Christen, 2000; Diaz et al., 1997).

Pesquisas clínicas e epidemiológicas apontam evidências de que antioxidantes fenólicos de frutas, cereais e vegetais são os principais fatores que contribuem para a significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos (Zhang et al., 2010; Spada et al., 2008). Assim, a ênfase na pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado nos últimos anos. Compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, ácidos aminados, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis (Oliveira et al., 2009; Angelo et al., 2007).

Nesse sentido, a capacidade de seqüestrar radicais livres em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) no sumo e frações foi escolhida por se tratar de uma metodologia simples, rápida e sensível. As substâncias antioxidantes presentes nas amostras 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 da amostra. As amostras foram avaliadas em concentrações de 1000 a 10 µg/ml, como mostra a figura 58.

Os resultados do sumo, das frações, das subfrações, da G-1 (substância isolada e caracterizada neste estudo) e dos padrões de referência submetidos ao

ensaio antioxidante são apresentados na Tabela 13. Vale ressaltar que os testes foram realizados em triplicata e em três concentrações distintas, sendo apresentadas aqui as médias aritméticas e o desvio padrão.

Os padrões empregados foram os flavonóides quercetina, rutina e apigenina, e o padrão comercial de estrutura fenólica, BHT (Butil-hidroxi-tolueno). Os flavonóides foram utilizados como padrões pelo seu efeito protetor nos sistemas biológicos, o qual é conferido à sua capacidade de transferência de elétrons dos radicais livres (Heim, 2002).

Segundo Ross e Kasum (2002), a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada pela sua estrutura, especialmente com a facilidade com que um átomo de hidrogênio a partir de uma hidroxila do anel aromático pode ser doado a um radical livre. Além disso, o potencial antioxidante também está relacionado com a polaridade, natureza e posição dos grupos constituintes na estrutura dos compostos fenólicos (Fabri, 2008).

Tabela 15: Atividade antioxidante do sumo, das frações, das subfrações, da G-1, dos padrões fenólicos (quercetina, rutina, apigenina) e do BHT.

Amostras	Concentrações		
	1000 µg/mL (%)	100 µg/mL (%)	10 µg/mL (%)
GS	91,2 ± 1,7	71,7 ± 2,7	43,4 ± 3,2
GSS	88,2 ± 2,2	59,3 ± 3,2	40,2 ± 1,9
FH	92,8 ± 1,7	48,9 ± 1,2	29,4 ± 1,8
FACeT	96,0 ± 1,0	54,2 ± 3,2	25,9 ± 1,1
F1	91,3 ± 0,6	25,2 ± 3,9	6,1 ± 1,3
F2	42,9 ± 2,4	83,7 ± 2,5	72,9 ± 3,9
F3	*	*	*
FB	97,0 ± 0,6	40,2 ± 2,2	21,7 ± 1,5
F4	84,1 ± 1,6	23,3 ± 0,5	0,8 ± 0,5
F5	71,5 ± 1,1	27,7 ± 2,4	4,9 ± 0,9
F6	65,9 ± 0,6	81,6 ± 2,7	24,5 ± 3,1
G-1	58,4 ± 5,3	14,2 ± 2,3	22,5 ± 3,0
Quercetina	95,4 ± 0,9	93,4 ± 1,2	91,7 ± 0,7
Rutina	88,5 ± 0,6	85,8 ± 0,7	0,82 ± 0,1
Apigenina	60,5 ± 1,0	42,1 ± 1,1	9,6 ± 0,7
BHT	100 ± 0,9	52,1 ± 2,2	43,6 ± 1,5

\* Massa insuficiente para o experimento. Média ± Desvio Padrão (n=3).

Pode-se observar que as amostras apresentam atividade seqüestradora de radicais livres nas três concentrações avaliadas (1000, 100 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Os percentuais de ação antioxidante mostraram-se expressivos para todas as amostras na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , GS, GSS, F2 e F6 apresentaram atividade sequestrante de radicais livres superior ao padrão comercial BHT e na concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a F6 também exibiu uma atividade antioxidante superior ao BHT, fato este que evidencia a ação antioxidante das amostras. Em relação às frações oriundas da partição líquido-líquido realizada, a FAcEt na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi a única que apresentou um percentual de seqüestro também superior ao BHT.

Nas demais frações (FH e FB), os percentuais de ação antioxidante não se apresentaram tão expressivos em relação ao BHT, permanecendo abaixo do percentual exibido por este padrão.

Quando se compara o sumo, o sobrenadante e as frações com o padrão quercetina observa-se que apenas a FAcEt e FB na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  são superiores a este padrão, sendo nas demais concentrações, o percentual de seqüestro inferior aos valores encontrados para a quercetina.

Em comparação ao flavonóide rutina, o sumo e as FH, FAcEt e F1(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) apresentaram atividade antioxidante superior. Já na concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  todas as amostras exibiram um potencial de seqüestro de radicais livres superior a rutina, exceto a F4 que exibiu um percentual de seqüestro equivalente. Na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  para todas as amostras este percentual é inferior a este flavonóide.

Quando se observa o potencial antioxidante das amostras em comparação a apigenina, um outro flavonóide empregado como padrão, nota-se que na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  apenas F2 e G1 apresentaram atividade antioxidante inferior a este flavonóide. Já na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , F1, FB, F4 e F5 também exibiram um percentual de seqüestro inferior a este padrão, sendo que somente F1, F4 e F5, na concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se apresentaram percentuais abaixo da apigenina.

Mediante estes resultados é possível constatar o potencial antioxidante exibido pelas amostras e também sua comparação com a atividade sequestrante de radicais livres como o padrão BHT, bem como para os padrões fenólicos (rutina, quercetina e apigenina) como mostra a figura 58.

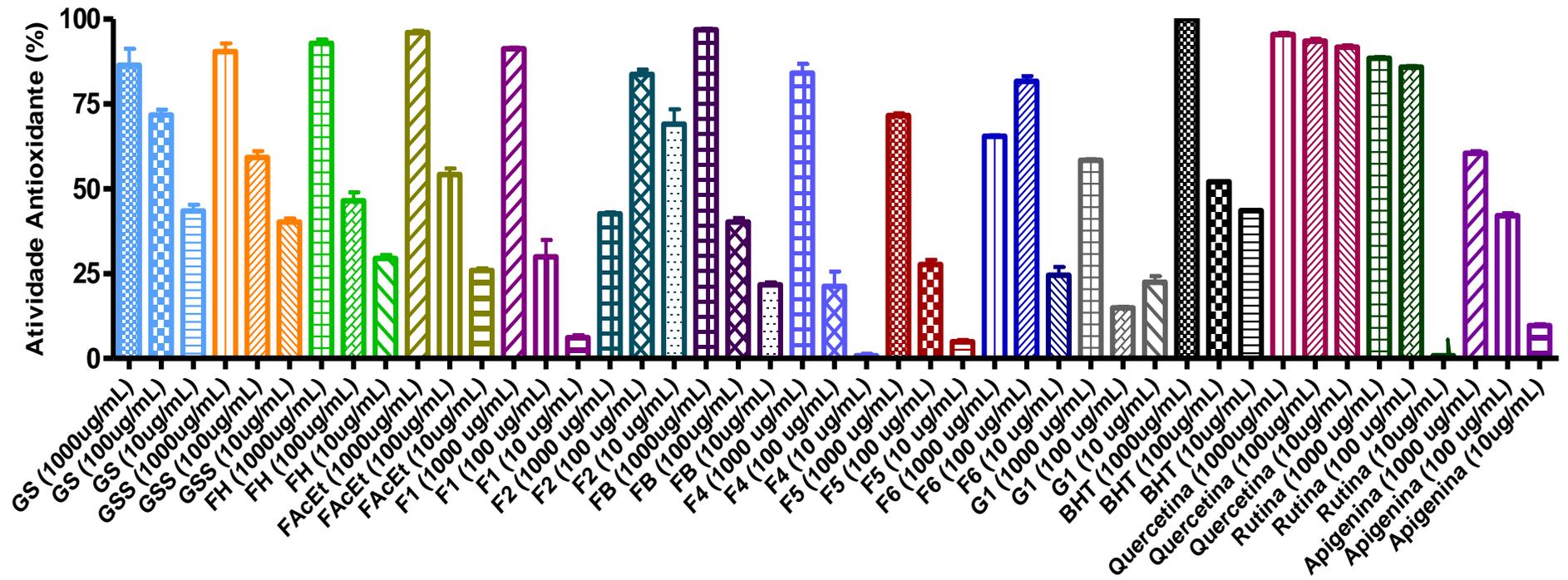


Figura 58: Atividade antioxidante do sumo, frações, subfrações e G1 em comparação com os padrões de referência quercetina, rutina, apigenina e BHT (n=3).

A substância G-1 apresentou, em todas as concentrações, atividade antioxidante inferior aos padrões testados, com exceção da apigenina e da rutina, que apresentaram tal atividade na menor concentração inferior a 10% e 1 %, respectivamente.

O padrão comercial BHT é um antioxidante mais efetivo na supressão da oxidação em gorduras animais do que em óleos vegetais e por isso pode ter apresentado atividade antioxidante na concentração de 1000 µg/mL e 100 µg/mL, devido a sua pouca polaridade. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes (Ramalho e Jorge, 2006).

A apigenina, por sua vez, é relatada na literatura como detentora de baixa capacidade antioxidante (Wojdyło et al., 2007; Skerget et al., 2005; Galati et al., 2002), fato este que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho e pode ser explicado pela estrutura química deste flavonóide. A apigenina (Figura 59) possui a hidroxila no carbono 5, 7 e 4' e a dupla ligação entre os carbonos C-3 e C-4; contudo, esta aglicona não apresenta o grupo OH nos demais carbonos, o que pode explicar a capacidade antioxidante menor quando comparada à literatura (Harborne e Williams, 2000).

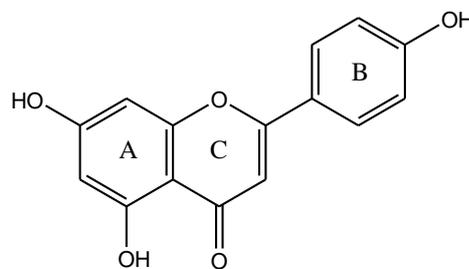


Figura 59: Estrutura química da apigenina, mostrando o grupamento OH nos carbonos 5, 7 e 4'.

Nesse sentido, a atividade sequestrante de radicais livres pelos flavonóides relaciona-se com sua estrutura, e os flavonóides que se apresentam hidroxilados, principalmente os grupos 3-OH, 5-OH, 7-OH, 4'-OH e 3'-OH, são os que exibem maior atividade antioxidante (Ross e Kasum, 2002). Além disso, a presença da dupla

ligação entre os carbonos C-2 e C-3 intensifica a atividade antioxidante que está relacionada aos flavonóides (Harborne e Williams, 2000).

Aos ácidos aromáticos, como os benzoatos, também é atribuída a atividade antioxidante. Em estudo realizado com o 2-hidroxi-6-pentadecil-benzoato de metila, por exemplo, verificou-se que este apresentou atividade sequestrante de radicais livres equivalente ao BHT (Gonzaga, 2008), enquanto que em relação ao benzoato de benzila foi verificado uma baixa atividade antioxidante (Silva et al., 2009).

Partindo do princípio de que a atividade antioxidante relaciona-se principalmente aos flavonóides, bem como aos ácidos fenólicos e aos taninos, avaliou-se também o teor destes últimos, sendo desta forma, quantificados os teores de taninos gálicos, taninos condensados e fenóis totais.

## **5. 6 Determinação do Teor de Taninos**

Os taninos são substâncias provenientes do metabolismo secundário de fontes vegetais e estão presentes na maioria das plantas. Todavia, sua concentração nos tecidos vegetais pode variar, dependendo da idade, do tamanho da planta, da parte coletada, da época ou, ainda, do local de coleta (Monteiro et al., 2005).

A presença de taninos na composição química vegetal muitas vezes está relacionada à ação biológica descrita para uma espécie, sendo que a distribuição maciça de taninos está restrita a alguns táxons, o que faz com que a planta apresente uma grande produção de representantes dessa classe química em detrimento de outros metabólitos (Luna, 2006).

Os taninos são classificados em dois grupos principais, os hidrolisáveis e os condensados, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos possuam molécula poli-hidroxifenóis ou seus derivados (Degáspari, 2005).

Os taninos hidrolisáveis incluem os galotaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico (Figura 8, p. 14 ). Podem ser detectados em elevadas concentrações principalmente em madeiras, cascas de árvores, folhas e galhos (Mueller-Harvey, 2001).

Já os taninos condensados, como a procianidina, por exemplo, (Figura 60), são encontrados em maior concentração e com maior relevância em alimentos (Degáspari et al., 2005). Compreendem um grupo de polihidroxi-flavan-3-ol e

apresentam uma estrutura semelhante aos flavonóides, com coloração que varia do vermelho ao marrom (Scholfield et al., 2001).

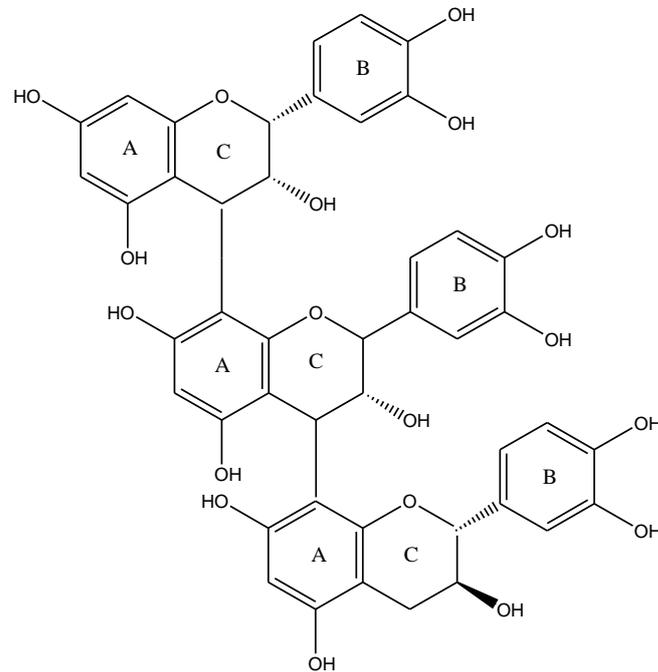


Figura 60: Estrutura química da procianidina, um exemplo de tanino condensado.

Os taninos condensados possuem um padrão de distribuição muito amplo, sendo encontrado em diversas famílias de angiospermas como nas Annonaceae (Paiva et al., 2002). A Tabela 16 mostra os teores de taninos condensados e hidrolisáveis nas amostras oriundas da polpa dos frutos.

Tabela 16: Dados obtidos da análise do teor de taninos condensados e hidrolisáveis da polpa da graviola.

Amostras	Taninos	
	Condensados (% p/v)	Hidrolisáveis (% p/v)
GS	0,34	—
GSS	—	—

De acordo com esses resultados pode-se observar que os teores de taninos condensados concentram-se no sumo, não sendo detectados teores de taninos hidrolisáveis.

Segundo Degáspari et al. (2005), a presença de pequenas quantidades de taninos nos frutos confere-lhes características sensoriais desejáveis. Todavia, quantidades elevadas conferem aos frutos e outros alimentos características adstringentes. Esta sensação de adstringência é provocada pela propriedade que os taninos possuem de precipitar proteínas e assim, quando em contato com as proteínas da saliva, formam um complexo insolúvel que popularmente se caracteriza pela sensação adstringente

Castro et al. (1984), estudando o conteúdo de taninos na graviola, observaram variações pequenas ao comparar frutos verdes e maduros, quantificando os teores de taninos em 0,25 e 0,22%, respectivamente. Já o teor de taninos catéquicos e esteróides livres em extratos metanólicos de *A. muricata* foi de 0,65% (Lima et al., 2006). Vale ressaltar que um fator responsável pelos níveis de concentração pode ser a metodologia de extração, que é um fator limitante para a observação do conteúdo fenólico das plantas.

Alguns estudos relatam decréscimo no teor de taninos da graviola durante o amadurecimento até atingir cerca de 0,08% (Lima et al., 2002; Aziz & Yusof, 1994). Oliveira et al. (1994), no entanto, detectou o conteúdo de fenólicos totais igual a 0,87%.

Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho exibem um valor considerável no teor de taninos presentes no sumo dos frutos.

## **5.7 Determinação do Teor de Fenóis**

O método de Folin-Denis permite quantificar flavonóides, antocianinas e compostos fenólicos presentes nas amostras (Moreira, 2000; Oliveira et al, 1994). A Tabela 17 mostra o teor de fenóis totais da polpa dos frutos de gravioleira.

Tabela 17: Dados obtidos do conteúdo de fenóis totais nas amostras oriundas da polpa dos frutos de graviola.

Amostras	Fenóis Totais (mg/mL)
Sumo (GS)	3,602
Sobrenadante (GSS)	3,257

Foram detectados teores de fenóis totais tanto em GS quanto em GSS, sendo que se pode notar que há uma concentração dos teores de fenóis totais no sumo da polpa da graviola. O fato de ocorrer uma concentração inferior de fenóis no sobrenadante em relação ao sumo pode ser devido à metodologia de extração, a qual é um fator limitante para a observação do conteúdo fenólico das plantas (Agostini-Costa et al., 2003).

Segundo Ferelli (2006), a determinação do conteúdo fenólico total do extrato das folhas de graviola na fração acetato de etila apresentou 0,143 mg/mL de compostos fenólicos, o que representa cerca de 14% sendo, portanto, inferior aos resultados encontrados para o sumo e o sobrenadante apresentados neste trabalho.

Hassimotto et al. (2005), usando metanol a 70% como solvente extrator, relatam valores de fenólicos totais de  $120\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  para polpa de graviola, enquanto Kuskoski (2006) citam o teor de  $84,3\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de fenólicos totais em polpas de graviola provenientes que foram diluídas em água (1:2,5).

Nesse sentido, a relação entre a concentração de fenóis totais e a capacidade de seqüestrar radicais livres verificada neste trabalho pelas amostras foi positiva, visto que as amostras com maior concentração de fenóis totais são justamente as que apresentam maior atividade antioxidante. Esses resultados corroboram com outros trabalhos na qual a atividade antioxidante foi relacionada também com o teor de taninos (Lima et al., 2006; Moure et al, 2001 ).

Os relatos na literatura acerca da correlação entre fenóis totais e atividade antioxidante é controversa. Alguns autores observaram uma alta correlação (Benvenuti et al., 2004; Jimenez et al., 2000; Kahkonen et al., 1999), enquanto outros não observaram correlação direta (Eberhardt et al., 2001; Imeh et al., 2002).

Estudos apontam que a correlação entre a capacidade antioxidante e o teor de fenóis totais pode estar sujeita ao método selecionado e também às características hidrofóbicas ou hidrofílicas do sistema teste e dos antioxidantes avaliados (Roesler et al., 2007). Além disto, outras moléculas podem estar agindo em sinergismo aos compostos fenólicos, o que certamente ocasiona uma alta concentração da atividade seqüestradora de radicais livres.

## **5.8 Atividades Imunofarmacológicas**

No âmbito do estudo das plantas medicinais é necessário verificar a existência de características desejáveis das plantas como a eficácia, baixa toxicidade para o ser humano, assim como um padrão de qualidade para que sejam manipuladas de forma segura na terapêutica médica (Barbosa, 2009).

Nesse contexto, pouco se conhece sobre as propriedades tóxicas de *A. muricata*, pois a toxicidade de plantas da família Annonacea é ainda pouco estudada, principalmente em relação aos frutos, e os trabalhos realizados com as mesmas abordam seus efeitos citotóxicos *in vitro* dando ênfase aos efeitos anti-tumorais. Nesse sentido, se nota uma alta prevalência do uso de plantas medicinais em oncologia. Desta forma, é de suma necessidade o conhecimento acerca dos possíveis efeitos tóxicos relacionados ao uso das plantas medicinais (Barbosa, 2009).

### **5.8.1 Avaliação da atividade imunomodulatória na produção de NO em RAW 264.7**

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples, encontrada no ar atmosférico em baixas concentrações, sendo altamente tóxica por ser um radical livre, o que a torna um agente químico altamente reativo (Muzitano, 2006; Flora-Filho e Zilberstein, 2000).

A síntese fisiológica de NO é de suma importância para a defesa do organismo. Contudo, sua superprodução ou de seus metabólitos implica no desenvolvimento de diversas patologias como, por exemplo, uma inflamação (Wadsworth e Koop, 2001). Assim, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares (Muzitano, 2006; Dusse et al., 2003).

Nesse sentido, resultados experimentais mostram que compostos capazes de inibir a produção de NO possuem alto potencial como agentes anti-inflamatórios (Hamalainen et al., 2007).

Inicialmente foi avaliada a capacidade do sumo, sobrenadante e frações em inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264-7 estimulados com LPS (1 µg/mL) em três diferentes concentrações, 500, 100 e 20 µg/mL.

A atividade imunomodulatória do sumo na produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipolissacarídeo (LPS) foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos controles, porém a mesma não foi expressiva. Na maior concentração testada, 500 µg/mL, o sumo inibiu  $47,72 \pm 4,59$  % da produção de NO, reduzindo a produção de NO a  $13,35 \pm 0,7$  µM como pode ser observado na Figura 61.

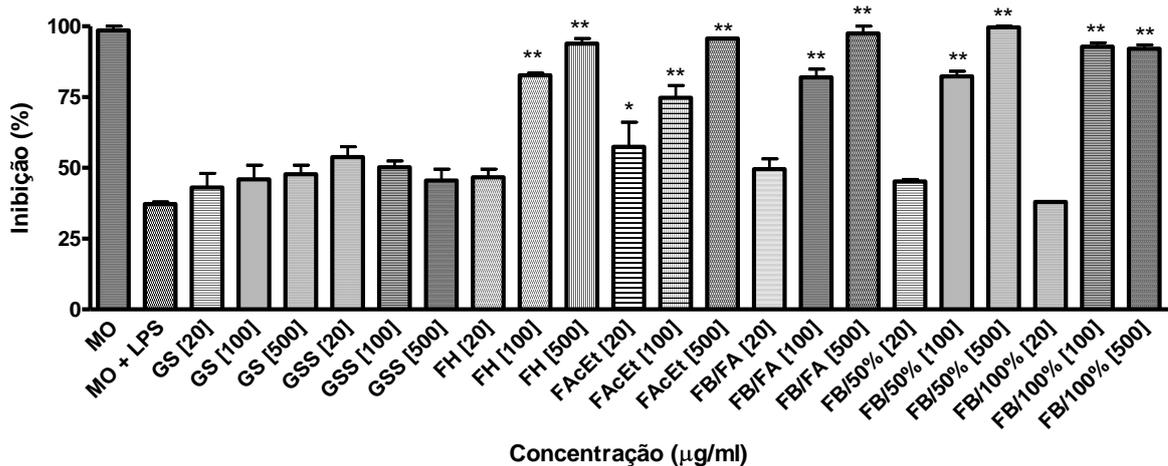


Figura.61: Avaliação da atividade do sumo e frações na inibição da produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Como controle positivo foram usados macrófagos não-tratados e não-estimulados ( $5,38 \pm 0,4$  µM) e como controle negativo macrófagos estimulados 1 µg/ml LPS e não-tratados ( $15,23 \pm 0,5$  µM). Média aritmética  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,001$  (\*\*) em relação ao controle positivo.

Pode-se observar também que o processo de purificação que originou as frações foi eficiente no sentido de que todas as frações apresentaram um percentual de inibição de NO bem mais elevado do que o sumo, chegando a se obter valores

percentuais de inibição bem próximos do controle positivo (100 %), como no caso da fração butanólica na concentração de 500 µg/mL 99,64±0,51%.

Na literatura encontram-se alguns relatos relativos a extratos e substâncias de origem vegetal hábeis em inibir a produção de NO por macrófagos, como por exemplo, os flavonóides quercetina, rutina, wogonina, apigenina (Kim et al., 2004) bem como algumas saponinas e esteróides (Tewtrakul e Itharat, 2007).

### **5.8.2 Avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular em RAW 264.7 e células U937**

O sumo, sobrenadante e frações também foram avaliados quanto a sua citotoxicidade, de acordo com a liberação específica de LDH, explicado em Materiais e Métodos (item 4.3, página 49).

A lactato desidrogenase é uma enzima importante na rota metabólica celular. Atua na rota de conversão do ácido láctico em ácido pirúvico e leva à produção de ATP. Encontra-se dispersa pelo citoplasma da grande maioria das células e quando uma célula sofre danos em sua membrana plasmática, acaba ocorrendo a sua liberação para o meio extracelular. Sendo assim, a presença de LDH em um fluido ou meio extracelular é um indicativo de que houve morte celular seguida de rompimento de sua membrana, um processo patologicamente denominado de necrose (Lantto et al, 2009; Balls et al., 1992).

O sumo e o sobrenadante não apresentaram citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7 e mantiveram sua porcentagem de liberação específica de LDH bastante similar ao observado para as células não tratadas, para os macrófagos não-estimulados e para os que foram somente estimulados. Na Figura 62B pode-se observar que, enquanto o sumo apresentou 6,92±0,4% de citotoxicidade, os macrófagos tratados com 1% de Triton X-100 apresentaram 100±4,95 %.

As frações, por sua vez, apresentaram citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7 apenas na maior concentração 500 µg/mL, sendo que esta citotoxicidade ficou abaixo dos 45% de liberação específica de LDH.

Quanto às células U937, o sumo e o sobrenadante também não apresentaram citotoxicidade, um indicativo de ausência de morte celular por necrose. A taxa de liberação de LDH para as culturas tratadas com Triton foi de 100%, sendo que as células controle e as tratadas com o sumo não apresentaram

liberação específica de LDH estatisticamente significativa (Figura 62A). Já as frações exibiram toxicidade nas células leucêmicas (U937), resultado este que indica que pode estar ocorrendo morte celular por necrose.

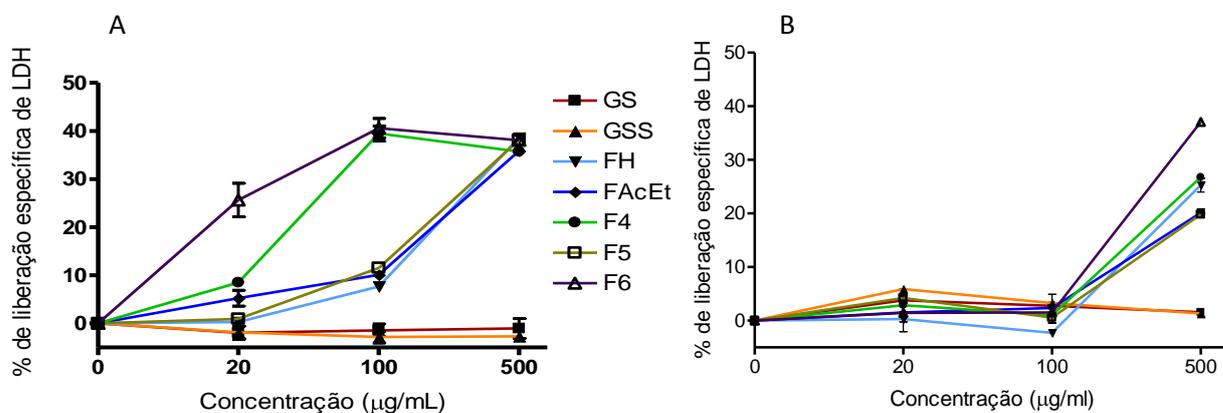


Figura 62: Citotoxicidade mensurada pela porcentagem de liberação específica de LDH. A) Células U937 foram plaqueadas e incubadas com o sumo e frações a 37°C por 48h. Foram utilizados como controle negativo células U937 não-tratadas e como controle positivo células U937 não-tratadas acrescidas de 10µL de uma solução de 10X Triton X-100. B) Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados e estimulados com 1.0 µg/ml de LPS por 24 h a 37 °C com ou sem o sumo e frações. Média aritmética ± desvio padrão (n = 3).

Assim, observa-se com este resultado que as amostras testadas na maior concentração apresentam em torno de 50 % de toxicidade, sendo esta toxicidade dependente da concentração. Na concentração de 100 µg/mL onde a atividade na redução dos níveis de NO é ainda muito elevada a citotoxicidade já é bem reduzida.

Os dados de citotoxicidade a partir da liberação específica de LDH foram confirmados através do método de MTT. O ensaio de viabilidade celular pelo método de metabolização do MTT permite avaliar a quantidade de células vivas em uma cultura, pois avalia a funcionalidade das mitocôndrias. Uma célula para permanecer viva deve apresentar mitocôndrias funcionando perfeitamente e, portanto, gerando ATP, que é empregado nos processos metabólicos celulares (Bernas et al., 2002).

O método de MTT é rápido, sensível e barato e visa analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. Consiste numa análise colorimétrica baseada na

conversão do MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas, que permite dessa maneira quantificar a percentagem de células vivas. Desta forma, o teste de MTT permite definir a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (Barbosa, 2009; Mosmann, 1983).

Nos testes de metabolização do MTT o sumo não reduziu a viabilidade das linhagens celulares. Os macrófagos RAW 264.7 tratados com o sumo (500 $\mu$ g/mL) não apresentaram viabilidade estatisticamente diferente do controle positivo (macrófago tratado com LPS – 1 $\mu$ g/mL) (Figura 63A).

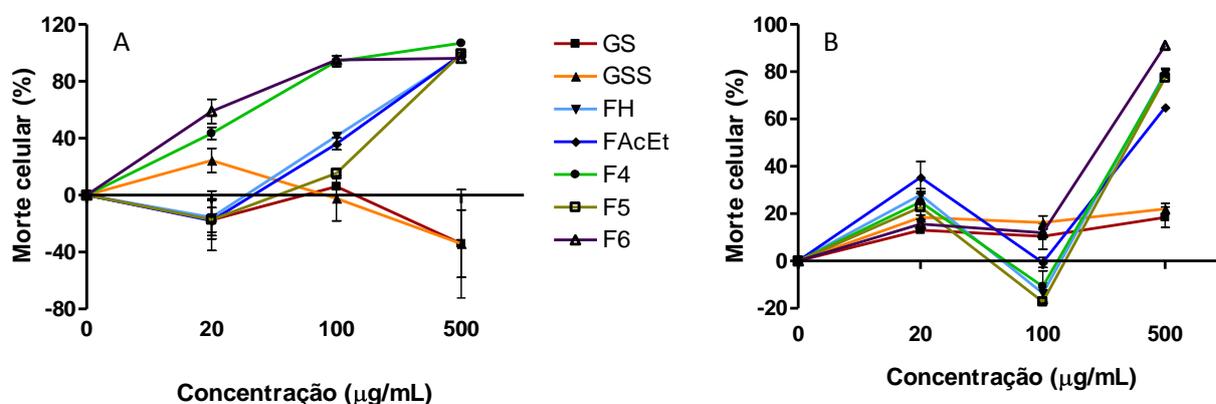


Figura 63: Testes de viabilidade do sumo e frações em macrófagos RAW 264.7 e células leucêmicas U937 através do método de MTT. A) células U937 ( $1 \times 10^6$  células/mL) e B) Macrófagos RAW 264.7 ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram incubadas respectivamente por 48 e 24 horas com as amostras e em seguida a viabilidade das culturas foi mensurada pelo teste de metabolização do MTT. Triton (células cultivadas apenas em meio de cultura mortas pela adição de triton 10X antes da adição do MTT) representa o controle negativo de viabilidade. Média aritmética  $\pm$  desvio padrão (n = 3).

O sumo também não interferiu na viabilidade das células tumorais U937. Os valores de densidade óptica obtidos para a viabilidade estão apresentados na Figura 63A, onde se pode observar que novamente não há diferenças estatisticamente significantes entre a viabilidade das culturas incubadas apenas com DMEM-F12 (controle positivo) e as células tratadas com o sumo na maior concentração. Esses

dados indicam que o sumo não demonstrou efetividade *in vitro* no combate as células leucêmicas U937. Contudo, as frações interferiram na viabilidade celular das células tumorais, como pode ser observado na figura 62A.

Observa-se uma alta prevalência do uso de plantas medicinais na área oncológica. Nesse sentido, os estudos realizados com as Annonaceae acerca de sua toxicidade abordam seus efeitos citotóxicos *in vitro* dando ênfase aos efeitos anti-tumorais (Barqawi et al., 2004).

Oberlies et al. (1995) através de estudos *in vitro* avaliaram a citotoxicidade das Annonaceas, demonstrando a inibição do crescimento de células tumorais humanas. Jaramillo et al. (2000) testaram a citotoxicidade de *A. muricata*, obtendo resultados inibitórios em linhagens de células tumorais U937.

Barbosa (2009) analisando o extrato hidroetanólico das folhas de *A. muricata* verificou uma alta toxicidade, sendo este resultado corroborado por Luna et al. (2006) em seus estudos com extratos etanólicos.

Em estudos realizados com folhas, sementes e cascas de *A. muricata* também se têm verificado uma alta toxicidade, inclusive para algumas cepas tumorais como SF-295 (glioblastoma), HCT-8 (cólon) e MDA-MB-435 (mama), o que corrobora as informações acerca dos estudos realizados com substâncias ativas isoladas desta espécie chamadas de acetogeninas, as quais têm sido amplamente estudadas quanto à sua atividade citotóxica sobre linhagens tumorais (Barbosa, 2009).

Desta forma, as acetogeninas isoladas das folhas de *A. muricata* demonstraram citotoxicidade sobre linhagens tumorais em ensaios *in vitro* (Wu et al., 1995). A muricatacina (5-hidróxi-4-heptadecanolido) isolada das sementes apresentou promissora ação citotóxica nas células de linhagens tumorais de pulmão, de mama e de cólon (Cavé et al., 1997) e as acetogeninas anomuricina e muricapentocina mostraram seletividade quando testadas em linhagem de carcinoma pancreático (PACA-2) e adenocarcinoma de cólon (HT-29) (Kim et al., 1997). Muricina H, muricina I e cis-anomontacina, também isoladas da semente, exibiram significativa atividade citotóxica contra as linhagens tumorais de hepatoma humano (Liaw et al., 2002; Chang e Wu, 2001).

Pesquisas relacionadas à atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico, também mostraram que o extrato das folhas de *A. muricata* se apresentou com alta atividade no modelo de toxicidade para células normais. Já a

avaliação da atividade antitumoral *in vivo* utilizando o sarcoma 180 em camundongos, o extrato foliar de *A. muricata* apresentou um percentual de 57% com uma dose de 30mg/Kg, sendo que na dose de 100 mg/Kg este extrato provocou 80% de mortes dos camundongos (Barbosa, 2009).

Diante dos resultados obtidos e do levantamento bibliográfico pode-se verificar que há algum fundamento na utilização popular da *A. muricata* no tratamento de alguns tumores. Estes resultados relacionados à citotoxicidade, ainda que preliminares, revelam que se deve ter bastante cautela na utilização de plantas medicinais de forma indiscriminada.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho se avaliou o perfil químico da polpa dos frutos de graviola (*Annona muricata L.*), a medida da quantificação da atividade antioxidante, da capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos e por células leucêmicas, o que em tese pode justificar seu uso popular como anti-inflamatório, antitumoral e um possível alimento funcional. Para a obtenção do sumo, a polpa foi separada das cascas e das sementes. Os fracionamentos cromatográficos foram utilizados com o intuito de se obter uma substância purificada e para o conhecimento do perfil químico. Após a purificação da substância isolada, esta foi enviada ao RMN para sua elucidação estrutural. O sumo, frações, subfrações, substância isolada e padrões químicos foram avaliados quanto sua atividade antioxidante. Também foram realizadas as análises de taninos e fenóis totais. O sumo e as frações, os quais apresentaram significativa atividade antioxidante foram submetidos a análise imunofarmacológica. As principais conclusões do estudo podem ser assim resumidas:

### 6.1 Avaliação do Perfil Químico

O sumo, frações e subfrações advindos da polpa dos frutos de graviola quando avaliados por CLAE, apresentaram nos cromatogramas referentes às frações e subfrações de acetato de etila (FAcEt, F1 e F2) a indicação da presença dos flavonóides rutina e quercetina. No sumo e nas demais frações e subfrações

advindas da purificação não foram observados indícios da presença de flavonóides. Após a realização das técnicas cromatográficas de separação de substâncias, foram obtidas subfrações a partir da fração butanólica (FB), das quais um pico majoritário foi isolado no tempo de retenção em torno de 47 minutos, e deste a substância purificada (G-1) foi enviada para RMN, e elucidada a sua estrutura, de acordo com dados espectroscópicos, foi identificada como benzoato-2-metil-heptila.

## **6.2 Avaliação da Atividade Antioxidante**

O sumo, frações, subfrações, G-1 e padrões foram avaliados quanto sua atividade antioxidante. O sumo (GS), sobrenadante (GSS) e frações (FH, FAcEt e FB) apresentaram uma capacidade antioxidante superior a 90 %. A substância isolada neste trabalho provavelmente apresentou menor capacidade antioxidante devido sua estrutura química. Um aspecto que intensifica a atividade antioxidante que está relacionada aos flavonóides é a presença de dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 (Harborne e Williams, 2000).

## **6.3 Avaliação do Teor de Taninos e Fenóis Totais**

Observou-se que os teores de taninos condensados se concentram no sumo da polpa dos frutos de graviola, não sendo detectados teores de taninos hidrolisáveis.

Com relação ao teor de fenóis totais, foram detectados teores tanto em GS quanto em GSS, sendo que se pode notar que há uma concentração dos teores de fenóis totais no sumo da polpa da graviola. Verifica-se que há uma relação positiva entre a concentração de fenóis totais e a capacidade de seqüestrar radicais livres, visto que as amostras com maior concentração de fenóis totais são justamente as que apresentam maior atividade antioxidante. Esses resultados corroboram com outros trabalhos na qual a atividade antioxidante foi relacionada também com o teor de taninos.

#### 6.4 Avaliação da Atividade Imunofarmacológica

O sumo, frações e subfrações apresentaram atividade na inibição da produção de NO. O sumo na maior concentração (500  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiu  $47,72 \pm 4,59$  % da produção de NO, reduzindo a produção de NO a  $13,35 \pm 0,7$   $\mu\text{M}$ . Já as frações apresentaram um percentual de inibição de NO bem mais elevado do que o sumo, chegando a se obter valores percentuais de inibição bem próximos do controle positivo (100 %), como no caso da fração butanólica na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$   $99,64 \pm 0,51$ . Com relação a toxidez, o sumo e o sobrenadante não apresentaram citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7 e mantiveram sua porcentagem de liberação específica de LDH bastante similar ao observado para as células não tratadas, para os macrófagos não-estimulados e para os que foram somente estimulados. As frações, por sua vez, apresentaram citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7 apenas na maior concentração 500  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que esta citotoxicidade ficou abaixo dos 45% de liberação específica de LDH. Quanto às células U937, o sumo e o sobrenadante também não apresentaram citotoxicidade, um indicativo de ausência de morte celular por necrose, observando-se que as amostras testadas na maior concentração apresentam-se inferiores a 50 % de toxidez. Nos testes de metabolização do MTT o sumo não reduziu a viabilidade das linhagens celulares. Os macrófagos RAW 264.7 tratados com o sumo (500 $\mu\text{g/mL}$ ) não apresentaram viabilidade estatisticamente diferente do controle positivo. O sumo também não interferiu na viabilidade das células tumorais U937. Contudo, as frações interferiram na viabilidade celular das células tumorais, demonstrando efetividade *in vitro* no combate as células leucêmicas U937.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBO, E.S.; OLURIN, T. O. ; ODEYEMI, G. (2006) Studies on the storage stability of soursop (*Annona muricata* L.) juice. *African Journal Of Biotechnology*, 5: 1808-1812.

AGOSTINI-COSTA, T. S., LIMA, A., LIMA, M .V. (2003). Determinação de tanino em pedúnculo de caju : método da vanilina versus método do butanol ácido. *Química Nova*. 26: 763-765.

ALI, S. S., KASOJU, N., LUTHRA, A., SINGH, A., SHARANABASAVA, H., SAHU, A., BORA, U. (2009) Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41: 1–15.

ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANCO, A.; ABAD, B.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. (2004) Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2938-2952.

ALVES, R. E.; LIMA, M. A. C.; FILGUEIRAS, H. A. C.; TAVORA, F. J. A. F. (2002) Compostos fenólicos e enzimas oxidativas de graviola (*Annona muricata* L.) durante a maturação. In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura*. Belém. 1: 1.

AMIÉ, D.; DAVIDOVIÉ-AMIÉ, D.; BESLO, D.; TRINAJSTIÉ, N. (2003) Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76 (1): 55 – 61.

ANDERSON D. (2000) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, 350:103-8.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. (2007) Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66(1): 1-9.

ANJO, D. L. C. (2004) Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, 3 (2): 145- 154.

ARAÚJO, D. S.; CHAVES, M. H. (2005) Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. *Quim. Nova*, 28 (6): 996-999.

ARBAISAH, S.M.; ASBI, B.A.; JUNAINAH, A.H. ; JAMILAH, B. (1997) Purification and properties of pectinesterase from soursop (*Anona muricata*) pulp. *Food Chemistry*, 59 (1): 33-40.

ARGONDIZO, F.; OLIVEIRA, A. J. A.; KITAMURA, R. O. S.; ROMOFF, P.; KATO, M. J.; LAGO, J. H. G. (2007) Constituintes químicos de *Piper glabratum* Kunth (Piperaceae). In: *30ª Reunião Anual da SBQ*, Águas de Lindóia - SP. *30ª Reunião Anual da SBPC*.

ARUOMA, O.I. (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant action of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 523: 9-20.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO - ABIA. Mercado Brasileiro dos alimentos industrializados, 2005. Disponível via: [http://www.anuarioabia.com.br/editorial\\_05.htm](http://www.anuarioabia.com.br/editorial_05.htm). Acesso em 11 de novembro de 2010.

AVANZI, CLAUDIA J; ALEIXO, A. M.; BAPTISTELLA, L. H. B. (2006) Identificação e Caracterização dos compostos ativos dos extratos vegetais das folhas da graviola (*Annona muricata*) e dos Extratos Vegetais da Casca do Pau D'arco (*Tabebuia avellanedae*). In: 58ª Reunião Anual da SBPC, Forianópolis. 58ª Reunião Anual da SBPC.

AZIZ, P. A.; YUSOF, S. (1994) Physico-chemical characteristics of soursop fruit (*Annona muricata*) during growth and development. *ASEAN Food Journal*, New York, 9 (4): 147-150.

BAGGIO, S. R.,; BRAGAGNOLO, N. (2004) Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24: 64-70.

BALLS, M. & CLOTHIER, R.H. (1992) Cytotoxicity assays for intrinsic toxicity and irritancy. In: *In Vitro Methods for Toxicology* (ed. R.R. Watson), 37.52.

BARBOSA, C.V. (2009) Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL. Dissertação de Mestrado – Maceió – AL, Universidade Federal de Alagoas, 98 páginas.

BARON, D. (2010) Desenvolvimento de plantas jovens de *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer (Araticum-de-terra-fria) cultivadas em solução nutritiva. Dissertação de Mestrado – Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista, 111 páginas.

BARQAWI, A.; GAMITO, E.; O'DONNELL, C.; CRAWFORD, E.D. (2004) Herbal and vitamin supplement use in a prostate cancer screening population. *Urology*, 63 (2): 288-92

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T.S. (2007) In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45 (5): 480-485.

BENVENUTI, S.; PELLATI, F.; MELEGARI, M.; BERTELLI, D. (2004) Polypehols, Anthocyanins, Ascobic Acid, anda Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes and Aronia. *Food Chemistry and Toxicology*, 69 (3): 164-169.

BERNARDES, N. R.; PESSANHA, F. F.; OLIVEIRA, D. B. (2010) Alimentos Funcionais: Uma breve revisão. *Ciência e Cultura - Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB*, 6 (2). novembro.

BERNAS, T; DOBRUCKI, J. (2002) Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4): 236-242.

BOGDAN, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*. 2: 906-916.

BORA , P. S. ; HOLSCHUH , H. J. ; SILVA VASCONCELOS, M. A. (2004) Characterization of polyphenol oxidase of soursop (*Annona muricata* L.) fruit and a comparative study of its inhibition in enzyme extract and in pulp. *Journal Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, 4: (4): 267-273.

BORGES, V.C. (2000) Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: WAITZBERG, D.L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica* . 3. ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 1495-1509.

BRANDÃO, J. A. C. B. (2003) Simbiose micorrízica arbuscular de gravioleiras (*Annona muricata*) em solo infestado por *pratylenchus coffeae*. Dissertação de Mestrado – Recife – PE, Universidade Federal de Pernambuco, 74 páginas.

CAMPOS, D. A. (2008) Efeito gastroprotetor da 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona isolada de *Lonchocarpus araripensis* Bentham em camundongos e possíveis mecanismos. Tese de Mestrado – Fortaleza – CE, Universidade Federal do Ceará, 131 páginas.

CAMPOS, L. P. AND MIRALDO, M, C. (2006) Estudo das propriedades antiinflamatórias de Flavonóides sobre a inflamação aguda induzidas por PLA2 de serpentes crotálicas. Tese - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Experimental do Litoral Paulista, Unidade São Vicente.

CARLOS, I. Z., LOPES, F. C. M., BENZATTI, F. P., CARLI, C. B. A., MARQUES, M. F., JORDÃO-JUNIOR, C. M., RINALDO, D., CALVO, T. R., SANTOS, L. C., VILEGAS, W. (2005) Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15: 44-50.

CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, L .F.; BEZERRA, F. B. (1998) Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* miers (Lecythidaceae). *Química Nova*, 21(6).

CASÉ, F. DELIZA; R. ROSENTHAL, A.; MANTOVANI, D.; FELBERG, I. (2005) Produção de leite de soja enriquecido com cálcio. *Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 25(1): 86-91, jan. -mar.

CASTRO, F.A. de; MAIA, G.A.; HOLANDA, F.F.; GUEDES, Z.B.L.; FÉ, J. de A. M. (1984) Características físicas e químicas da graviola. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 19 (3): 361-365.

CAVÉ, A.; FIGADERE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. (1997) Progress in the chemistry of organic. *Natural Products*; Herz, W.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Steglich, W.; Tamm, Ch., Eds; Springer-Verlag: New York, 70: 81-288.

CHAE, H. S., KANG, O. H., LEE, Y. S., CHOI, J. G., OH, Y. C., JANG, H. J., KIM, M. S., KIM, J. H., JEONG, S., KWON, D. Y. (2009) Inhibition of LPS-Induced iNOS, COX-2 and Inflammatory mediator Expression by Paeonol through the MAPKs Inactivation in RAW 264.7 Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, 37:181–194.

CHANG, F. R.; WU, Y. C. (2001) Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 22 (64): 925-931.

CHRISTEN, Y. (2000) Oxidative stress and Alzheimer's disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71(2): 621S-629 .

COLEMAN, J. W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1:1397–1406.

CORRÊA, M. P. (1984) *Dicionário de plantas medicinais do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de desenvolvimento Florestal, 6 (3): 646. Graviola do Norte.

CORREIA, D. P. (2002) Espectroscopia de RMN: Análise Estrutural. Departamento de Química. Universidade da Madeira. Funchal, abril.

COSTA, A. F. (1994) *Farmacognosia*. 2 ed. Lisboa: Fundação Calauste Gulbenkian, 135 páginas.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. (2009) Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, 1 ( 3): 241-256.

DEGÁSPARI, C. H. (2004) Propriedades Antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthfolius* RADDI). Tese de Doutorado – Curitiba – PR. Universidade Federal do Paraná, 104 páginas.

DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., PRADO, M. R. M. (2005) Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthfolius* Raddi. *Ciências agrotécnica*. 29: 617-622.

DEY, P.M.; HARBONE, J. B. (1997) *Plant biochemistry*. London: Academic Press, 529 p.

DIAZ, M. N.; FREI, B.; KEANEY, J. F. Jr. (1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *New Engl. J. Med*, 337(6): 408-416.

DOS SANTOS, W. W. C. (2008) Síntese e avaliação farmacológica de lactonas de 14 membros planejadas a partir dos lipídeos fenólicos não isoprenóides de *Anacardium occidentale*. Dissertação de Mestrado – Brasília – DF, Universidade de Brasília, 150 páginas.

DUSSE, L. M. S., VIEIRA, L. M., CARVALHO, M. G. (2003) Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 39: 343-350.

EBERHARDT, M. V.; LIU, R. H.; SMITH, N. L.; LEE, C. Y. (2001) Antioxidant activity of various apple cultivars. Abstract of papers of The American Chemical Society; *American Chemical Society*: Washington, DC, 221, part 1, 118-AGFD.

ESQUINCA, A. R. G. (2005) La familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos: Revision. *Ciencia y Tecnología en la Frontera*, Ano II (3): 41-52, julio-diezembro.

FABRI, R. L. (2008) Estudo fitoquímico de *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. Biomonitorado pela atividade antimicrobiana e avaliação das atividades citotóxica, leishmanicida e antioxidante. Dissertação de Mestrado – Juiz de Fora – MG, Universidade Federal de Juiz de Fora, 148 páginas.

FANG, Y. N. ; LIU, G. T. (2002) Effect of isorhapontigenin on respiratory burst of rat neutrophils. *Phytomedicine*, 9: 734-738.

FERELLI, C.; DEDALO, M. F. N. (2006) Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Extratos de Graviola (*Annona Muricata*) e Suas Frações. In: MOSTRA ACADÊMICA DA UNIMEP, 4ª, 2006, Piracicaba. *Anais da 4ª Mostra Acadêmica*. Piracicaba: Universidade Metodista de Piracicaba.

FERELLI, C.; NEPOMUCENO, M. F. (2005) Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de graviola (*Annona muricata*) e suas frações. In: *3º Congresso de Pesquisa*, Piracicaba. 3ª Mostra Acadêmica da UNIMEP.

FERREIRA, F. G. (2010) Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva dos óleos essenciais de *Mentha piperita* L. e *Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson em camundongos, por via inalatória. Dissertação de Mestrado – Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista, 81 páginas.

FLORA FILHO, R., ZILBERSTEIN, B. (2000) Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46: 265-271.

FORKMANN, G., MARTENS, S. (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 155-160.

FREITAS, R. D. R., BRIENZA, S. M. B. (2007) Estudo da ação de extratos de graviola (*Annona muricata*) sobre o estresse oxidativo em células sadias e linhagens tumorais. In: *15º Congresso de Iniciação Científica*, 5ª Mostra Acadêmica UNIMEP.

GALATI, G., SABZEVARJ, O., WILSON, J. X., O'BRIEN, P. J. (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 177: 91–104.

GARCÍA-MEDIAVILLA, V., CRESPO, I., COLLADO, P. S., ESTELLER, A., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., TUÑÓN, M. J., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (2007) The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappa B pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*. 557: 221–229.

GLEYE, C; LAURENS, A; HOCQUEMILLER, R.; LAPREVOTE, O.; SERANI, L.; CAVÉ, A. (1997) Cohibins A and B, acetogenins from roots of *Annona muricata*. *Phytochemistry*, 44 (8): 1541-1545.

GONZAGA, W. A. (2008) Preparação e avaliação farmacológica de derivados dos lipídeos fenólicos do líquido da casca da castanha de caju. Dissertação de Mestrado – Brasília – DF, Universidade de Brasília, 153 páginas.

GRIESS, J. P. (1864) *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 154: 679. / A.C. Bratton, E.K. Marshall Jr., *Journal of Biology and Chemical*, 128 (1939): 537.

HALLIWELL, B. (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 46: 531–542.

HAMALAINEN, M., NIEMINEN, R., VUORELA, P., HEINONEN, M., MOILANEN, E. (2007) Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzen inhibit STAT-1 and NF-kB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*. 1:1-10.

HARBORNE, J. B. (1994 a). Phenolics *In: MANN, J., DAVIDSON, R. S., HOBBS, J. B., BANTHORPE, D. V. Natural Products. Their chemistry and biological significance.* 1. ed. New York: Longman scientific & Technical, 361-388.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A. (2000) Advances in favonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55: 481-504.

HARBORNE, J.B. (1994 b). *The Flavonoids - Advances in Research Since 1986.* Chapman & Hall, London, 703 páginas.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. (2005) Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (8): 2928-2935.

HEIM, K. E. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal Nutrition Biochemistry*. 13: 572-584.

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*. 2 ed. São Paulo: UNESP, 89-109.

HUANG, G. C.; CHOW, J. M.; SHEN, S. C.; YANG, L. Y.; LIN, C. W.; CHEN, Y. C. (2007) Wogonin but not Nor-wogonin inhibits lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced iNOS gene expression and NO production in macrophages. *International Immunopharmacology*, 7: 1054–1063.

IMEH, U.; KHOKBAR, S. (2002) Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (22): 6301-6306.

INTERNATIONAL FOOD INFORMATION COUNCIL FOUNDATION – IFIC (2006) Functional Foods. <http://www.ific.org/nutrition/functional>>. Acesso em: 09 de outubro de 2008.

JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J. ; GONZALEZ, M. C. ; ROBLEDO, S. M. & VÉLEZ, I. D. (2000) Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*, 71(2): 183-186.

JIMENEZ, E. A. ; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; F S. C. (2000) Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11): 5489-5493.

JUNQUEIRA, K P; VALE, M R; PIO, R; RAMOS, J D. (2002) Cultura da gravioleira (*Annona muricata*). Lavras: Ufla. (Boletim de Extensão).

JURGENS, A.; WEBBER, A. C.; GOTTSBERGER, G. (2000) Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips. *Phytochemistry*, 55: 551-558.

KÄHKÖNEN, M. P., HOPIA, A. I., VOURELA, H. J., RAUHA, J. P., PIHLAJA, K., KUJALA, T. S., HEINONEN, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts

containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 3954-3962.

KIM, G. S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F. E.; MCLAUGHLIN, J. L. SASTRODIHARDJO, S. (1997) Two New Mono-Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, Annomuricin E and Muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 61: 432-436.

KIM, H. P., SON, K. H., CHANG, H. W. AND KANG S. S. (2004) Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96: 229 – 245.

KIM, J-D., LIU, L., GUO, W. AND MEYDANE, M. (2006) Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endotelial cell adhesion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17: 165-176.

KOLEVA, L. I., VAN BEEK, T .A., LINSSEN, J. P. H., De GROOT, A., EVSTATIEVA, L. N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*. 13: 8-17.

KUSKOSKI, E. A. (2006). Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciênc. Rural*, 36 (4): 1285-1286.

LACHMAN, J., ORSAK, M., HEJTMANKOVA, A., KOVAROVA, E. (2010) Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *Food Science and Technology*. 43: 52–58.

LANTTO, T. A.; DORMAN, H.J. D.; SHIKOV , A. N.; POZHARITSKAYA , O. N.; MAKAROV , V.G.; TIKHONOV , V. P.; HILTUNEN, R.; RAASMAJA, A. (2009) Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry*, 112: 936–943.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKERJEE, B.; MUKHERJEE, R. (1982) The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, 21(12): .2783-2813.

LIAW, C.C.; CHANG, F. R.; LIN, C.Y. ; CHOW, C. J.; CHIU, H. F.; WU, M. J. (2002) New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 65 (4): 470-75.

LIMA, K. S. B.; LIMA, Y. C.; SOUSA, T. S.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M. (2006) Atividade Antioxidante de Plantas e Sua Relação com o Teor de Taninos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, XLVI, 2006, Salvador. *Anais do XLVI Congresso Brasileiro de Química*. Salvador: Universidade Estadual do Ceará.

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 de Mestrado – Maceió – AL, Universidade Federal de Alagoas, 102 páginas.

LUNA, J. S. (2006) Estudo de Plantas Bioativas. Tese de Doutorado – Recife – PE, Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, 254 páginas.

LUNA, J. S.; CARVALHO, J. M.; LIMA, M. R. F.; BIEBER, L. W.; BENTO, E. S.; FRANCK, X.; SANT'ANA, A. E. G. (2006) Acetogenins in *Annona muricata L.* (annonaceae) leaves are potent molluscicides. *Natural Product Research*, 20 (3): 253-257.

MABRY, T. J., MARKHAM, K. R., THOMAS. M. B. (1970) The systematic identification of flavonoids. Nova York: Springer-Verlag.

MARCHESE, R. M. (2009) Atividade de constituintes micromoleculares de *Renealmia alpinia* (Rottb.) Mass (Zingiberaceae) sobre *Leishmania (Leishmania) chagassi*. Dissertação de Mestrado – Brasília – DF, Universidade de Brasília, 167 páginas.

MARIOD, B. A., IBRAHIM, R. M., ISMAIL, M., ISMAIL, N. (2009) Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry* 118: 120–127.

MCCORD, J. M. (1994) Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition. *Food Technol.* 48 (3): 106-110.

McMURRY, J. (2005) Química orgânica. 6ª edição, 1, Thomson: São Paulo.

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAUJO, E. L., AMORIM, E. L. C. (2005) Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova.* 28: 892-896.

MORAES F. P.; COLLA L. M. (2006) Alimentos Funcionais E Nutracêuticos: Definições, Legislação E Benefícios À Saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3 (2), 99-112.

MORAES, T. M. S.; ARAÚJO, M. H.; BERNARDES, N. R.; OLIVEIRA, D. B.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F.; CUNHA, D. (2011) Antimycobacterial Activity and Alkaloid Prospection of Psychotria Species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest. *Planta Medica*, 17, janeiro.

MOREIRA, D. L. (2000) Métodos de análise e dosagem de taninos condensados, taninos gálicos e fenóis totais. Apostila *NPPN-UFRJ*.

MOSMANN, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63.

MOURE, A., CRUZ, J. M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J. M., SINEIRO, J. DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M. J., PARAJÓ, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72: 145-171.

MUELLER-HARVEY, I. (2001) Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed and Technology*. 91: 3-20.

MURAKAMI, A., OHIGASHI, H. (2007) Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. *International Journal of Cancer*. 121: 2357–2363.

MUZITANO, M. F., CRUZ, E. A., ALMEIDA, A. P., SILVA, S. A. G., KAISER, C. R., GUETTE, C., ROSSI-BERGMANN, B., COSTA, S. S. (2006) Quercetrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta medica*. v. 72, p. 81-83.

MUZITANO, M. F.; TINOCO, L. W.; GUETTE, C.; KAISER, C. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. (2006) Assessment of antileishmanial activity of new and unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, 67: 2071-2077.

NARAIN, N.; ALMEIDA, J. N.; GALVÃO, M. S.; MADRUGA, M. S.; BRITO, E. S. (2004) Compostos voláteis dos frutos de maracujá (*Passiflora edulis* forma *flavicarpa*) e de cajá (*Spondias mombin* L.) obtidos pela técnica de headspace dinâmico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24 (2): 212-216, abr.-jun.

NOGUEIRA, E.A.; MELLO, N.T.C de.; MAIA, M.L. (2005). Produção e comercialização de anonáceas em São Paulo e Brasil. *Informações econômicas*, 35 (2): 51-54.

O'PREY, J., BROWN, J., FLEMING, J., HARRISON, P. R. (2003) Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 66: 2075–2088.

OBERLIES, N.H.; JONES, J.L.; CORBETT, T.H.FOTOPOULOS, S.S.; MECLAUGHLIN, J.L. (1995) Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Letters*, 96: 55-62.

OLIVEIRA, D. B. (2005) Aspectos Químicos e Etnomedicinais de Plantas da Dieta de Cervídeos na Reserva Particular do Patrimônio Natural – SESC Pantanal. Tese de Doutorado – Rio de Janeiro- RJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 206 páginas.

OLIVEIRA, D. B.; PESSANHA, N. N. C.; BERNARDES, N. R.; SILVA, W. D.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. R. (2009) Extrato dos frutos de *Cereus*

Fernambucensis: Atividade Antioxidante e Inibição da Produção de Óxido Nítrico (NO) por Macrófagos. *Interscienceplace*, ano 2 , n. 07, Maio/Junho.

OLIVEIRA, S. L. de; GUERRA, N. B.; MACIEL, M. I. S.; LIVERA, A. V. S. (1994) Polyphenoloxidase activity, polyphenols concentration and browning intensity during soursop (*Annona muricata*, L.) maturation. *Journal of Food Science*, Chicago, 59 (4): 1050-1052.

ONIMAWO, I.A (2002) Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of sour sop (*Annona muricata*) *Plant Foods For Human Nutrition*, 57 (2): 165-171.

OTAKI, N.; KIMIRA, M.; KATSUMATA, S.; UEHARA, M.; WATANABE, S.; SUZUKI, K. (2009) Distribution and major sources of flavonoids intakes in the middle-aged Japanese womem. *Journal of Clinical Biochemistry Nutrition*, 44: 231–238.

PAIVA, S. R.; HERINGER, A. P.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. (2002). Taninos condensados de espécies de Plumbaginaceae, 9(1): 153 – 157.

PEREIRA, R.C.; OLIVEIRA, M.T.R.; LEMOS, G.C.S (2004) Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14 (01): 40-44.

PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLÜCKE, B. P. (2005) *Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos*. São Paulo: Editora Varela.

PRADO, G. P. (2007) Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de *Cunila angustifolia* Benth (Lamiaceae) sobre *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). Dissertação de Mestrado – Chapecó – SC, Universidade Comunitária Regional de Chapecó, 60 páginas.

QUISPE M. A.; ZAVALA C, D.; ROJAS C. J. (2006) Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de

pulmón. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Publica*, 23 ( 4): 265-269.

RAMALHO, V. C., JORGE, N. (2006) Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29: 755-760.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. (2001) Óxido Nítrico. *In: Farmacologia*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 156-163.

RAYA, C. C. (2005) Tiras reactivas ópticas para la determinación de metales pesados. Dissertação de Doutorado – Granada – Espanha, Universidade de Granada, 328 páginas.

REIG, A. L. C.; ANESTO, J. B. (2002) Prebióticos y probióticos, una Relación Beneficiosa. Instituto de Nutrición e Hiene de los Alimentos. *Revista Cubana de Alimentação e Nutrição*, 16(1): 63-68.

RIBANI, R. H. (2006) Compostos fenólicos em erva-mate e frutas. Tese de Doutorado – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas, 158 páginas.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. (2004) *Química de alimentos*. São Paulo: Editora Edgard Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia. ISBN: 85-212-0326-8.

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

RITTER, O. M. S. (2005) Síntese e caracterização de novos materiais líquido-cristalinos derivados de bifenilcarboxilatos e 3,5-isoxazolininas. Dissertação de Doutorado – Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 182 páginas.

ROBERFROID, M. (2002) Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34 (2): 105-10.

RODRÍGUEZ, M. B. S.; MEGÍAS, S. M.; BAENA, B. M. (2003) Alimentos Funcionales y Nutrición óptima. *Revista da Espanha de Salud Pública*, 77 (3): 317-331.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M.(2007) Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(10): 53-60, jan.-mar.

ROSS, J. A., KASUM, C. M. (2002) Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*. 22: 19–34.

SAAD, S. M. I. (2006) Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42 (1): 1-16.

SABUDAK, T.; DOKMECH, D.; OZYGIT, F.; ISIK, E.; AYDOGDU, N. (2005) Antiinflammatory and Antioxidant Activities of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* Extracts. *Asian Journal of Chemistry*, 20: 1491-1496.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. (2000) Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, 55: 567 – 573.

SARTORI, M. R. K. (2005) Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* spreng (*Wedelia paludosa*) (*Asteraceae*). Tese de Mestrado – Itajaí – SC, Universidade do Vale do Itajaí, 81 páginas.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. (2004) Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 10: 308-313.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, A.N.; PELL, A.N. (2001) Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 92: 21-40.

SHAMI, N. J. I.; MOREIRA, E. A. M. (2004) Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*. 17: 227-236.

SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; DAMASCENO, E. I.; FÉLIX, J. S.; MAIA, J. G. (2009) Atividade antioxidante dos óleos essenciais de dois tipos químicos de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32ª, 2009, Fortaleza. *Anais da 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química*. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. (1998) Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6ª edição, LTC.

SKERGET, M., KOTNIK, P., HADOLIN, M., RI, M., HRAZ, A. R., SIMONIC, M., KNEZA, M. (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 89: 191–198.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. (2002) Princípios da Análise Instrumental. 5 edição, Porto Alegre: Bookman.

SOARES, G. L. G.; ISAIAS, R. M. S.; GONÇALVES, J. M. R.; CHRISTIANO, J. C. S. (2000) Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea, Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae). *Rev. bras. De Zootécias*, Juiz de Fora, 2 ( 1): 103- 133, dez.

SOARES, G.L.G. (1996) Polarizações da Química Flavonoídica em Linhagens Vegetais. Tese de Doutorado - Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 133p.

SOARES, S. E. (2002) Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição*. 15:71-81.

SOUZA, E. B. R. (2009) Análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Annona muricata* L. por métodos quimiométricos. Dissertação de Mestrado – Londrina – PR, Universidade Estadual de Londrina, 104 páginas.

SOUZA, M. M. C. (2003). Avaliação da atividade ovicida de *Annona squamosa* Linnaeus sobre o nematóide *Haemonchus contortus* Rudolphi e toxicidade em camundongos. Dissertação - Mestrado em Ciências Veterinárias - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza – Ceará, 95 páginas.

SPADA, P. D. S.; DE SOUZA, G. G. N.; BORTOLINI, G. V.; HENRIQUES, J. A. P. & SALVADOR. (2008) M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits . *Journal of Medicinal Food*, 11 (1): 144-151.

SRIVASTAVA, A., SHUKLA, Y. AND KUMAR, S. (2000) Recent Development In Plant Derived Antimicrobial Constituents – a review. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 22: 349-405.

SWAIN, T., HILLIS, W.E. (1959) The phenolics constituents of prumus domestica: the quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal Sci Food Agric*, 10: 63-8.

TEWTRAKUL, S., ITHARAT, A. (2007) Nitric oxide inhibitory substances from the rhizomes of *Dioscorea membranacea*. *Journal of ethnopharmacology*, 109: 412-416.

VALTER, J. L.; ALENCAR, K. M. C.; SARTORI, A. L. B.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; LAURA, V. A.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; SILVA, D. B.; GRASSI, R. F.; FABRI, J. R.; SIQUEIRA, J. M. (2008) Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18 (3): 373-378, Jul./Set.

VIEIRA, P. M. (2007) Participação do óxido nítrico na Infecção experimental de cães pelo *Trypanosoma cruzi*. Defesa de Mestrado – Ouro Preto - MG, Universidade Federal de Ouro Preto, 87 páginas.

WADSWORTH, T. L., KOOP, D. R. (2001) Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chemico-Biological Interactions*, 137: 43–58.

WOJDYO, A., OSZMIAN, J., CZEMERYYS, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 105: 940–949.

WU, F. E.; LU, Z.; GU, Z. M.; ZHAO, Z.X. ; ZHANG, Y.; SCHWEDLER, J. T.; MCLAUGHLIN, J. L. (1995) New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, annomuricin c and muricatocin c, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 58 (6): 909-915.

YEN, G. C.; DUH, P. D. (1994) Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (3): 629-632.

YU, J.G.; GUI, H.Q.; LUO, X.Z.; SUN, L. (1998). Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*. *Phytochemistry*, 49 (6): 1689-1692.

ZHANG, Z., ZHANG, Q., WANG, J., SONG, H., ZHANG, H., NIU, X. (2010) Chemical modification and influence of function groups on the in vitro-antioxidant activities of porphyrin from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydrate Polymers*. 79: 290–295.

ZHAO, L.; ZHANG, S-L.; TAO, J-Y.; PANG, R.; JIN, F.; GUO, Y-J.; DONG, J-H.; YE, P.; ZHAO, H-Y.; ZHENG, G-H. (2008) Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-O -galloyl-3,6-(R)- hexahydroxydiphenoyl-D -glucose) in vitro. *International Immunopharmacology*, 8: 1059–1064.