

**Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antineoplásica de  
*Annona muricata L.***

**CLARA DOS REIS NUNES**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO – 2015**

**Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antineoplásica de  
*Annona muricata L.***

**CLARA DOS REIS NUNES**

Tese 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 Doutor em Produção Vegetal com ênfase em Química de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Daniela Barros de Oliveira

Co-Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Milton Masahiko Kanashiro

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO – 2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 142/2015

Nunes, Clara dos Reis

Estudo químico e avaliação da atividade antineoplásica de *Annona muricata* L. / Clara dos Reis Nunes. – 2015.

220 f. : il.

Orientador: Daniela Barros de Oliveira.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 151 – 194.

1. *Annona muricata* L. 2. Antineoplásica 3. Físico-química 4. Identificação I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 634.41

**Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antineoplásica de  
*Annona muricata L.***

**CLARA DOS REIS NUNES**

Tese 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 Doutor em Produção Vegetal com ênfase em Química de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira

Co-Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Milton Masahiko Kanashiro

Aprovada em 30 de Março de 2015.

Comissão examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Sílvia Menezes de Faria Pereira (D.S., Engenharia e Ciência dos Materiais)  
UENF / CCTA - RJ

---

Prof<sup>a</sup>. Lara Fonseca Barbosa Siqueira (D.S., Química de Produtos Naturais) IFF - RJ

---

Prof<sup>o</sup>. Milton Masahiko Kanashiro - co-orientador (D.S. Biociências e Biotecnologia) UENF/ CBB – RJ

---

Prof.<sup>a</sup> Daniela Barros de Oliveira (Orientadora) (D.S., Química de Produtos Naturais) UENF / CCTA -RJ.

*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, N'ele e com Ele...*

*Os obstáculos existem para nos dar a chance de mostrar a força das nossas aspirações e do Deus a quem servimos.*

*“Não basta ensinar ao homem apenas uma especialidade porque ele se tornará assim, uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que ele adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo e do que é correto”.*

*Albert Einstein*

*“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, conceder paciência e me dar sabedoria. Foi Deus que me fortaleceu nos momentos mais difíceis, não me deixando desistir, mesmo quando tudo parecia impossível, me apresentou pessoas que me ajudaram, meu deu a oportunidade de ter minha família e meus amigos. Sem Deus nada seria possível e esta vitória jamais teria sido alcançada. A Deus toda honra e toda glória!

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, investindo em mim todos os seus sonhos e acreditando que eu poderia realizá-los. Obrigada mãe por todas as suas orações, conselhos, preocupação, carinho, amor, paciência e por toda a educação que me proporcionou. Te amo, mãe!

À amiga Silvia, minha mãezinha de coração, agradeço não só pelo carinho, conselhos, amizade, companheirismo, incentivo, preocupação e dedicação, mas também por ter compartilhado comigo momentos de risos e choros, alegrias e tristezas e tantas confidências... Não sei o que teria sido de mim sem você. Agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida! Você é muito amada e tem lugar especial em meu coração. Te amo sempre!

À UENF pelo suporte financeiro e oportunidade de aqui desenvolver 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 em minha capacidade.

Ao prof<sup>o</sup> Milton Kanashiro pelo direcionamento na parte biológica, sempre se mostrando acessível e disposto a ensinar.

Aos professores Lara Fonseca Barbosa Siqueira, Milton Masahiko Kanashiro e Silvia Menezes de Faria Pereira por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho.

Ao ilustre Professor Raimundo Braz Filho pela elucidação estrutural das moléculas identificadas. Agradeço de coração pela sua disponibilidade em me ajudar, prestando uma valiosa contribuição a este trabalho.

À Almir Ribeiro de Carvalho Junior pela ajuda imprescindível nas análises químicas, principalmente, na Ressonância Magnética Nuclear. Obrigada pela paciência e boa vontade em disponibilizar seu tempo para me ensinar.

À Marcelo da Silva Mathias e Márcio Alves Pereira Júnior pelas análises químicas realizadas no de Análises Multifuncionais do Centro de Ciências e Tecnologias/UENF. Vocês me ajudaram muito! Muito obrigada!

Ào técnico José Acácio da Silva pelas análises de minerais realizadas no Laboratório de Fitotecnia, setor de Nutrição Mineral de Plantas.

À Raphael dos Santos Gomes pela colaboração com a análise de fibras.

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

Aos amigos de bancada Nathania Sá, Lorena Glória, Natalia Bernardes, Lucy Assis e Larissa Zambe pela amizade, companheirismo, apoio, momentos de descontração e risadas e por sempre estarem disponíveis nos momentos em que precisei tanto de ajuda nos experimentos, quando de um ombro amigo e de um carinho. Não teria conseguido sem a ajuda de vocês!

À top das tops, Marina Meirelles, pela ajuda fundamental na parte biológica. Obrigada por cada ensinamento, paciência e amizade. Você me ajudou muito!

Aos amigos do LTA: Aninha, João Barbosa, Simone Talma, Geraldo David, Diana Catalina, Euripedes, Lázaro, Darlielvia, Valdinéia, Lara Poses, Suellen

Alvarenga e Paulo. Muito obrigada pelos momentos de descontração, vocês são muito especiais e foram fundamentais para que eu pudesse aguentar a pressão!

Às meninas de casa, Dani (Daniely Marques) e Pat (Patrícia Rodrigues) agradeço por toda amizade, por aguentarem meu estresse e me ajudarem a recarregar as baterias! Também agradeço pelos inúmeros momentos de descontração, de risos e dificuldades que superamos juntas! Obrigada, meninas!

Enfim, agradeço 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>	Xiv
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	Xix
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES.....</b>	Xxi
<b>RESUMO.....</b>	Xxiii
<b>ABSTRACT.....</b>	Xxv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	01
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	03
2.1 Objetivo Geral.....	03
2.2 Objetivos Específicos.....	03
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	04
3.1 Alimentos Funcionais.....	04
3.2 Classes de Substâncias Biologicamente Ativas.....	05
3.3 Aspectos Nutricionais.....	07
3.3.1 Lipídios.....	11
3.3.2 Carboidratos.....	15
3.4 Radicais Livres <i>versus</i> Antioxidantes.....	19
3.5 Antioxidantes na Dieta.....	25
3.6 Métodos de Determinação da Atividade Antioxidante.....	29
3.7 Câncer.....	32

3.7.1 Aspectos gerais.....	32
3.7.2 Epidemiologia do Câncer.....	35
3.7.3 Tratamentos Antineoplásicos.....	37
3.8 Escolha do Material Vegetal.....	42
3.8.1 Descrição Botânica.....	43
3.8.1.1 Família Annonaceae.....	43
3.8.1.2 Espécie <i>Annona muricata</i> L.....	44
3.8.2 Propriedades Biológicas.....	46
3.8.3 Constituintes Químicos.....	48
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
4.1 Coleta de Material Vegetal e Identificação Botânica.....	52
4.2 Parte Química.....	53
4.2.1 Métodos Cromatográficos.....	53
4.2.1.1 Cromatografia em Camada Delgada.....	53
4.2.1.2 Cromatografia em Coluna.....	53
4.2.1.3 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas.....	54
4.2.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	55
4.2.2 Preparação do Extrato Aquoso e Frações.....	56
4.2.3 Fracionamento, Isolamento e Identificação de Substâncias.....	57
4.3 Análises de Parâmetros Físico-Químicos.....	60
4.3.1 Açúcares redutores.....	60
4.3.3 Ácido Ascórbico.....	62
4.3.3 Sólidos Solúveis - °Brix.....	63
4.3.4 Umidade.....	63
4.3.5 Proteínas.....	64
4.3.6 Fibras.....	64
4.3.7 Minerais .....	65
4.4 Atividade Antioxidante.....	65
4.4.1 Método de DPPH.....	65
4.4.2 Método de Redução do Ferro (FRAP).....	66
4.5 Parte Biológica.....	67

4.5.1	Cultura das linhagens de células de origem neoplásica.....	67
4.5.2	Avaliação do efeito citotóxico dos compostos frente às células neoplásicas por análise da viabilidade celular por metabolização do MTT	68
4.6	Análises Estatísticas.....	69
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
5.1	Análises dos Parâmetros Físico-Químicos.....	70
5.1.1	Açúcares Redutores.....	70
5.1.2	Ácido Ascórbico (Vitamina C).....	75
5.1.3	Sólidos Solúveis, Umidade, Fibras, Proteínas e Minerais..	77
5.2	Atividade Antioxidante.....	86
5.3	Fracionamento e Identificação .....	93
5.4	Elucidação Estrutural de AM-1 e AM-2.....	96
5.4.1	Espectro de Infravermelho.....	98
5.4.2	Técnicas Monodimensionais.....	99
5.4.2.1	RMN <sup>1</sup> H.....	99
5.4.2.2	RMN <sup>13</sup> C.....	101
5.4.3	Técnicas Bidimensionais.....	103
5.4.3.1	COSY <sup>1</sup> H - <sup>1</sup> H.....	103
5.4.3.2	HSQC.....	105
5.4.3.3	HMBC.....	106
5.5	Elucidação Estrutural de AM-3.....	111
5.5.1	Espectro de Infravermelho.....	114
5.5.2	Técnicas Monodimensionais.....	115
5.5.2.1	RMN <sup>1</sup> H.....	115
5.5.2.2	RMN <sup>13</sup> C.....	117
5.5.3	Técnicas Bidimensionais.....	119
5.5.3.1	COSY <sup>1</sup> H - <sup>1</sup> H.....	119
5.5.3.2	HSQC.....	120
5.5.3.3	HMBC.....	121
5.6	Elucidação Estrutural de AM-4.....	125
5.6.1	Espectro de Infravermelho.....	126

5.6.2 Técnicas Monodimensionais.....	127
5.6.2.1 RMN $^1\text{H}$ .....	128
5.6.2.2 RMN $^{13}\text{C}$ .....	130
5.6.3 Técnicas Bidimensionais.....	132
5.6.3.1 COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .....	132
5.6.3.2 HSQC.....	133
5.6.3.3 HMBC.....	135
5.7 Atividades Antineoplásicas.....	137
<b>6. RESUMO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>148</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>151</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química da vitamina C.....	6
<b>Figura 2:</b> Estrutura química básica dos ácidos graxos.....	12
<b>Figura 3:</b> Biossíntese de ácidos graxos.....	14
<b>Figura 4:</b> Esquema da síntese de carboidratos a partir de precursores simples.....	17
<b>Figura 5:</b> Estrutura básica dos flavonoides.....	29
<b>Figura 6:</b> Capacidades adquiridas pelas células tumorais.....	35
<b>Figura 7:</b> Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens (A) e por 100 mil mulheres (B), estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas).....	37
<b>Figura 8:</b> Produtos naturais e seus análogos usados na terapia antineoplásica.....	41
<b>Figura 9:</b> Fruto da gravioleira.....	44
<b>Figura 10:</b> Esquema da obtenção do extrato aquoso e frações a partir da polpa de <i>A. muricata</i> L.....	56
<b>Figura 11:</b> Esquema do fracionamento da FAcEt.....	58
<b>Figura 12:</b> Esquema do fracionamento da FB. ....	59
<b>Figura 13:</b> Gráfico da área do pico X massa (em mg/mL) injetada de glicose obtido a partir dos valores apresentados na Tabela 3.....	61

<b>Figura 14:</b> Gráfico da área do pico X massa (em mg/mL) injetada de frutose obtido a partir dos valores apresentados na Tabela 4.....	61
<b>Figura 15:</b> Gráfico da área do pico X massa (em mg/ml) injetada de ácido ascórbico obtido a partir dos valores apresentados na Tabela 5.....	63
<b>Figura 16:</b> Representação da reação do radical DPPH com um antioxidante (Flavonoide).....	66
<b>Figura 17:</b> Representação da reação FRAP mostrando a redução o complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) em complexo ferroso (FeII-TPZ).....	67
<b>Figura 18:</b> Cromatograma do padrão de glicose avaliado por CLAE.....	70
<b>Figura 19:</b> Cromatograma do padrão de frutose analisado por CLAE.....	71
<b>Figura 20:</b> Cromatograma da análise de açúcares identificados na polpa de <i>A. muricata L.</i> .....	71
<b>Figura 21:</b> Cromatograma do padrão ácido ascórbico em CLAE.....	76
<b>Figura 22:</b> Cromatograma de identificação da vitamina C presente na polpa da graviola por CLAE.....	76
<b>Figura 23:</b> Cromatograma do perfil químico da fração acetato de etila (FAcEt) avaliado por CLAE. C= 10 mg/mL.....	94
<b>Figura 24:</b> Cromatograma do perfil químico da fração butanólica (FB) avaliado por CLAE. C= 10 mg/mL.....	94
<b>Figura 25:</b> Esquema simplificado do processo de purificação da qual foram extraídas as moléculas AM-1, AM-2, AM-3 e AM-4.....	96
<b>Figura 26:</b> Cromatograma do perfil químico da substância AM-1 avaliado por CLAE (C= 5 mg/mL) com o espectro de absorção do ultravioleta.....	97
<b>Figura 27:</b> Cromatograma do perfil químico da substância AM-2 avaliado por CLAE (C= 5 mg/mL) com o espectro de absorção do ultravioleta.....	97
<b>Figura 28:</b> Espectro de Infravermelho da substância AM-1 e AM-2.....	98
<b>Figura 29:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de AM-1 e AM-2 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	99
<b>Figura 30:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de AM-1 e AM-2 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), com a expansão da região dos sinais entre 5,4 a 3,7 ppm.....	100

<b>Figura 31:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-1 e AM-2 (500 MHz, DMSO- $d_6$ ), com a expansão da região dos sinais entre 3,20 a 2,72 ppm. ....	100
<b>Figura 32:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-1 e AM-2 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	102
<b>Figura 33:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (500 MHz; DMSO- $d_6$ ) de AM-1 e AM-2 com a expansão dos sinais entre 78,5 a 66,5 ppm.....	102
<b>Figura 34:</b> Estrutura química dos isômeros identificados: $\alpha$ -D-glicopirranose e $\beta$ -D-glicopirranose.....	103
<b>Figura 35:</b> Espectro de RMN 2D- COSY para AM-1 e AM-2 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	104
<b>Figura 36:</b> Espectro de RMN 2D- COSY para AM-1 e AM-2 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ) com a expansão da região dos sinais entre 5,4 e 1.6 ppm.....	104
<b>Figura 37:</b> Expansão do espectro de RMN -2D HSQC para AM-1 e AM-2 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	105
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN-2D HSQC para AM-1 e AM-2(500 MHz; DMSO- $d_6$ ) com expansão da região entre 4,3 ppm e 2,7 ppm.....	106
<b>Figura 39:</b> Espectro de RMN-2D HMBC para AM-1 e AM-2 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	107
<b>Figura 40:</b> Expansão do espectro de RMN-2D HMQC para AM-1 e AM-2 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	107
<b>Figura 41:</b> Cromatograma do perfil químico da substância AM-3 avaliado por CG-MS com a respectiva ampliação da área dos picos.....	111
<b>Figura 42:</b> Espectro das substâncias presentes em AM-3 avaliado por CG-MS, faixa de aquisição de massa: 40-400u.....	112
<b>Figura 43:</b> Proposta de rota de fragmentação para o ácido palmítico.....	113
<b>Figura 44:</b> Proposta de rota de fragmentação para o ácido oleico.....	113
<b>Figura 45:</b> Espectro de Infravermelho da substância AM-3.....	115
<b>Figura 46:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-3 (500 MHz, DMSO- $d_6$ ).....	116
<b>Figura 47:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-3 (500 MHz, DMSO- $d_6$ ), com a expansão da região dos sinais entre 1,85 a 2,55 ppm.....	117
<b>Figura 48:</b> Espectro de RMN APT de AM-3 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	118
<b>Figura 49:</b> Expansão do espectro de RMN APT (500 MHz; DMSO- $d_6$ ) de	118

AM-3 (de 175,1 a 130,0 ppm).....	
<b>Figura 50:</b> Estrutura química das moléculas identificadas: ácido oleico (A) e ácido palmítico (B).....	119
<b>Figura 51:</b> Espectro de RMN 2D- COSY para AM-3 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	120
<b>Figura 52:</b> Espectro de RMN-2D HSQC para AM-3 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	121
<b>Figura 53:</b> Espectro de RMN-2D HMBC para AM-3 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	122
<b>Figura 54:</b> Espectro da substância AM-4 avaliado por CG-MS, faixa de aquisição de massa: 40-400u.....	125
<b>Figura 55:</b> Proposta de rota de fragmentação para dietil-ftalato.....	126
<b>Figura 56:</b> Espectro de Infravermelho da substância AM-4.....	127
<b>Figura 57:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-4 (500 MHz, DMSO- $d_6$ ).....	129
<b>Figura 58:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-4 (500 MHz, DMSO- $d_6$ ), com a expansão da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos.....	129
<b>Figura 59:</b> Espectro de RMN APT de AM-4 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	131
<b>Figura 60:</b> Estrutura química da molécula dietil-ftalato identificada na fração butanólica. ....	132
<b>Figura 61:</b> Espectro de RMN 2D- COSY para AM-4 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	133
<b>Figura 62:</b> Espectro de RMN-2D HSQC para AM-4 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	134
<b>Figura 63:</b> Expansão do espectro de RMN -2D HSQC para AM-4 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	134
<b>Figura 64:</b> Espectro de RMN-2D HMBC para AM-4 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	135
<b>Figura 65:</b> Avaliação da viabilidade celular da linhagem leucêmica U937, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias AM-1, AM-2, AM-3 e AM-4. O branco significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (branco).....	138
<b>Figura 66:</b> Avaliação da viabilidade celular da linhagem carcinoma de pulmão H-460, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias AM-1, AM-2, AM-3 e AM-4. O branco significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo	139

(branco).....

**Figura 67:** Avaliação da viabilidade celular da linhagem leucêmica U-937, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com os padrões ácido oleico e palmítico. O branco significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (branco).....

141

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais ácidos graxos registrados na literatura.....	13
<b>Tabela 2:</b> Vantagens e desvantagens dos principais métodos antioxidantes....	31
<b>Tabela 3:</b> Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer segundo a região.	36
<b>Tabela 4:</b> Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE.....	55
<b>Tabela 5:</b> Sistema de solventes utilizado na cromatografia em coluna aberta aplicado nas frações.....	57
<b>Tabela 6:</b> Dados de massa (em mg/mL) injetada de glicose e as respectivas áreas obtidas.....	60
<b>Tabela 7:</b> Dados de massa (em mg/mL) injetada de frutose e as respectivas áreas obtidas.....	61
<b>Tabela 8:</b> Dados de massa (em mg/mL) injetada de ácido ascórbico e as respectivas áreas obtidas.....	62
<b>Tabela 9:</b> Teor de glicose e frutose identificado na polpa de graviola.....	72
<b>Tabela 10:</b> Quantificação dos parâmetros físico-químicos (g/100g de amostra) e sólidos solúveis (°Brix).....	78
<b>Tabela 11:</b> Minerais quantificados em <i>Annona muricata L.</i> .....	83
<b>Tabela 12:</b> Atividade antioxidante pelo método do DPPH em comparação com os padrões de referência quercetina, rutina, apigenina e BHT.....	87
<b>Tabela 13:</b> Atividade antioxidante pelo método do FRAP em comparação com os padrões fenólicos quercetina, rutina, apigenina.....	89

<b>Tabela 14:</b> Sinais de carbono de AM-1 e AM-2 ( $\alpha$ -D-glicopiranoose e $\beta$ -D-glicopiranoose) e suas correlações.....	108
<b>Tabela 15:</b> Sinais de carbono de AM-3 (ácido oleico e ácido palmítico) e suas correlações.....	123
<b>Tabela 16:</b> Sinais de $^1\text{H}$ listados para a substância AM-4.....	130
<b>Tabela 17:</b> Sinais de carbono de AM-5 e suas correlações.....	136
<b>Tabela 18:</b> Valores de $\text{EC}_{50}$ para a atividade antineoplásica de AM-1, AM-2, AM-3 e AM-4 frente às células tumorais de linhagem H-460 e U-937.....	140

## LISTA DE ABREVIações

AA	Atividade Antioxidante
APT	Attached Proton Test
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCL <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
<i>c</i> /NOS	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
EPA	Ácido Eicosapentanoico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
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. DSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março de 2015. Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antineoplásica de *Annona muricata* L. Professora Orientadora: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc.; Banca Avaliadora: Lara Fonseca Barbosa Siqueira, D.Sc.; Milton Masahiko Kanashiro, 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 e com o Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. O objetivo deste trabalho foi ampliar o conhecimento acerca do perfil químico da polpa dos frutos de *Annona muricata* L., investigando também seus parâmetros físico-químicos, bem como identificar as substâncias bioativas presentes no âmbito de ação antineoplásica, o que em tese pode justificar seu uso popular como alimento funcional. Para a obtenção do extrato aquoso, a polpa dos frutos 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 identificar as substâncias presentes. O conhecimento do perfil químico a partir da purificação do extrato aquoso conduziu à identificação de AM-1 e AM-2 ( $\alpha$ -D-glicopiranosose e  $\beta$ -D-glicopiranosose), AM-3 (ácido palmítico e ácido oleico) e AM-4 (dietil-ftalato). O

extrato aquoso, o sobrenadante e os padrões químicos foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante por metodologias distintas (DPPH e FRAP) e observou-se que ocorre intensificação da capacidade de sequestro de radicais livres com a purificação. A partir das análises físico-químicas identificou-se como carboidratos presentes na polpa dos frutos a glicose (2,047 g/100g) e a frutose (2,892 g/100g), o teor estimado de vitamina C com base na curva padrão foi de 2,17mg/100g e o percentual de umidade foi de 85,1%. O teor de proteína bruta “*in natura*” foi de 0,91 g/100g, enquanto que o de proteína bruta seca foi de 6,5 g/100g. Já o valor estimado de fibras foi de 1,7 g/100g e 11,57 g/100g para amostra “*in natura*” e seca, respectivamente. Os sólidos solúveis foram 13,2 °Brix. Foram detectados os minerais: Ca (1,2 g/Kg), Cu (4,9 mg/Kg), Fe (19,9 mg/Kg), K (1,2 mg/Kg), Mg (1,2 g/Kg), Mn (5,2 mg/Kg), P (1,2 g/Kg), Zn (4,5 mg/Kg) e B (7,8 mg/Kg), sobressaindo-se o boro pelo seu elevado teor encontrado, bem como pela sua relação com a prevenção da osteoporose e atividade antineoplásica, dentre outras funções. Nos ensaios para análise da atividade antineoplásica verificou-se que apenas AM-3 e AM-4 provocaram a morte celular nas linhagens testadas, sendo que em um *screening* realizado verificou-se que esta atividade ocorreu também nas frações que originaram AM-3 e AM-4, sendo que durante o processo de purificação houve a intensificação do efeito biológico de morte celular. Logo, pode-se verificar que os ácidos oleico e palmítico, bem como o dietil-ftalato, interferem na viabilidade celular em células tumorais. Diante dos resultados obtidos pode-se inferir que há fundamento na utilização popular da *A. muricata* para o tratamento de neoplasias e que esta utilização deve ser concomitante aos tratamentos tradicionais (quimioterapia e radioterapia) e realizada com cautela, sendo necessários mais estudos para a averiguação e o isolamento de todas as substâncias presentes nos frutos de *A. muricata* L. que possam corroborar para a definição deste alimento como funcional.

**Palavras-chaves:** *Annona muricata* L.; antineoplásica, físico-químico, identificação.

## ABSTRACT

REIS, C.N. DSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February of 2011; *Annona muricata* L.: Chemical and biological analysis of soursop fruit; Professor Advisor: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc.; Banking Appraiser: Lara Fonseca Barbosa Siqueira. D.Sc.; Milton Masahiko Kanashiro, D.Sc.; Silvia Menezes de Faria Pereira, D.Sc..

This work was carried out in the Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, together with Laboratório de Biologia do Reconhecer do Centro de Biociências e Biotecnologia and with Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias in Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. The objective was to increase knowledge about the chemical profile of the pulp of the fruit of *Annona muricata* L., also investigating their physico-chemical parameters and identify the bioactive substances in the sphere of action antineoplastic, which in theory can justify their popular use as a functional food. To obtain the aqueous extract, fruit pulp was separated from the seeds and husks and subjected to extraction with water at a ratio of 75% (w / v). The chromatographic fractionations were performed in order to identify the substances. The knowledge of the chemical profile from the purification of the aqueous extract led to the identification of AM-1 and AM-2 ( $\alpha$ -D-glucopyranose and  $\beta$ -D-glucopyranose), AM-3 (palmitic and oleic acid) and AM-4 (diethyl phthalate). The aqueous extract, supernatant and chemical patterns were

evaluated for their antioxidant activity by different methodologies (DPPH and FRAP) and observed to occur intensification of sequestration capacity of free radicals with purification. From the physico-chemical analysis identified as carbohydrates present in the pulp to glucose (2,047 g / 100g) and fructose (2.892 g / 100 g), the estimated content of vitamin C based on the standard curve was 2,17mg / 100g and the moisture percentage was 85.1%. The crude protein "in nature" was 0.91 g / 100g, while the dry crude protein was 6.5 g / 100g. Since the estimated value of fiber was 1.7 g / 100 g and 11.5 7 g / 100g sample to "fresh" and dry, respectively. Soluble solids were 13.2 ° Brix. Minerals were detected: Ca (1.2 g / kg) Cu (4.9 mg / kg) Fe (19.9 mg / kg), K (1.2 mg / kg), Mg (1.2 g / kg), Mn (5.2 mg / kg), P (1.2 g / kg) Zn (4.5 mg / kg) and B (7.8 mg / kg) jutting boron- for its high content found as well as its relationship with the prevention of osteoporosis and antineoplastic activity, among other functions. In assays for anticancer activity analysis it was found that only 3-AM and AM-4 have resulted in cell death in the tested strains, whereas in a screening conducted we found that this activity was also in fractions yielded AM-3 and AM-4, and during the purification process was intensifying the biological effect of cell death. Therefore, it can be seen that oleic acid and palmitic acid, as well as diethyl phthalate, interfere with cell viability in tumor cells. Based on these results it can be inferred that there are grounds in the popular use of *A. muricata* for the treatment of cancer and that this use should be concomitant to traditional treatments (chemotherapy and radiotherapy) and carefully performed, more research is needed to investigate and isolation of all substances in fruits of *A. muricata* L. that may corroborate to the definition of food as functional.

**Keywords:** *Annona muricata* L .; antineoplastic , physical and chemical identification.

## 1. INTRODUÇÃO

Inúmeros fatores afetam a qualidade da vida moderna, de forma que a população deve conscientizar-se da importância de alimentos que contêm substâncias que auxiliam a promoção da saúde, trazendo uma melhora não só ao estado nutricional, mas também atenuando de forma bastante eficaz a redução dos custos com a saúde e a incidência de doenças, tais como os alimentos funcionais.

Os alimentos funcionais são compostos por substâncias biologicamente ativas que podem estimular processos metabólicos reduzindo o risco de enfermidades, além de fornecer nutrientes e energia. Para oferecer efeitos positivos, os alimentos funcionais devem fazer parte da alimentação diária, para que as moléculas ativas se mantenham constantemente presentes no organismo (Perin & Zanardo, 2013). Além disso, representam uma área interessante para a indústria assim como para a ciência e tecnologia de alimentos, pois também podem atuar na redução dos riscos de doenças como o câncer (Souza et al., 2013; Annunziata & Vecchio, 2011).

Os tipos de câncer que se relacionam aos hábitos alimentares estão entre as primeiras causas de mortalidade. Alguns fatores de risco são passíveis de prevenção e modificáveis através de alterações no estilo de vida, incluindo a dieta. A quimioprevenção, por meio dos alimentos funcionais, surge como um promissor instrumento de prevenção por meio de possíveis mecanismos de ação anticarcinogênica. Contudo, evidências apontam uma associação entre a ingestão de alimentos funcionais e o risco de câncer, devido ao possível efeito protetor das

substâncias bioativas presentes nestes alimentos advindos do metabolismo vegetal, tais como os ácidos graxos e as moléculas antioxidantes (Perin & Zanardo, 2013).

O metabolismo vegetal é dividido didaticamente em metabolismo primário e secundário. Admite-se que os carboidratos, os lipídios, as proteínas e os ácidos nucléicos, que são essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário. Os metabólitos primários têm sido investigados por estarem relacionados com a inibição da atividade antineoplásica, possuindo ação antioxidante e nutricional (Rodrigues et al., 2012, Taiz e Zeiger, 2006).

Nesse contexto, a busca por substâncias com potencial antioxidante está em ascensão, visto que estas substâncias são responsáveis pela remoção ou inibição de radicais livres, sendo de grande importância para a indústria alimentícia, onde atuam principalmente reduzindo as perdas nutricionais, protegendo os alimentos da oxidação e auxiliando no tratamento antineoplásico (Newman et al., 2012). Além disso, os antioxidantes também têm sido relacionados com a diminuição de efeitos colaterais advindos do uso de fármacos antitumorais (Antunes & Bianchi, 2004).

De fato, os alimentos contêm metabólitos com grandes potenciais, o que intensifica a busca por substâncias obtidas a partir de fontes vegetais. Contudo, para a maioria das espécies frutíferas, estudos químicos e biológicos ainda são escassos (Ministério do Meio Ambiente, 2013; Pan et al., 2009; Cragg et al., 2009; Muller, 2006; Kim et al., 2004; Pinto et al., 2002; Srivastava et al., 2000). Assim, há uma crescente intensificação na pesquisa de plantas frutíferas, dentre as quais se destacam as Anonáceas, sendo a espécie *Annona muricata* L. (graviola) de grande interesse no âmbito nacional e internacional (Moraes, 2013). A graviola possui substâncias com ação antioxidante, além de micro e macronutrientes que são fundamentais na dieta. Além disso, possui carboidratos e ácidos graxos em sua composição, os quais são nutrientes essenciais, pois favorecem a síntese energética, conferem atributos sensoriais aos alimentos e trazem benefícios à saúde estando relacionados com a ação antioxidante e antitumoral (Rodrigues et al., 2012).

Logo, o avanço no conhecimento químico de seus frutos sob o enfoque biológico, principalmente em seu efeito antineoplásico, poderá incentivar a comercialização desses frutos. Desta forma, o enfoque principal desta pesquisa é aprofundar os estudos sob a composição química da polpa da graviola, avaliando os parâmetros físico-químicos, a atividade antioxidante, bem como identificar as substâncias que possuam atividade antineoplásica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Ampliar o conhecimento acerca do perfil químico da polpa dos frutos de *Annona muricata L.*, investigando também seus parâmetros físico-químicos, bem como identificar as substâncias bioativas presentes no âmbito de ação antineoplásica.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil químico da polpa dos frutos de *A. muricata L.*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato e frações advindos do processo de purificação por diferentes métodos;
- Determinar os parâmetros físico-químicos;
- Identificar os compostos bioativos presentes nos frutos;
- Investigar a atividade biológica através da capacidade das diferentes frações e substâncias em inibir as células de diferentes linhagens tumorais.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Os 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., 2011; IFIC, 2006). Alguns alimentos funcionais contêm como substâncias: as alicinas encontradas no alho, os carotenoides (substâncias isoprênicas) e flavonoides (substâncias fenólicas) encontrados em frutas e vegetais, os glucosinolatos presente nos vegetais crucíferos e os ácidos graxos encontrados em óleos vegetais e óleo de peixe, bem como as gorduras presentes em frutas como o abacate e cacau (Roberfroid, 2002; Rocha et al., 2001).

Os 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., 2011; 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 investigação quanto aos possíveis alimentos funcionais serem peça chave na diminuição do risco de doenças e na promoção de qualidade de vida (ABIA, 2010).

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. Além do que, as 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, compostos fenólicos, vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados e fibras (Ravishankar et al., 2012; Spada et al., 2008; Rodríguez et al., 2003; Fang & Liu, 2002; 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 & 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).

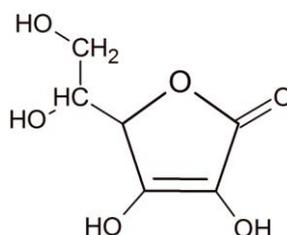
Os alimentos sulfurados e nitrogenados são compostos orgânicos usados na proteção contra a carcinogênese e mutagênese, sendo ativadores de enzimas na detoxificação do fígado. Os isotiocianatos e indóis são compostos antioxidantes que estão presentes também em crucíferas, tais como brócolis, couve e repolho (Anjo, 2004).

Os pigmentos naturais são provenientes do metabolismo secundário das espécies vegetais, com estruturas e propriedades químicas e físicas diferenciadas, e

agrupados de acordo com suas estruturas químicas em: substâncias heterocíclicas tetrapirrólica, substâncias com estrutura isoprênica, betalaínas, substâncias quinoidais, taninos e os flavonoides (substâncias fenólicas) (Campos, 2008).

Os compostos fenólicos, por sua vez, compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana e apresentam características anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antitrombóticas, antivirais, antimicrobianas, vasodilatadoras, imunomodulatórias e analgésicas. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os ácidos fenólicos, fenóis simples, flavonoides, cumarinas, taninos hidrolisáveis, ligninas e tocoferóis, os quais possuem atividade antioxidante comprovada (Angelo et al., 2007). O potencial antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura, incluindo não somente sua polaridade, como também a natureza e a posição dos grupos constituintes na sua estrutura (Fabri, 2008).

Já as vitaminas são substâncias orgânicas que desempenham um importante papel na manutenção do bem-estar no nosso dia-a-dia, sendo requeridas em concentrações muito reduzidas, para muitos dos processos essenciais do organismo. Ao ajudarem a proteger o sistema imunitário, apresentam benefícios para a saúde cada vez mais relevantes, bem como são cofatores em atividades enzimáticas e antioxidantes. A vitamina C (ácido ascórbico) é classificada como hidrossolúvel e é, geralmente, adicionada a produtos alimentares para inibir a formação de metabólitos nitrosos carcinogênicos (Figura 1). Os benefícios obtidos de sua utilização terapêutica incluem o efeito protetor contra os danos causados pela exposição às radiações e pelos medicamentos, e um possível papel de proteção no desenvolvimento de tumores em humanos (Alberts et al., 2010; Moraes et al., 2006).



**Figura 1:** Estrutura química da vitamina C.

Os ácidos graxos poli-insaturados, 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 eicosapentanoico (EPA) e o docosahehexanóico (DHA), enquanto que na família ômega 6 destacam-se o ácido linoleico 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).

Já as fibras são substâncias com alto peso molecular, encontradas nos vegetais, como os grãos, em verduras, raízes e outras hortaliças. As fibras são resíduos de células vegetais que não são digeridas pelo homem, não fornecendo calorias. São compostas de celulose, oligossacarídeos, pectinas, gomas e ceras. Em concentração insuficiente na alimentação, por um período de tempo demasiado, pode levar ao surgimento de doenças crônicas, tais como constipação intestinal, doenças cardiovasculares e câncer de intestino (Trowell & Burkitt, 1986).

Vale a pena mencionar que 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).

Em especial, os metabólitos primários, além de ação nutricional, têm sido investigados por estarem relacionados com a inibição da atividade antineoplásica e atividade antioxidante (Rodrigues et al., 2012, Taiz e Zeiger, 2006).

### **3.3 Aspectos Nutricionais**

Os padrões alimentares dos indivíduos são responsáveis pela grande maioria dos problemas atuais de saúde e conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), a má nutrição, a qual inclui tanto a subnutrição quanto as deficiências específicas e o excesso de ingestão de alimentos, continua persistindo em todos os países. Dados da OMS também indicam que enquanto 800 milhões de pessoas não chegam a cobrir suas necessidades básicas de energia e proteína, outro contingente

de 600 milhões sofre com as consequências de uma alimentação inadequada (Moraes, 2013; Leterme et al., 2006).

Nesse contexto, percebe-se que a deficiência nutricional é uma das maiores preocupações, requerendo atenção no âmbito da saúde pública. De acordo com Leterme et al. (2006), a ingestão regular de frutas e verduras minimiza o risco de doenças crônicas não transmissíveis como cardiovasculares, câncer, diabetes, hipertensão.

Recentemente, ocorre maior ênfase nas pesquisas acerca de micronutrientes, pois se acredita que muitos problemas de saúde estão relacionados, pelo menos em parte, à insuficiência de determinados micronutrientes. Pesquisas comprovam que as frutas e verduras possuem uma riqueza nutricional em vitaminas A e C, minerais, fibras e várias moléculas provenientes do metabolismo secundário (Moraes, 2013; Smolin & Grosvenor, 2007).

No entanto, o que se nota é que os hábitos dietéticos estão orientados por alimentos ricos em gordura, sal e açúcar, e pobres em carboidratos complexos, vitaminas e minerais, o que leva a um aumento no risco de doenças como obesidade, diabetes, problemas cardiovasculares, hipertensão, osteoporose e câncer. Acredita-se que prevenção dessas doenças está relacionada com a ingestão de frutas e vegetais. As frutas são importantes componentes de dieta, responsáveis por proporcionar uma variedade de cor e textura às refeições, bem como por proporcionar nutrientes essenciais. São alimentos com baixo teor de lipídios (gordura) e baixo teor calórico, com concentrações relativamente pequenas de proteínas e carboidratos, porém ricas em fibras e diversos micronutrientes significativos para a dieta humana (Zhi et al., 2003).

As proteínas são componentes primordiais das células vivas e são resultantes da condensação de aminoácidos, com formação da ligação peptídica (Pinheiro et al., 2005). Os alimentos ricos em proteína são obtidos primariamente da carne ou de produtos de origem animal, tais como leite e ovos. Essas substâncias dispõem de uma série de funções biológicas como: regeneração de tecidos; catalisadores nas reações químicas que se dão nos organismos vivos e que envolvem enzimas ou hormônios; são necessárias nas reações imunológicas e, juntamente com ácidos nucleicos, são indispensáveis nos fenômenos de crescimento e reprodução, entre outras (Ng et al., 2010).

Logo, o valor nutricional das proteínas alimentares está relacionado ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais, associado à sua digestibilidade. São comumente encontrados na natureza 20 aminoácidos que podem ser classificados como essenciais e não essenciais. Os aminoácidos essenciais são aqueles que o organismo não é capaz de sintetizar e por isso devem ser incluídos na dieta, são eles: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Em contrapartida, os aminoácidos não essenciais são aqueles que o organismo consegue produzir e como exemplo tem-se: alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, prolina, serina e tirosina (Hammond & Jez, 2011).

Entre os nutrientes encontrados nos frutos, os minerais constituem uma classe de substâncias inorgânicas presente em todos os tipos. O corpo humano precisa de cerca de 20 minerais diferentes para funcionar adequadamente. Estes elementos podem ser classificados em macro e microminerais, sendo indispensáveis à manutenção da vida, ao crescimento e à reprodução (Spada et al., 2010)

De acordo com a IDR (Ingestão Dietética de Referência), que são valores numéricos estimados de consumo de nutrientes para uso no planejamento e avaliação de dietas para pessoas aparentemente saudáveis (Amaya-Farfan et al., 2001), os macrominerais são necessários em concentrações superiores a 100 mg/dia para a população adulta e incluem cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na), cloro (Cl) e potássio (K). Os microminerais, necessários em concentrações inferiores a 100 mg/dia para a população adulta, incluem elementos tais como o ferro (Fe), zinco (Zn), iodo (I), selênio (Se), manganês (Mn), cromo (Cr), cobre (Cu), molibdênio (Mo), flúor (F), boro (B), cobalto (Co), silício (Si), alumínio (Al), arsênio (As), estanho (Sn), lítio (Li) e níquel (Ni) (Spada, 2010).

O organismo humano possui em sua constituição elementar 96% de sua parte sólida formada pelos compostos de hidrogênio, carbono, oxigênio e nitrogênio, os quais constituem os chamados princípios imediatos: água, proteínas, carboidratos e lipídios. Os 4% restantes são formados pelos minerais, sendo que somente cálcio (1,5%) e fósforo (1%) respondem por 2,5%, cabendo ao 1,5% restante todos os demais minerais. Logo, o corpo humano, em condições normais, excreta diariamente de 20 a 30 g de minerais e necessita de reposição imediata por meio da alimentação (Franco, 2004).

O enxofre (S) é encontrado no organismo como um constituinte de três aminoácidos, cistina, cisteína e metionina, e de muitas outras moléculas orgânicas. É também um componente essencial de três vitaminas: tiamina, biotina e ácido pantotênico. O fósforo (P), como fosfato, participa de várias funções essenciais do corpo: o DNA e o RNA são baseados no fosfato; a principal forma celular de energia, o ATP, contém ligações de fosfato de alta energia; como parte dos fosfolípidos, o fósforo está presente em cada membrana celular do corpo. O potássio (K) está envolvido na manutenção do equilíbrio hídrico normal, equilíbrio osmótico e o equilíbrio ácido-base; juntamente com o cálcio, é importante na regulação da atividade neuromuscular e promove o crescimento celular, além de prevenir a hipertensão. A ingestão adequada de cálcio (Ca) é necessária para permitir ganhos ótimos na massa e densidade óssea nos anos pré-puberais e da adolescência, sendo que doses adicionais são recomendadas para atender às demandas da gravidez e lactação; além de sua função na construção e manutenção de ossos e dentes, o Ca também tem uma série de papéis metabólicos nas células de todos os outros tecidos. O magnésio (Mg) desempenha um importante papel na transmissão e atividade neuromuscular (Moraes, 2013).

O boro (B) está associado à manutenção da membrana celular. O cobre (Cu) apresenta maiores concentrações no fígado, cérebro, coração e rim e é um componente de muitas enzimas. O manganês (Mn) também é um componente de muitas enzimas e está associado à formação de tecidos conjuntivo e esquelético, ao crescimento, à reprodução e ao metabolismo de carboidratos e lipídios. O ferro (Fe) está envolvido em muitos aspectos da vida, inclusive na função das hemácias, na atividade de mioglobina e nos papéis de várias enzimas (prevenindo a anemia); possui papel no transporte sanguíneo e respiratório de oxigênio e dióxido de carbono. O zinco (Zn) participa de reações que envolvem ou a síntese ou a degradação de metabólitos principais (carboidratos, lipídeos, proteínas) e ácidos nucleicos; desempenha papéis estruturais importantes como componente de diversas proteínas e funciona como um sinalizador intracelular nas células cerebrais, estando envolvido na estabilização de estruturas de proteínas e ácidos nucleicos e na integridade de organelas subcelulares, assim como nos processos de transporte, função imune e expressão da informação genética (Biesek et al, 2010).

Portanto, o conhecimento dos macro e microminerais presentes na polpa da graviola, diante das suas funções para manutenção da saúde do organismo,

favorece o aumento do interesse no consumo da fruta, pois a população está cada vez mais preocupada com a relação entre dieta e saúde, associada à prevenção de diversas doenças, principalmente aquelas classificadas como crônicas não transmissíveis: câncer, *diabetes mellitus*, hipertensão, cardiopatia, e outras (Moraes, 2013). Por isso, neste trabalho de pesquisa terão maior enfoque os lipídios e os carboidratos presentes em *A. muricata* L.

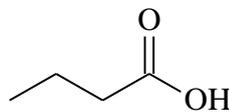
### 3.3.1 Lipídios

O termo “lipídio” pode ser definido como uma classe de compostos orgânicos que são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos (acetona, éter e clorofórmio). São compostos altamente energéticos e atuam como transportadores das vitaminas lipossolúveis. Os lipídios simples são conhecidos como óleos e gorduras, que só diferem entre si na aparência física, uma vez que à temperatura ambiente, os óleos têm aspecto líquido e as gorduras aspecto pastoso ou sólido. Já os lipídios compostos abrangem os fosfolipídios, as ceras, entre outros, e os derivados, como os ácidos graxos e esteróis (Fahy et al., 2011).

Também podem ser classificados quanto ao comprimento da cadeia de carbono e quanto à saturação da cadeia. As gorduras saturadas estão relacionadas ao aumento do nível de colesterol sanguíneo enquanto que as gorduras insaturadas estão envolvidas com a diminuição dos níveis de colesterol total no sangue, atuando principalmente na redução de colesterol ruim. A substituição da ingestão de gorduras saturadas, presentes em maior concentração em alimentos de origem animal, pelas insaturadas está relacionada ao efeito protetor contra o surgimento de doenças coronarianas (Manhães, 2007).

Os lipídios constituem um grupo de diversos compostos que possuem muitas funções biológicas importantes, tais como função estrutural em membranas celulares e fontes de armazenamento de energia, participando também de vias de sinalização (Fahy et al., 2011). Os teores de lipídios de fontes vegetais têm atraído a atenção dos pesquisadores devido às suas propriedades específicas que possibilitam que esses compostos orgânicos possam ter a função de agente emulsionante para uma ampla variedade de produtos que vão desde vacinas, alimentos, cosméticos e produtos de cuidados pessoais (Adams et al., 2012).

A maioria dos tipos de lipídios no organismo é derivada dos ácidos graxos e em segundo plano dos colesterolis. Ácidos graxos (Figura 2) são ácidos monocarboxílicos de cadeia normal que apresentam o grupo carboxila ( $-\text{COOH}$ ) ligado a uma longa cadeia alquílica, saturada ou insaturada. Como nas células vivas dos animais e vegetais os ácidos graxos são produzidos a partir da combinação de acetilcoenzima A (acetil Co-A), a estrutura destas moléculas contém números pares de átomos de carbono. Mas existem também ácidos graxos ímpares, apesar de mais raros (Melo Filho & Vasconcelos, 2011).



**Figura 2:** Estrutura química básica dos ácidos graxos (Adams et al., 2012).

Em relação à cadeia carbônica, os ácidos graxos podem ter somente ligações simples (saturados) ou apresentar uma ou mais duplas ligações (insaturados). Os sufixos -oleico, -linoleico e -linolênico são acrescentados no nome da molécula quando ela possui 1, 2 ou 3 insaturações (Tabela 1).

Na biossíntese de lipídios (Figura 3), a glicose presente no interior da célula entra no ciclo da glicólise, desse modo gerando ácido pirúvico, esse ácido acaba sendo convertido em acetil coenzima A e malonil Co-A. Assim, a síntese dos ácidos graxos começa com a carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA. Essa reação irreversível é a etapa de controle da síntese dos ácidos graxos. A síntese de malonil-CoA é catalisada pelo complexo multienzimático acetil-CoA carboxilase, que contém biotina como grupamento prostético. A carboxila da biotina é ligada covalentemente ao grupamento -amina de uma lisina. A acetil-CoA carboxilase é separada em três grupos funcionais contendo: a) a proteína transportadora de biotina; b) a biotina carboxilase, que ativa o  $\text{CO}_2$  pela sua ligação a um átomo de nitrogênio no anel da biotina em uma reação dependente de ATP e c) a transcarboxilase, que transfere o  $\text{CO}_2$  ativado da biotina para acetil-CoA, produzindo malonil-CoA (Melo Filho & Vasconcelos, 2011; Lehninger et al., 2002).

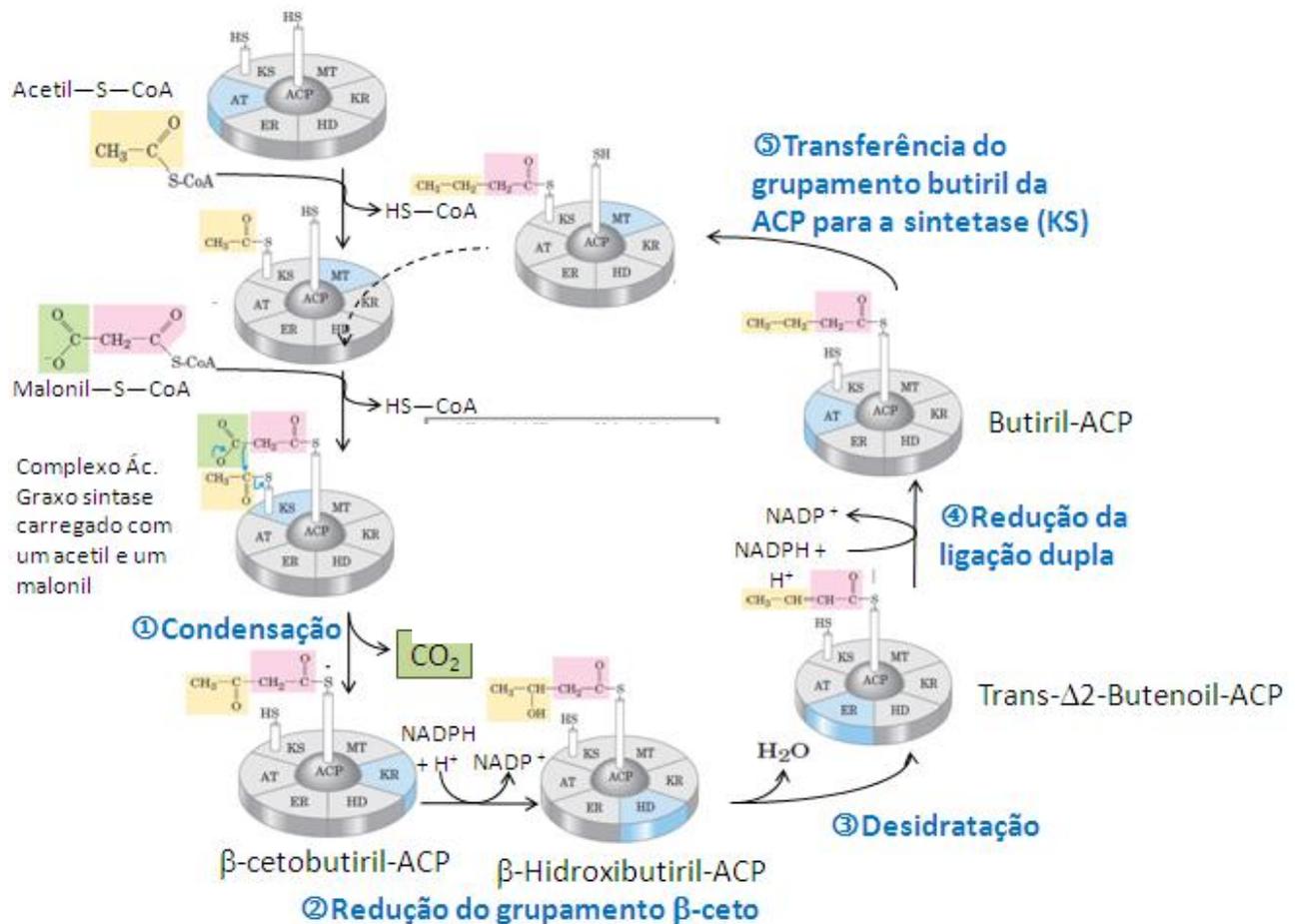
**Tabela 1:** Principais ácidos graxos registrados na literatura.

<b>Esqueleto carbônico</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Nome sistemático dos ácidos</b>	<b>Nome comum</b>
12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Ác. <i>n</i> -dodecanoico	Ác. Láurico
14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Ác. <i>n</i> -tetradecanoico	Ác. Mirístico
16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Ác. <i>n</i> -hexadecanoico	Ác. Palmítico
18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Ác. <i>n</i> -octadecanoico	Ác. Estearico
20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Ác. <i>n</i> -eicosanoico	Ác. Araquídico
24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	Ác. <i>n</i> -tetracosanoico	Ác. Lignocérico
16:1( $\Delta^9$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ác. <i>cis</i> -9-hexadecenoico	Ác. Palmitoleico
18:1( $\Delta^9$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ác. <i>cis</i> -9-octadecenoico	Ác. Oleico
18:2( $\Delta^{9,12}$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ác. <i>cis</i> -, <i>cis</i> -9,12-octadecadienoico	Ác. Linoleico
18:3( $\Delta^{9,12,15}$ )	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ác. <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	Ác. $\alpha$ -linolênico
20:4( $\Delta^{5,8,11,14}$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH} \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Ác. <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -5,8,11,14-icosatetraenoico	Ác. araquidônico

Melo Filho &amp; Vasconcelos, 2011; Beltrão &amp; Oliveira, 2007; Lehninger et al., 2002.

Após, a cadeia de reações prossegue com as etapas de condensação, redução, desidratação e redução de dupla ligação. Na condensação ocorre a formação de acetoacetyl-ACP a partir do malonil e acetil. Em continuidade, acontece a transferência de 2 carbonos de malonil para o acetil onde há formação de cetoacetyl-ACP. Depois, ocorre a redução de acetoacetyl e formação de D- $\beta$ -hidroxibutiril-ACP. Nessa etapa é utilizado NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Após, ocorre a etapa de desidratação onde há eliminação de H<sub>2</sub>O do D- $\beta$ -hidroxibutiril-ACP e liberação de trans $\Delta^2$ butenoil-AC e por fim acontece a etapa de redução de dupla ligação onde a dupla ligação de trans $\Delta^2$ butenoil-ACP é reduzida havendo a formação de 4 átomos de carbono saturados (Beltrão & Oliveira, 2007; Lehninger et al., 2002).

Assim o ciclo segue, tendo no final, a sua cadeia aumentada em 2 átomos de carbono e volta para o início, onde o malonil é ligado ao grupo -SH vazio da fosfopantoteína da ACP (Beltrão & Oliveira, 2007; Lehninger et al., 2002).



**Figura 3:** Biossíntese de ácidos graxos (Beltrão & Oliveira, 2007; Lehninger et al., 2002).

Em relação à absorção dos lipídios na dieta, verifica-se que após hidrólise na cavidade oral e no estômago, os lipídios da dieta são emulsificados no duodeno com a ajuda dos ácidos biliares. Os lipídios e os sais biliares interagem para formar as micelas. As micelas são formadas por triacilgliceróis, ésteres de colesterol e fosfolípídeos, que são digeridos com ajuda da lipase e colipase, subsequentemente, os lipídios digeridos entram passivamente nos enterócitos. Os ácidos graxos de cadeia curta são transportados no sangue ligados à albumina. A absorção dos ácidos graxos poli-insaturados para dentro dos enterócitos é facilitada por uma “proteína ligante de ácidos graxos” (FABP). A FABP é uma pequena proteína que tem grande afinidade por ácidos graxos de cadeia longa. Após absorção, os ácidos graxos de cadeia longa são esterificados novamente a triacilglicerol por aciltransferases, e são liberados na circulação linfática como quilomícrons (Moreira et al., 2002).

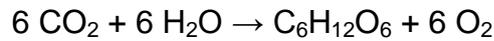
### 3.3.2 Carboidratos

O termo “carboidrato” surgiu por se acreditar que os átomos de carbono estavam de alguma maneira combinados com a água (hidratos de carbono), de acordo com a fórmula empírica dos açúcares mais simples:  $C_n(H_2O)_n$ , embora esta definição não seja adequada para os oligo- e polissacarídeos. Eles podem ser chamados, de uma maneira geral, de glicídios, amido ou açúcar (Ghazarian et al., 2011; Manhães, 2007).

São divididos em três grandes grupos: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Este último grupo é constituído pela celulose e hemicelulose, que são constituintes da parede celular e, pelo amido que é formado principalmente por sacarose, sendo armazenado na forma de amilose e amilopectinas. No grupo dos monossacarídeos estão as pentoses (ribose e desoxirribose) e as hexoses tais como a glicose, frutose, levulose e galactose. Já os oligossacarídeos, formados pela conexão de dois a dez monossacarídeos, são representados pela sacarose, lactose, maltose, rafinose e estaquiose. A invertase é a enzima responsável pela hidrólise da sacarose produzindo frutose e glicose livres (Taiz e Zeig, 2013).

A origem do nome carboidratos, ou seja, carbonos hidratados, se deve ao fato destes serem produtos da reação de fotossíntese. Assim, as plantas se utilizam do  $CO_2$  e da  $H_2O$ , na presença de luz para sintetizar "carbonos com água" ou carbonos

hidratados. Os produtos da fotossíntese são a D-glicose (6 carbonos) e os polímeros dela. A equação de fotossíntese pode então ser escrita:

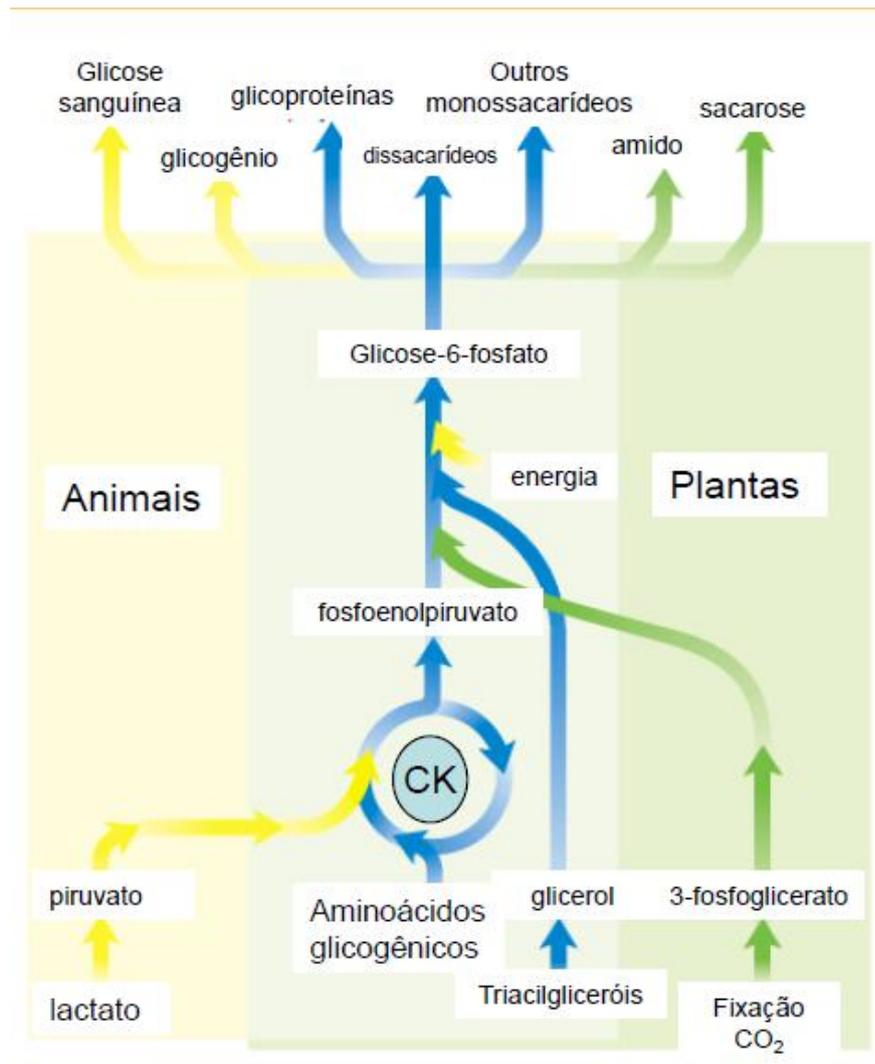


A fórmula conformacional da glicose pode ser na conformação espacial  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo estas indicativas da posição do grupo hidroxila pertencente ao carbono anomérico da glicopiranosose. A configuração para  $\alpha$ -glicose é cis e para  $\beta$  é trans. A primeira reage instantaneamente com ácido bórico e a segunda após sofrer mutarrotação (processo pelo qual compostos anômeros cíclicos, em água, podem se abrir, passando por uma fase intermediária acíclica e retornando para a fase cíclica, de forma a existir um equilíbrio entre os anômeros cíclicos  $\alpha$  e  $\beta$  em solução). Um dos isômeros, a  $\alpha$ -D-glicopiranosose, é cristalino e com a repetição das unidades resultará em amido e glicogênio. A forma  $\beta$ -D-glicopiranosose é encontrada em pigmentos vegetais e é a unidade formadora da celulose (Melo Filho & Vasconcelos, 2011).

É interessante notar que tanto nas plantas como nos animais a D-glicose é o carboidrato mais utilizado pelas células e o único a compor a reserva energética destes diferentes seres. Além disso, na natureza e principalmente no meio aquoso, os carboidratos adquirem a forma cíclica, pois se tornam moléculas mais estáveis. A ciclização dos açúcares ocorre nas moléculas com 5 ou mais carbonos por meio da carbonila e o carbono assimétrico mais distante desta (Júnior, 2008; Lehninger et al., 2002).

Na molécula da glicose a ciclização ocorre entre o carbono 1 com o carbono 5, resultando em uma estrutura contendo 6 átomos na formação do anel. Esta forma assumida é semelhante à da estrutura química do pirano e a glicose é chamada de D-glicopiranosose (Lehninger et al., 2002).

Em relação à biossíntese de carboidratos, a gliconeogênese é a rota pela qual a glicose é sintetizada a partir de compostos aglicanos, sendo a maior parte deste processo realizado no fígado e uma menor parte no córtex dos rins. Em humanos, os principais precursores são: lactato, glicerol e aminoácidos, principalmente alanina. Nos vegetais, o processo para produção da glicose é a fotossíntese (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema da síntese de carboidratos a partir de precursores simples.  
(Adaptado de Lehninger et al., 2002).

O processo de gliconeogênese superpõe-se ao da glicólise, sendo que, iniciando pelo piruvato, a maioria das reações de síntese de glicose é no sentido inverso ao da glicólise. As enzimas envolvidas na catalização desses passos são reguladas para que, ou glicólise, ou gliconeogênese predomine, dependendo das condições fisiológicas. A maior parte das etapas da gliconeogênese usa as mesmas enzimas que catalizam o processo da glicólise, porém, o fluxo de carbonos, é claro, é na direção reversa (Lieberman & Marks, 2009).

Todavia, há pontos em que as reações da glicólise são irreversíveis *in vivo* (por liberarem energia livre em forma de calor): conversão de glicose em glicose 6-fosfato pela hexoquinase, a fosforilação da frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bisfosfato pela fosfofrutoquinase-1 e a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato pela piruvato quinase. Para contornar essas barreiras energéticas, reações e

enzimas especiais são necessárias. O piruvato é inicialmente transportado para o interior da mitocôndria, onde a enzima piruvato carboxilase, que requer a coenzima biotina, o converte em oxaloacetato. Esta reação exige também a acetil-CoA como efetor alostérico positivo e a piruvato carboxilase é a primeira enzima da via que possibilita a regulação da gliconeogênese (Junior, 2008; Lehninger et al., 2002).

Com o consumo de NADH a enzima malato desidrogenase mitocondrial converte o oxaloacetato a malato, que então deixa a mitocôndria por intermédio de um transportador específico presente na membrana mitocondrial interna. No citoplasma ele é reoxidado em oxaloacetato com a produção de NADH. Após, ocorre a conversão do oxaloacetato em fosfoenolpiruvato pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase utilizando  $Mg^{2+}$  e GTP (guanosina difosfato) (Lehninger et al., 2002).

A reação final da gliconeogênese é a conversão da glicose-6-fosfato em glicose por meio do processo de desfosforilação pela enzima glicose-6-fosfatase. Esta enzima também requer  $Mg^{2+}$  e é encontrada no retículo endoplasmático de hepatócitos e células renais. Ainda, a glicólise e a gliconeogênese são reguladas de forma recíproca por alosterismo e modificações covalentes para impedir a operação improdutiva das duas vias ao mesmo tempo (Garrett & Grisham, 2002).

Nesse contexto, ressalta-se que todas as frutas e verduras contêm carboidratos, os quais também podem ser encontrados em alguns produtos derivados do leite. Por meio da fotossíntese, as plantas armazenam carboidratos como sua principal fonte de energia (Melo Filho & Vasconcelos, 2011).

Quando alimentos à base de vegetais são ingeridos, essa energia armazenada é colocada em uso dentro do organismo. Embora a proteína e a gordura possam ser utilizadas para produzir energia, o carboidrato é a fonte de combustível mais fácil para o organismo usar e, por isso, a preferida. Isso se deve principalmente à estrutura química básica do carboidrato, ou seja, as unidades de carbono, hidrogênio e oxigênio (Lieberman & Marks, 2009).

É importante salientar que os carboidratos são imprescindíveis para a sobrevivência, principalmente a glicose, visto que para o cérebro humano e o sistema nervoso, assim como para os eritrócitos, os testículos, a medula renal e os tecidos embriônicos, a glicose sanguínea é a única ou principal fonte de energia. Apenas o cérebro requer cerca de 120g de glicose a cada dia - mais do que metade de toda a glicose armazenada como glicogênio em músculos e fígado. Em longo prazo, todos os tecidos também requerem glicose para outras funções, tais como a

síntese da ribose dos nucleotídeos ou da porção carboidrato de glicoproteínas e glicolipídeos. Portanto, para sobreviver, os organismos precisam ter mecanismos para manutenção dos níveis sanguíneos de glicose (Lieberman & Marks, 2009).

Em relação à digestão dos carboidratos, esta se inicia na saliva onde ocorre o processo químico de separar o alimento em seus componentes. Depois, no estômago, o carboidrato é dilacerado pelas contrações musculares e pelos ácidos gástricos para obter os açúcares contidos nele. As fibras diminuem a velocidade com que este processo ocorre visto que aumentam o esforço do estômago para alcançar os açúcares e amidos dos carboidratos. Além das fibras, gorduras e proteínas também retardam a velocidade com a qual o estômago age sobre os carboidratos. Assim, consumir um pouco de proteína ou gordura saudável junto com carboidratos pode ser sim muito benéfico (Melo Filho & Vasconcelos, 2011).

Na digestão, o organismo extrai os açúcares dos carboidratos e os transforma em combustível, que poderá ser queimado ou armazenado. A queima de quase todo o combustível significa que a pessoa é suficientemente ativa para fazer uso eficiente dos alimentos que consome. O excesso de combustível armazenado resulta em gordura corporal (Cargill, 2012).

Os alimentos ricos em carboidratos fornecem a energia necessária para o funcionamento do organismo humano. É com a energia obtida dos carboidratos que se tem força para locomover, trabalhar e realizar as atividades cotidianas. Por este mesmo motivo, os carboidratos são muitas vezes considerados inimigos do emagrecimento, já que combustível estocado se transforma em gordura, que se deposita sob o tecido adiposo, gerando ganho de peso. Com uma alimentação balanceada, adequada em carboidratos de acordo com o peso, a altura e a idade, isso não acontece (Cargill, 2012).

### **3.4 Radicais Livres *versus* Antioxidantes**

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas constantemente no corpo humano. Todos os organismos vivos aeróbios, como o homem, utilizam o oxigênio na produção de energia. Cerca de 95 a 98% do oxigênio consumido durante a respiração celular é para a produção de energia, o restante produz EROS por processos catabólicos e anabólicos (Soares, 2013).

Diversos locais dentro da célula podem gerar EROs. As mitocôndrias são consideradas como a fonte da maioria das EROs, especificamente do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). As reações que geram ATP na mitocôndria requerem elétrons de substratos reduzidos para serem passados ao longo da cadeia de transporte de elétrons. Elétrons que “vazam” deste processo reagem com o oxigênio molecular ( $O_2$ ) gerando o radical ânion superóxido. Esse radical é um mediador importante em inúmeras reações oxidativas em cadeia e também é um precursor para muitas outras ERO. Outras fontes importantes de ERO intracelular são: NADPH oxidases (gera ânion superóxido), óxido nítrico sintases (gera óxido nítrico) e lipoxigenases (gera hidroperóxidos de ácidos graxos). Além de serem geradas no metabolismo celular, as EROs podem ser produzidas em resposta a diferentes estímulos externos com radiação ionizante, poluição, agentes oxidantes e quimioterápicos (Halliwell & Gutteridge, 2007; Halliwell, 1991).

As EROs em baixos níveis e em condições normais possuem um papel importante em seres vivos. Um exemplo de suas funções no organismo é na resposta imune a infecções. Os fagócitos em geral possuem um mecanismo de defesa contra corpos estranhos onde ocorre um alto consumo de oxigênio, geralmente denominado queima ou explosão respiratória. Nesse processo, o oxigênio consumido é convertido em ânion superóxido através do complexo da NADPH oxidase, que é usado para eliminar bactérias e partículas engolfadas pelos fagócitos no processo chamado de fagocitose (Halliwell e Gutteridge, 2007; Dröge, 2002).

Há evidências de que as EROs também desempenham um papel importante na sinalização celular (Ray et al., 2012). Entretanto, devido à sua elevada reatividade, o acúmulo de ERO, ou seja, de radicais livres, além das necessidades imediatas da célula pode afetar a estrutura celular e a integridade funcional, ao provocar a degradação oxidativa de moléculas críticas, tais como o DNA, as proteínas e os lipídios (Cui et al., 2004).

As EROs incluem inúmeras moléculas quimicamente derivadas do oxigênio e abrangem espécies radicalares, como o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), bem como espécies não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Soares, 2013). Logo, as moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (Halliwell, 1994). Essa configuração faz dos

radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. Algumas espécies de radicais livres:

$O_2$	oxigênio singlete
$O_2^{\cdot -}$	radical superóxido
$OH^{\cdot}$	radical hidroxila
$NO^{\cdot}$	óxido nítrico
$ONOO^{\cdot}$	peroxinitrito
$Q^{\cdot}$	radical semiquinona

Devido à sua alta reatividade, o radical  $OH^{\cdot}$  é provavelmente o radical capaz de causar mais danos aos sistemas biológicos do que qualquer outra ERO. Ele reage rapidamente com a maioria das biomoléculas presentes em uma célula viva: açúcares, aminoácidos, fosfolipídios, DNA e ácidos orgânicos. O radical é formado pelo  $H_2O_2$  na reação catalisada por íons metálicos ( $Fe^{+2}$  e  $Cu^{+}$ ), muitas vezes ligados em complexos com diferentes proteínas ou outras moléculas (Soares, 2013).

A reação deste radical ( $OH^{\cdot}$ ) com biomoléculas normalmente produz outro radical de menor reatividade, o qual também pode atacar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Um exemplo é o radical peroxil ( $RO_2^{\cdot}$ ) que é formado pelo ataque do  $OH^{\cdot}$  a compostos orgânicos. A capacidade do  $OH^{\cdot}$  em lesar as células é superior às demais EROs, já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra ele. Por isso, a melhor defesa que a célula tem contra este radical é evitar que o mesmo seja gerado. Por esta razão as células mantêm um rígido controle sobre a homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado e os íons metálicos são mantidos em sua valência mais alta ou estão em alguma forma complexados a enzimas e proteínas onde são armazenados e/ou fazem parte funcional das mesmas (Halliwell e Gutteridge, 2007; Fridovich, 1998; Halliwell, 1991).

O  $O_2^{\cdot -}$  é formado a partir do oxigênio pela adição de um elétron e, apesar de ser um radical, não é altamente reativo. A formação de  $O_2^{\cdot -}$  acontece especialmente em ambientes aeróbios ricos em elétrons, como a cadeia de transporte de elétrons, que parece ser a fonte mais importante de  $O_2^{\cdot -}$  em muitas células aeróbicas. O  $O_2^{\cdot -}$  também é gerado por algumas enzimas como a xantina oxidase e flavoproteínas. O dano biológico direto causado pelo  $O_2^{\cdot -}$  é altamente seletivo e frequentemente

envolve reações com outros radicais (ex.  $\text{NO}^{\bullet}$ ) ou com íons de ferro em proteínas ferro-enxofre (Soares, 2013).

Apesar de não ser um radical livre, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  atua como subproduto na formação de radicais reativos via oxidação com metais de transição. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode atravessar rapidamente as membranas celulares, e uma vez dentro, pode reagir com íons de ferro e cobre gerando o  $\text{OH}^{\bullet}$  que é altamente reativo. Esse radical é produzido por enzimas como: xantina, urato e D-aminoácido oxidases. Além disso, todo sistema biológico que gera  $\text{O}_2^{\bullet-}$  também gera  $\text{H}_2\text{O}_2$  através da dismutação de duas moléculas de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Outra fonte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um agente fracamente redutor e oxidante. Por exemplo, não ocorre oxidação quando DNA, lipídios ou proteínas são incubadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , até mesmo em níveis milimolares de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Entretanto, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  parece ser capaz de inativar algumas enzimas diretamente, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, através da oxidação de grupamentos tióis no sítio ativo (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Assim, a formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos, tais como medicamentos, radiações gama e ultravioleta (UV), cigarro, dieta e ozônio. Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (Bianchi & Antunes, 1999).

Uma condição de estresse oxidativo é gerada quando a célula acumula um excesso de ERO. Isso ocorre quando a produção de ERO excede as defesas celulares. Todas as células ativas produzem certa quantidade de ERO, mas o sistema antioxidante mantém os níveis baixos. Como um efeito passivo, as ERO podem danificar as células através do dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA (Covarrubias et al., 2008).

A peroxidação lipídica é provavelmente o tipo de dano mais explorado em pesquisas quando se trata de ERO. Os ácidos graxos poli-insaturados são, por ter múltiplas ligações duplas, excelentes alvos para o ataque de radicais livres (Nordberg e Arnér, 2001). O processo de peroxidação lipídica consiste em três estágios: iniciação, propagação e terminação (Vasudevan et al., 2011).

O acúmulo de danos oxidativos em lipídios, proteínas e no DNA está relacionado com a patogênese de diversas doenças como câncer, diabetes, inflamações, doença de Parkinson, doenças cardiovasculares, aterosclerose, isquemia-reperfusão e no envelhecimento acelerado. Além disso, o estresse oxidativo gerado pelas ERO pode reduzir a expressão de genes relacionados com as enzimas antioxidantes. Os níveis anormais de ERO e o declínio das defesas antioxidantes podem levar ao dano celular de organelas e enzimas, aumentando a peroxidação lipídica e desenvolvendo resistência a insulina, por exemplo (Maritim *et al.*, 2003). A produção excessiva de ERO no diabetes pode gerar disfunções endoteliais que estão diretamente relacionadas com um aumento no risco de doenças cardiovasculares e aterosclerose (Pennathur & Heinecke, 2007).

Desta forma, a utilização de moléculas antioxidantes presentes na dieta ou mesmo sintéticas é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (Bernardes, 2011; Weijl *et al.*, 1997; Halliwell *et al.*, 1995; Doroshov, 1983).

Os antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais, retardam ou previnem a velocidade da oxidação, prevenindo o desenvolvimento de muitas doenças e contribuindo para uma maior longevidade (Moraes, 2013; Pietta, 2000).

Um bom antioxidante possui substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função de seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo e acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília (Manach *et al.*, 2004).

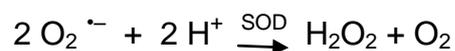
Os agentes antioxidantes podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos. O balanço entre a produção e a degradação de ERO mantém a homeostase celular (Covarrubias *et al.*, 2008).

Entre os antioxidantes enzimáticos encontram-se: superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase e glutathione peroxidase. Já entre os antioxidantes não-enzimáticos são aqueles que, em sua maioria, precisam ser adquiridos pela alimentação, sendo os mais comuns glutathione reduzida (GSH),

tiorredoxina (Trx),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) curcumina,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides, proteínas do plasma, selênio, glutathione, clorofilina e a L-cisteína (Bianchi & Antunes, 1999).

A GSH é um tripeptídeo ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina) sintetizado pela ação catalítica da  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-sintetase e da glutathione sintetase. Está envolvida na detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, bem como pode interagir com outras espécies reativas como  $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Holmgren et al., 2005). Uma vez que a GSH é oxidada gerando a glutathione oxidada (GSSG), a forma reduzida pode ser regenerada através da enzima GSH redutase. A GSH é utilizada por uma série de enzimas como a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione-S-transferase. O balanço entre GSH e GSSG é uma maneira de determinar o estado redox dentro da célula (Covarrubias et al., 2008). Por outro lado, tiorredoxinas (Trx), assim como glutarredoxinas (Grx) são pequenas proteínas que contêm um sítio ativo com um dissulfeto redox-ativo. Essas proteínas mantêm o estado redox na célula reduzido através da redução de proteínas com grupamento tiol (Holmgren et al., 2005). A regulação redox é uma importante função em eventos biológicos como a ativação de enzimas, expressão gênica seletiva, síntese do DNA e regulação do ciclo celular. As tiorredoxinas regulam as transduções de sinais extra e intracelular, os mecanismos de transcrição, o crescimento celular e o metabolismo de glicose e lipídios (Watanabe et al., 2010).

As enzimas antioxidantes atuam em conjunto para remover várias ERO produzidas por reações de radicais livres. As enzimas superóxido dismutases (SOD) catalizam a dismutação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  (Covarrubias et al., 2008; Halliwell & Gutteridge, 2007) Nessa reação, duas moléculas de superóxido formam peróxido de hidrogênio e oxigênio. A reação catalisada por SOD é extremamente eficiente.



A glutathione peroxidase (GPx) é outra enzima que converte o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água. Além disso, ela também atua na proteção contra peróxidos orgânicos. A GPx é dependente de selênio e necessita da presença de glutathione reduzida (GSH) (Soares, 2013).

Existem ainda as PHGPx (fosfolipídio hidropéroxido glutathione peroxidase), que são enzimas associadas a membrana, capazes de reduzir peróxidos orgânicos.

Essas enzimas são as principais na reparação de peróxidos lipídicos na membrana (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Os mecanismos de sistemas antioxidantes atuam cooperativamente. A ausência de uma das defesas acarreta um desequilíbrio no estado redox da célula, podendo levá-la a um aumento na sensibilidade a agentes oxidantes intra ou extracelular (Dröge, 2002).

Verifica-se que os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos: o primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídios, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonoides e carotenoides são extremamente importantes na intercepção dos radicais livres. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Portanto, esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (Bianchi & Antunes, 1999).

### **3. 5 Antioxidantes na Dieta**

Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos (tais como glutathione sintetase, catalase, superóxido dismutase, entre outros), a inclusão de antioxidantes na dieta é de grande importância, pois o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (Soares, 2013).

Os antioxidantes também têm sido relacionados com a diminuição de efeitos colaterais advindos do uso de fármacos antitumorais como, por exemplo, a nefrotoxicidade, que é um dos principais efeitos colaterais da terapia com a cisplatina (fármaco antitumoral). Evidências mostram que a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina é atribuída ao dano oxidativo resultante da geração de radicais livres

e que a administração de antioxidantes é eficiente na inibição destes efeitos colaterais em modelos animais. Uma abordagem alternativa para proteção contra os efeitos colaterais da cisplatina é o uso de conhecidos antioxidantes da dieta tais como, vitaminas C e E, curcumina, selenito de sódio e o carotenoide bixina (Antunes & Bianchi, 2004).

Logo, os antioxidantes da dieta poderiam atuar como quimioprotetores, prevenindo contra os efeitos colaterais das EROS, as quais podem causar danos a proteínas (Gracy et al., 1999), lipídeos (Fraga et al., 1987) e ácidos nucleicos (Richter et al. 1988) e o desenvolvimento de cânceres secundários, relacionados com as mutações induzidas pelo estresse oxidativo no DNA (Antunes & Bianchi, 2004).

As interações entre antineoplásicos e antioxidantes promovem a potencialização do mecanismo de ação dos fármacos, resultando em diminuição do tamanho do tumor com produção de menores efeitos colaterais, melhoria da qualidade de vida dos pacientes oncológicos e maior tempo de sobrevida (Santos, 2008).

Nesse sentido, os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e na prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos é encontrada uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (Hercberg et al., 1998).

A importância concernente ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos, e doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas, ou tecidos (Halliwell et al., 1995).

A vitamina C, por exemplo, atua na fase aquosa como um excelente antioxidante sobre os radicais livres, mas não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação dos lipídeos. Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que essa vitamina na presença de metais de transição, tais como o ferro, pode atuar como uma molécula pró-oxidante e gerar os radicais  $H_2O_2$  e  $OH\cdot$ . Geralmente, esses metais estão disponíveis em teores muito limitados e as propriedades antioxidantes dessa vitamina predominam *in vivo* (Odin, 1997).

Observa-se que existem algumas lacunas com relação aos antioxidantes, tais como: a inexistência de recomendação para cada antioxidante; falta de padronização quanto ao real valor antioxidante dos alimentos e possíveis efeitos tóxicos da administração de elevadas doses desses compostos (Sucupira et al., 2012; Silva et al., 2008).

Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados para preservar alimentos, inclusive como padrões, constam o hidroxianisol butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT), o galato de propila, a *terc*-butil-hidroquinona e os sorbatos (2,4-hexadienoatos). A substituição de antioxidantes sintéticos por naturais pode apresentar vantagens devido a implicações na área de saúde e na funcionalidade (de Oliveira et al., 2009).

Os antioxidantes naturais incluem os tocoferóis, vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos existentes nas plantas atuam protegendo-as contra injúrias em seus tecidos, contra a ação de subprodutos provenientes da fotossíntese que podem causar danos e também contra plantas herbívoras. Muitos desses compostos têm similaridades quanto à estrutura molecular básica, em que todos possuem pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila ligado a ele, incluindo, principalmente, os ácidos fenólicos e flavonoides, que conferem defesa contra o ataque de radicais livres (Sucupira et al., 2012).

Antioxidantes naturais, particularmente em frutas e vegetais ganharam um interesse crescente entre os consumidores e a comunidade científica, porque os estudos epidemiológicos indicaram que o consumo frequente de recursos naturais antioxidantes está associado com um menor risco de diversas doenças (Thaipong et al., 2006; Temple, 2000).

Assim, o crescente interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas deve-se à baixa toxicidade quando comparados aos antioxidantes sintéticos, tais como o BHT (hidroxibutiltolueno) e o BHA (hidroxibutilanisol). Extratos de frutas, vegetais, cereais e seus subprodutos industriais têm demonstrado eficaz atividade antioxidante (Luna et al., 2010).

Nesse sentido, é interessante salientar que os alimentos contêm compostos oxidantes, os quais podem ocorrer naturalmente ou ser introduzidos durante o processamento para o consumo. Por outro lado, os alimentos, principalmente as frutas, as verduras e os legumes também contêm agentes antioxidantes, tais como

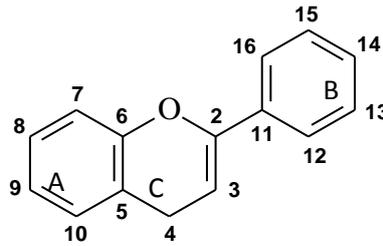
as vitaminas C, E e A, a clorofilina, os flavonoides, carotenoides, curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (Bianchi & Antunes, 1999).

A vitamina E, por exemplo, é um componente dos óleos vegetais encontrada na natureza em quatro formas diferentes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol, sendo o  $\alpha$ -tocoferol a forma antioxidante amplamente distribuída nos tecidos e no plasma. Os danos oxidativos podem ser inibidos pela ação antioxidante dessa vitamina, juntamente com a glutatona, a vitamina C e os carotenoides, constituindo um dos principais mecanismos da defesa endógena do organismo (Bianchi & Antunes, 1999).

Também a vitamina A é um fator importante no crescimento e na diferenciação celular. Além disso, tem apresentado ação preventiva no desenvolvimento de tumores da bexiga, mama, estômago e pele, em estudos realizados com animais. Estudos epidemiológicos também mostraram que o consumo regular de alimentos ricos em vitaminas A e C pode diminuir a incidência de câncer retal e de cólon. O  $\beta$ -caroteno, o mais importante precursor da vitamina A, está amplamente distribuído nos alimentos e possui ação antioxidante (Bianchi & Antunes, 1999).

De acordo com estudos clínicos e epidemiológicos, há evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas, em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos. Os compostos fenólicos, entre eles principalmente os flavonoides (Figura 5), têm seu mecanismo de ação investigado, na busca de identificar qual é sua relação com as propriedades benéficas apresentadas (Moraes, 2013; Torras-Claveria et al., 2012; Dani et al., 2010).

Em virtude de sua natureza química, os flavonoides atuam como agentes redutores, interrompendo a cadeia da reação de oxidação através da doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis, ou complexando com metais, componentes iniciadores da oxidação lipídica (Soares, 2013; Ibrahim et al., 2012; Melo et al., 2008; Ângelo & Jorge, 2007; Clavin et al., 2007; Williams et al., 2004; Pelzer et al., 1998; Husain et al., 1987).



**Figura 5:** Estrutura básica dos flavonoides (Harborne, 1994a)

Nesse contexto, a eficiência antioxidante de compostos bioativos em alimentos de origem vegetal depende de sua estrutura e da sua concentração no alimento. Por sua vez, a concentração destas substâncias em vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros aspectos. Sabe-se, ainda, que a capacidade antioxidante é influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica de extração utilizada, bem como pelo binômio tempo-temperatura. No que se refere aos solventes orgânicos, o metanol, por conseguir extrair elevada concentração de compostos bioativos, tem sido apontado como o mais efetivo (de Oliveira et al., 2009).

### 3. 6 Métodos de Determinação da Atividade Antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos alimentos, além de predizer o potencial antioxidante do alimento antes de ser ingerido, é importante para avaliar a proteção contra a oxidação e a deterioração do alimento, reações que podem levar à diminuição da sua qualidade e do seu valor nutricional (Lima, 2008).

Foram descritos numerosos métodos de mensuração da atividade antioxidante de substâncias e alimentos, mas todos eles têm em comum a presença de um agente oxidante, um substrato adequado e uma estratégia de medida do ponto final (Lima, 2008).

Os métodos que determinam a atividade antioxidante de alimentos são classificados em dois grupos: o primeiro se baseia na captura de radicais livres (indireto); o segundo, na determinação da oxidação de uma molécula alvo (direto) (Sucupira et al., 2012).

A capacidade antioxidante pode ser expressa por meio de vários parâmetros, incluindo a remoção de um radical: ORAC - *oxygen radical absorbance capacity*, TRAP - *total reactive antioxidant potential*; a capacidade de redução de metal: FRAP - *ferric reducing antioxidant Power* e CUPRAC - *cupric ion reducing antioxidant capacity*; a capacidade de remoção de radical orgânico: ABTS - *2,20-azino-bis (acid 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico)* e DPPH - *2,2-difenyl-1-picrylhydrazil*; e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos: TBARS, a oxidação do LDL, co-oxidação do  $\beta$ -caroteno) (Sucupira et al., 2012; Sanchez-Moreno et al., 1998).

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, além de se basearem em fundamentos diversos. Dessa forma, levando-se em conta os pontos fortes, pontos fracos e aplicabilidade de cada tipo de ensaio, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (de Oliveira et al., 2009; Prior et al., 1999; Sanchez-Moreno et al., 1998).

De antemão, é necessário frisar que a comparação da capacidade antioxidante entre os diferentes métodos não é feita em valores absolutos, pois cada método tem sua própria escala de valores. Uma padronização é urgentemente requerida e deve seguir os critérios estabelecidos de: utilizar moléculas biologicamente relevantes; ser tecnicamente simples; com ponto final e mecanismo químico bem definidos; com instrumentação facilmente disponível; ter boa repetibilidade e reprodutibilidade e ser adaptável para ensaios de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (de Oliveira *et al.*, 2009).

O método de branqueamento de  $\beta$ -caroteno, que avalia o nível de inibição dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, é bastante conhecido (Duarte-Almeida et al., 2006). Porém, os métodos FRAP, ABTS, DPPH são mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* (Tabela 2).

Os métodos para avaliação da atividade antioxidante total (AAT) propostos na literatura são diversos, porém alguns são mais apropriados que outros, dependendo da natureza dos compostos presentes na constituição de cada fruta. Deste modo, existem métodos para frutos ricos em compostos hidrofílicos e métodos para frutos ricos em compostos lipofílicos (Sucupira et al., 2012).

**Tabela 2:** Vantagens e desvantagens dos principais métodos antioxidantes.

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
FRAP	Aplicável em amostras de alimentos, bebidas e substâncias puras, simples, rápido e não requer equipamentos sofisticados.	Exige sistema aquoso e não detecta compostos que agem por meio da doação de átomos de hidrogênio.
ABTS	Utilizado em amostras hidrossolúveis e lipossolúveis, excelente estabilidade, rápido, resultados reprodutíveis, oferece vários máximos de absorção e uma boa solubilidade	O radical catiônico ABTS <sup>•+</sup> gerado pela ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio pode sofrer interferência.
DPPH	Muito rápido, sensível, simples, reprodutível, utiliza reagentes comuns independente da polaridade das amostras e dispensa tratamento prévio.	Não especifica a espécie sequestradora de radicais livres, impossibilita a avaliação da ação antioxidante em hidrofílicos.

Nesse sentido, observa-se que os métodos de análises de atividade antioxidante *in vitro* têm se tornado relevantes, uma vez que auxiliam na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de matéria-prima para estudo. A escolha do método é importante para comprovar a presença de compostos antioxidantes, que previnem o ataque de radicais livres e doenças degenerativas. Cada método de análise possui particularidades, portanto testes preliminares devem ser realizados a fim de adequar o ensaio a ser adotado. Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância.

## 3.7 Câncer

### 3.7.1 Aspectos gerais

Sendo uma das principais causas de morte no mundo, o câncer compreende um conjunto de doenças que se caracterizam pela presença de células em crescimento contínuo, com propriedades de invasão e destruição do tecido adjacente (Hanahan & Weinberg, 2000).

Câncer, neoplasia ou tumor maligno são termos empregados para designar uma classe de doenças caracterizada pelo crescimento descontrolado de células de um tecido anormal no contexto da fisiologia e fisiopatologia de um organismo complexo; estas células invadem os tecidos e órgãos normais, por extensão direta ou por disseminação à distância por meio do sangue, linfa ou superfície serosa, espalham-se para outras regiões do corpo e podem levar à morte (Robins, 2005).

O câncer é uma condição patológica que alcança milhares de indivíduos a cada ano, tendo aflingido a espécie humana desde tempos remotos. O primeiro relato de câncer foi descoberto em um papiro egípcio de 1600 a.C. em que estão descritos oito casos de tumores no seio para os quais não havia tratamento. A origem do termo câncer é atribuída ao médico grego Hipócrates (em 400 a.C.) que denominou certos tumores de carcinomas, devido à semelhança dos vasos sanguíneos desses tumores com o formato das patas de caranguejos. *Câncer*, a palavra latina para caranguejo, foi um termo introduzido pelo médico romano Celsus e o termo *oncos*, palavra grega para tumor, foi associado ao câncer por outro médico romano, Galeno (The History of Cancer, 2010).

Os cânceres são classificados de acordo com o tecido e tipo de célula dos quais se originam. Assim, cânceres originados de células epiteliais são chamados carcinomas; aqueles originados a partir de tecidos conjuntivos ou células musculares são denominados sarcomas e os que não se encaixam em nenhuma dessas categorias incluem os vários tipos de leucemia, derivados de células hematopoiéticas, e cânceres derivados de células do sistema nervoso (Brasil, 2013).

Aproximadamente 90% dos cânceres humanos são carcinomas, talvez porque a maioria das células em proliferação no corpo se encontra no epitélio, ou porque os tecidos epiteliais são mais expostos a várias formas de danos físicos e químicos que favorecem o desenvolvimento do câncer (Albert et al., 2002).

A origem da célula cancerosa é consequência de alterações genéticas que podem ocorrer por distintos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, os chamados carcinógenos (Sieber et al., 2003).

Logo, o câncer é de origem monoclonal, e para que uma célula normal altere o seu fenótipo e se torne uma célula neoplásica devem ocorrer mutações genéticas. Os mecanismos que podem conduzir a alterações nos genes podem ser genéticos, com modificações estruturais no genoma, ou epigenéticos, com alteração de enzimas ou de seus próprios substratos. Estas mutações podem ter uma variedade de efeitos nas células, mas eventualmente resultam em um crescimento ainda mais acelerado (Brasil, 2013).

São responsáveis pelo processo de cancerogênese alterações em dois grupos principais de genes, os quais controlam o crescimento e a proliferação celular: oncogenes e genes supressores de tumor. Diferente de doenças como a fibrose cística ou distrofia muscular, nas quais mutações em um único gene podem causar a doença, um único gene mutado não gera câncer. As células de mamíferos têm múltiplos sistemas de controle que as protegem contra efeitos potencialmente letais de mutações em genes ligados ao processo de cancerogênese, e somente quando vários desses genes estão mutados é que um câncer invasivo pode se desenvolver. Assim é mais adequado pensar que mutações nesses genes, preferencialmente, contribuem para o desenvolvimento do tumor do que causam câncer (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Desta forma, o desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplos passos envolvendo mutação e seleção de células com capacidade progressivamente aumentada para proliferação, sobrevivência, invasão e metástase. Inicia-se com uma alteração genética que leva à proliferação anormal de uma única célula, seguida pelo supercrescimento de uma população derivada desta célula e mutações adicionais com seleção clonal, ou seja, seleção de descendentes com vantagens como crescimento mais rápido, maior sobrevivência celular ou outras propriedades (Devlin, 2007; Rang et al., 2004; Cooper, 2001).

A OMS relacionou cerca de 100 fatores físicos, químicos e biológicos como carcinogênicos. Entre os fatores físicos, a exposição à radiação ultravioleta está associada, por exemplo, ao desenvolvimento de câncer de pele (Massari et al.,

2007). Asbestos, hidrocarbonetos aromáticos e tabaco representam importantes fatores químicos de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão (Veglia et al., 2007). Além de fatores ambientais citados acima, que são responsáveis por 95% dos carcinomas, fatores genéticos estão associados a 5% dos cânceres em humanos (Sonnenschein & Soto, 2008). Nesses casos, alterações genéticas hereditárias favorecem o surgimento de neoplasias, tais como mutações nos genes BRCA-1 e 2 aumentam a susceptibilidade aos cânceres de mama e ovário (Lynch et al., 2008).

Todavia, a maior parte dos cânceres não é proveniente de genes hereditários mutados, mas sim de genes que sofreram mutação durante o tempo de vida de um indivíduo, ou seja, mutações ocorridas em células somáticas (Cotran et al., 2000).

As alterações genéticas presentes em neoplasias originam diferentes graus de alteração fenotípica. Pode haver, por exemplo, aumento da expressão de receptores para fatores de crescimento (Adriaenssens et al., 2008; Dawood et al., 2008), favorecendo a proliferação celular, bem como pode ocorrer a redução da apoptose e o desenvolvimento de mecanismos que tornam possíveis a sobrevivência e a proliferação de células com DNA danificado (Toillon et al., 2007; Wendt et al., 2006).

Além de se dividir intensamente, as células de câncer podem ter capacidade invasiva e formar metástases. Uma vez que adquirem essa habilidade, as células cancerígenas atingem a circulação linfática e sanguínea e se estabelecem em tecidos distintos daquele de origem, dando início a novos tumores (Hanahan & Weinberg, 2000). A metástase consiste em um processo que ocorre durante a carcinogênese no qual o tumor maligno adquire a capacidade de migrar para sítios adjacentes ou distantes do tumor de origem. Na metástase, além da capacidade de invasão, os tumores apresentam novas características como mobilidade e adaptação a ambientes diferentes (Weinberg, 2008).

Sabe-se que alterações na expressão de moléculas de adesão célula-célula desempenham papel importante na invasividade de células tumorais (Johnson, 1991).

Outras características também são de grande relevância (Figura 6), como: angiogênese sustentada, evasão do sistema imune; uma elevada resposta de danos no DNA causada por elevadas taxas de replicação e defeitos no mecanismo de reparo do DNA; estresse proteotóxico (um aumento na quantidade de tóxicos

desnove proteínas nas células); estresse mitótico / instabilidade cromossômica; estresse metabólico (o aumento da utilização de glicólise, em vez de fosforilação oxidativa, como meio de produção de ATP); e estresse oxidativo (Luo et al., 2009).



**Figura 6:** Capacidades adquiridas pelas células tumorais (Brasil, 2013).

A morte celular é uma resposta fundamental na formação do organismo vivo durante o desenvolvimento e na regulação da homeostase do tecido através da eliminação de células não desejadas. Além disso, a regulação da morte celular desempenha um papel importante no crescimento e progressão do câncer, e defeitos nas vias de morte celular são a marca registrada de câncer (Okada & Mak, 2004). Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer é embasado na indução da morte nas células tumorais e em uma maior resposta aos tratamentos com radiação e agentes citotóxicos (Grivicich, 2007).

### 3.7.2 Epidemiologia do Câncer

Por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor tanto física quanto psicológica, o câncer revela-se como um terrível problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Who, 2002), isto é, o câncer ganhou uma dimensão evidente de problema de saúde pública mundial. A OMS estima que até 2030 sejam previstos 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de

mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, convivendo com esta doença. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixas e médias rendas (Who, 2012).

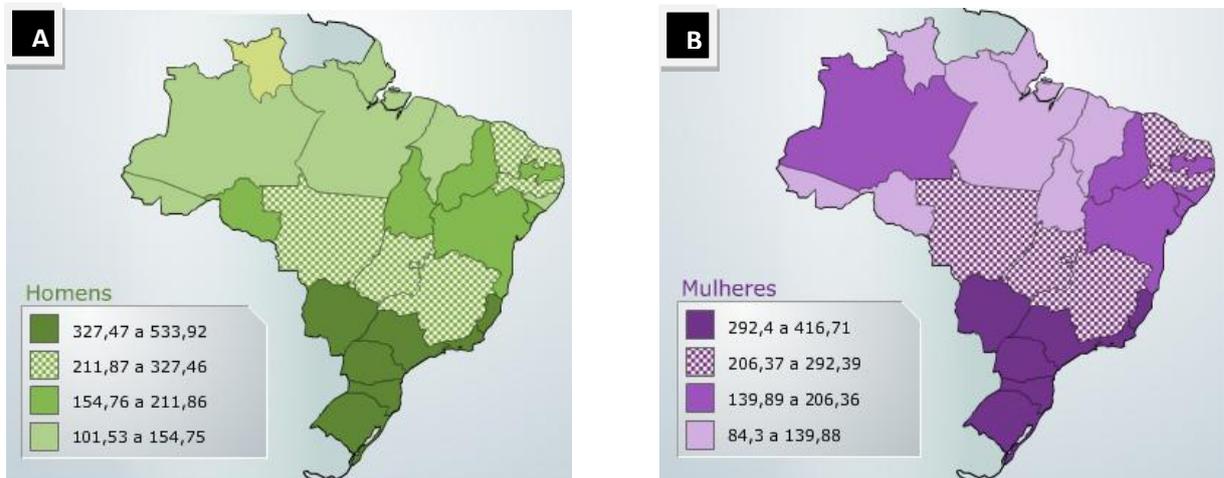
Nesse contexto, observam-se no Brasil alterações no perfil das enfermidades que acometem a população, verificando-se a partir dos anos 60 que as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias. Essa progressiva ascensão da incidência e da mortalidade por doenças crônico-degenerativas, conhecida como transição epidemiológica, tem como principal fator o envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde (Inca, 2014).

A distribuição epidemiológica do câncer no Brasil sugere uma transição em andamento envolvendo um aumento entre os tipos de câncer normalmente associados a alto status sócioeconômico - câncer de mama, próstata e cólon e reto - e, simultaneamente, a presença de taxas de incidência persistentemente elevadas de tumores geralmente associados com a pobreza – câncer de colo de útero, pênis, estômago e cavidade oral (Koifman & Koifman, 2003). Esta distribuição resulta da exposição a um grande número de fatores de risco ambientais relacionados ao processo de industrialização (agentes químicos, físicos e biológicos) e de exposição a outros fatores relacionados às disparidades sociais (Guerra et al., 2005). Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), no Brasil, as estimativas de incidência para o ano de 2014 são mostradas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer segundo a região.

Região	Estimativa dos Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Norte	10.090	9.930	20.020
Nordeste	47.520	51.540	99.060
Centro-Oeste	21.290	20.150	41.440
Sul	66.540	49.790	116.330
Sudeste	156.910	142.820	299.730
<b>BRASIL</b>	<b>302.350</b>	<b>274.230</b>	<b>576.580</b>

A representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas) pode ser observada na Figura 7.



**Figura 7:** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens (A) e por 100 mil mulheres (B), estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas).

Observa-se que os cinco tumores mais incidentes, exceto pele não melanoma, para o sexo masculino serão o câncer de pele não próstata (68,8 mil casos novos), pulmão (16,4 mil), cólon e reto (15 mil) e estômago (12,8 mil). Para o sexo feminino, destacam-se, entre os cinco mais incidentes, o câncer de mama (57,1 mil casos novos), cólon e reto (17,5 mil), colo do útero (15,6 mil) e pulmão (11 mil).

Mediante esses dados, constata-se a alta incidência do câncer no Brasil, fato este que também ocorre em outros países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos, bem como em países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros (Brasil, 2013).

### 3.7.3 Tratamentos Antineoplásicos

Há três tipos principais de tratamento que visam erradicar o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Murad & Katz, 2000). Além destes, há também a fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP) (Machado, 2000) e a

imunoterapia (Salmon, 1998). Geralmente, o tratamento segue a terapia combinada, onde é associado mais do que um tipo de tratamento. Somente um terço dos pacientes alcança a cura total por meio de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), que são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase por ocasião do tratamento. Porém, na maior parte dos casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70% dos casos com a quimioterapia (Chabner & Longo, 1996).

A quimioterapia (antineoplasia) consiste na administração de fármacos citotóxicos, capazes de promover morte celular ou pelo menos inibir o crescimento celular, ou seja, este tratamento visa erradicar o tumor ou reduzir seu crescimento, diminuindo dessa forma os sintomas relacionados ao câncer, promovendo a cura ou prolongando a vida do paciente. É considerada como o mais efetivo método de tratamento do câncer, uma vez que muitos tumores caracterizam-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, o que evidencia a necessidade de uma abordagem terapêutica sistêmica que é realizada pela quimioterapia (Nygren, 2001).

Historicamente, há evidências da utilização de agentes quimioterápicos sob a forma de sais metálicos à base de arsênio, cobre e chumbo em civilizações antigas do Egito e da Grécia. As primeiras utilizações de quimioterapia para controlar o câncer foram relatadas na década de 40, e nas décadas seguintes, o tratamento de pacientes com produtos químicos tóxicos tem representado um dos pilares da oncologia médica. Apesar dos frequentes efeitos secundários graves associados com tais tratamentos, ultimamente, a quimioterapia alcançou um patamar de eficácia se tornando uma modalidade de tratamento primário (Bagnyukova et al., 2010).

O sucesso no tratamento dos tumores por meio de fármacos depende da maior sensibilidade ao tratamento das células neoplásicas, comparativamente às células normais, uma vez que células em proliferação são, em geral, mais susceptíveis a estes agentes do que as células quiescentes. Todavia, as diferenças de sensibilidade entre células neoplásicas e normais são, às vezes, pequenas, e a toxicidade é um problema comum (Kwiecinski, 2007).

Os agentes tradicionais empregados no tratamento do câncer afetam diretamente a biossíntese do DNA e a maquinaria de replicação celular. Além dos agentes tradicionais têm se utilizado inibidores específicos de vias de sinalização

metabólicas e terapia combinada com diferentes agentes (Bagnyukova et al., 2010). O tratamento promove danos tanto nas células normais como nas neoplásicas, porém este dano é maior nas células malignas, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares e ao ciclo de divisões celulares (Demidenko & McCubrey, 2011).

As principais classes dos vários fármacos usados na quimioterapia do câncer até o momento incluem: os antimetabólitos, que inibem principalmente a síntese de purinas (ex: mercaptopurina, tioguanina, etc); agentes que inibem a formação de desoxirribonucleotídeos (ex: hidroxureia, fluoruracila); agentes que modificam o DNA por alquilação (ex: cisplatina); agentes que interagem com a topoisomerase II (ex: bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, etoposídeo); e agentes inibidores da síntese do RNA ou de proteínas (ex: actinomicina D, vincristina e vimblastina). Dentre estes grupos, os antibióticos antitumorais estão entre os mais importantes agentes utilizados na quimioterapia do câncer, e incluem os membros do grupo da antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina e o ácido aureólico. Entre os antibióticos clinicamente mais utilizados, encontram-se os derivados da daunomicina, particularmente doxorubicina e a mitomicina C (Kwiecinski, 2007).

Embora os fármacos com ação antitumoral sejam produzidos especificamente contra células cancerígenas, há outras células que são suscetíveis aos efeitos tóxicos desses agentes, que são as células hematopoiéticas, as células epiteliais intestinais normais e os queratinócitos da matriz capilar. Este fato explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções (Almeida et al., 2005). Outra importante limitação da quimioterapia é a resistência específica de alguns tumores a determinados medicamentos aliada ao problema da resistência a múltiplas drogas (MDR), os quais têm sido apontados como uma das principais causas de falha terapêutica e de mortes (Fernandes et al., 2005).

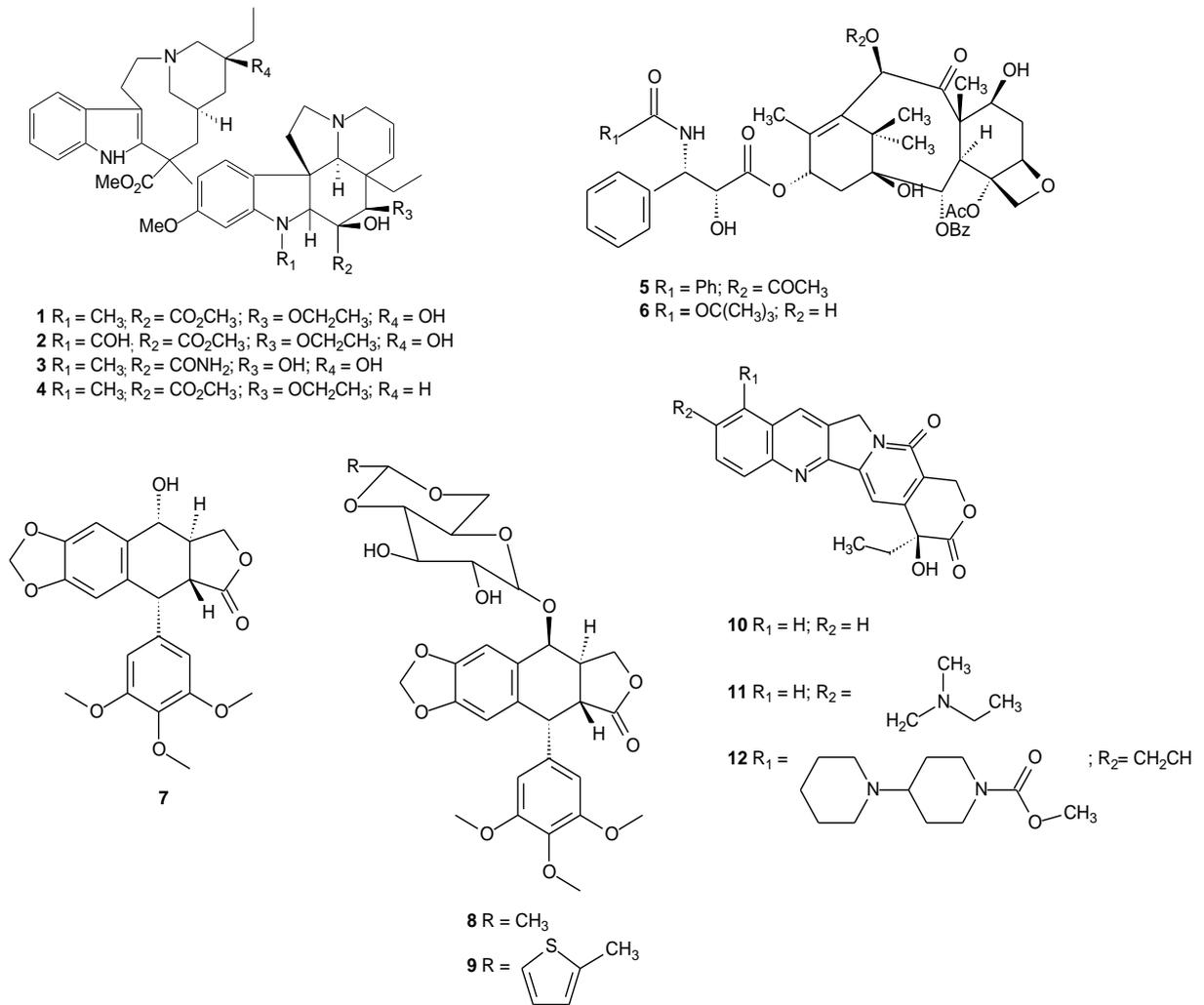
Nesse contexto, os recentes avanços na quimioterapia antineoplásica estão relacionados com os progressos alcançados na compreensão biológica da doença. A capacidade de distinguir o câncer como um erro na programação celular levando a modificações funcionais do tecido é muito importante para a estratégia de tratamento que consiste em matar as células cancerosas ou pelo menos inibir seu crescimento (Lord & Ashworth, 2010). A morte celular desempenha um papel importante no crescimento e na progressão do câncer, bem como na eficiência da quimioterapia.

Embora a apoptose seja geralmente considerada como o principal mecanismo de morte celular programada, tem sido cada vez mais relatado que vários agentes anticancerígenos não só induzem morte por apoptose, como também outros tipos de morte celular, tais como autofagia, necrose e catástrofe mitótica. O conhecimento dos mecanismos e das vias de sinalização destas mortes celulares trouxe um novo paradigma no qual o câncer pode ser extinto (Mansilla et al., 2012).

Os objetivos na utilização de fontes vegetais como agentes terapêuticos são: a) isolar os componentes bioativos para uso direto como fármacos, b) produzir compostos bioativos a partir de estruturas novas ou já conhecidas para semissíntese de produtos patenteáveis com elevada atividade e baixa toxicidade, c) usar os agentes como ferramentas farmacológicas e d) usar a planta inteira ou parte dela como um medicamento fitoterápico (Fabricant & Farnsworth, 2001).

Aliado aos tratamentos convencionais, tem se observado o uso de produtos naturais no combate ao câncer. O ambiente natural abriga uma gama de espécies de plantas, animais e micro-organismos, sendo rica fonte de compostos farmacologicamente ativos candidatos ao tratamento de patologias (Rocha et al., 2001). Logo, os produtos naturais têm sido valiosos para a compreensão da biossíntese e desenvolvimento de novos fármacos (Newman et al., 2012).

Durante o século XX houve um avanço significativo na pesquisa de substâncias de origem natural no âmbito da oncologia propiciando a descoberta de diversos fármacos usados na terapêutica antineoplásica, destacando-se a vimblastina (1) e a vincristina (2), e os análogos vindesina (3) e vinorelbina (4); paclitaxel (5) e o análogo docetaxel (6); a podofilotoxina (7) e os análogos etoposídeo (8) e teniposídeo (9); e a campotecina (10) e os análogos topotecano (11) e irinotecano (12) (Figura 8) (Costa-Lotufo et al., 2010).



**Figura 8:** Produtos naturais e seus análogos usados na terapia antineoplásica.

(Fonte: Costa-Lotufo et al., 2010).

Muitas fontes vegetais frequentemente utilizadas por populações locais ainda não foram estudadas ou seus princípios ativos ainda não foram totalmente identificados (Pan et al., 2009), portanto, é de suma importância o avanço do conhecimento químico e de potenciais efeitos terapêuticos, principalmente com uma possível atividade anticancerígena.

Nesse sentido, o avanço das pesquisas que avaliam a relação entre o consumo de frutas e vegetais, compostos bioativos e a modulação de processos oxidativos, inflamatórios e mutagênicos em organismos vivos depende da elucidação da rota de metabolização desses compostos, assim como o estabelecimento de níveis necessários e/ou seguros de ingestão depende também de se estabelecer de que forma esses compostos são transformados e como se encontram nos diferentes

tecidos e fluidos biológicos. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e o acesso mais fácil a ferramentas como a espectrometria de massas estão permitindo um avanço significativo nesta área. Ainda assim, é necessário a assimilação dos níveis de ingestão de compostos fundamentais para a manutenção da saúde, dadas a complexidade da matriz alimento, a variabilidade individual e a decisiva ação da microbiota intestinal na metabolização dessas substâncias (Oliveira & Bastos, 2011).

### **3.8 Escolha do Material Vegetal**

O Brasil vem se destacando mundialmente como um importante produtor e consumidor de frutas, especialmente as tropicais e subtropicais. O país é o terceiro maior produtor mundial de frutas, depois da China e da Índia, com 42 milhões de toneladas e mais de 30 polos produtivos, gerando uma receita de R\$ 17,7 bilhões (Moraes, 2013). Ainda de acordo com o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF), o Brasil tem exportado em média 271,2 mil toneladas de frutas frescas, crescimento de 8,6% em relação ao mesmo período do ano anterior quando 249,6 mil toneladas saíram do país para a mesa de consumidores estrangeiros, indicando também aumento no faturamento. Na comparação, as vendas estimam uma arrecadação de US\$ 206,3 milhões, 5,6% a mais do que no primeiro semestre de 2011 (IBRAF, 2012).

Dentre as frutas tropicais que ganharam importância comercial, transformaram-se em cultivos rentáveis e geradores de empregos encontram-se as Anonáceas (São José, 2003), 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). Vem também sendo amplamente investigada sua atuação na área antineoplásica; contudo, as pesquisas estão voltadas principalmente para o uso das folhas (Souza, 2009).

Deste modo, no presente trabalho de pesquisa optou-se pela utilização dos frutos 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 (Pereira et al., 2004).

### 3.8.1 Descrição Botânica

#### 3.8.1.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae foi estabelecida por Antoine Laurent de Jussieu em 1789 (Nascimento, 2008). A família Annonaceae pertence ao grupo das plantas Eudicotiledôneas, clado das magnoliídeas. 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 (Araújo, 2013; 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, flavonoides, compostos benzênicos, catequinas, proantocianidina, óleos essenciais, esteroides, terpenos, esteroides, alcaloides, acetogeninas, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, vitaminas, carotenos, saponinas, entre outros (Lima, 2007; Luna, 2006).

O gênero *Annona* compreende cerca de 114 espécies, sendo 110 neotropicais e 4 africanas. No Brasil ocorrem 81 espécies, destas 25 são endêmicas, estando distribuídas principalmente na Amazônia, na Caatinga, no Cerrado, na Mata Atlântica e no Pantanal (Araújo, 2013).

Até 1980, espécies do gênero *Annona* eram estudadas principalmente pelo seu teor em alcaloides (Leboeuf et al., 1982), mas, a partir de 1985, o interesse tem sido particularmente relacionado à presença de compostos de origem dos policetídeos, as acetogeninas, caracterizadas por suas atividades citotóxicas, especialmente, antitumoral, antiparasitária e pesticida (Fang et al., 1993).

No gênero *Annona* foram encontrados os flavonoides 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 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).

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).

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).

### 3.8.1.2. Espécie *Annona muricata* L.

A espécie *Annona muricata* (Annonaceae) pertence ao gênero *Annona*, sendo 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 9).



**Figura 9:** 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 de 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).

De acordo com Lima et al. (2006), a gravioleira produz um fruto composto, formado por um agregado de bagas, cujos componentes carpelares individuais persistem na casca, durante todo o desenvolvimento, na forma de espículas ou pseudoacúleos polposos, curvos e curtos. Os frutos podem apresentar formato irregular, em decorrência de falhas na fertilização e frutificação. Porém, nos cultivos comerciais em que a polinização manual é prática regular, eles são ovóides ou cordiformes. Além do formato, as características mais distinguíveis da graviola são a casca fina, de cor verde-escura, e a polpa branca, de sabor ácido e aroma característico.

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).

Têm-se poucas informações disponíveis sobre produtividade e área cultivada com gravioleira no Brasil. Os Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Paraíba, Pará e Minas Gerais são tidos como os principais produtores. As maiores áreas cultivadas encontram-se na Bahia, no Ceará e na região de cerrados do Brasil Central. Todavia, devido à evolução do mercado, novas áreas produtoras vêm sendo implantadas. Além disso, uma parcela representativa da produção é comercializada como fruta fresca, em especial, diferenciando-se do período anterior em que a produção era destinada quase que totalmente à agroindústria, visando a obtenção de polpa, suco, néctar, etc. (Lima et al., 2006).

A graviola é facilmente perecível com período de conservação limitado a poucos dias. Aliado à intensa atividade metabólica, o escurecimento enzimático tem contribuído para o elevado nível de perdas pós-colheitas nos frutos destinados à indústria, principalmente para a fabricação de polpa e o consumo *in natura*. Polpa-fruta é o produto não-fermentado, não-concentrado e não-diluído, com teor mínimo de sólidos totais, provenientes da parte comestível da fruta, obtido de frutas polposas, por processo tecnológico adequado (Alves et al., 2002; Anvisa, 2001).

Assim, a maioria dos produtores (93,8%) que a cultivam retira somente a casca e o pedúnculo da graviola e comercializa o produto bruto (denominado de massa pelos produtores); o despulpamento é feito nas agroindústrias. No entanto, 2,5% realizam a despulpa completa e optam pela venda da polpa pronta para consumo; o restante (3,7%) realiza as duas formas de processamento (Freitas, 2012). Dessa forma, o produtor pode armazená-lo e comercializá-lo em época mais adequada, e possivelmente obter preço mais vantajoso, além de agregar valor ao produto final (Freitas, 2012).

### **3.8.2 Propriedades Biológicas**

A *A. muricata* L. (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 (Barbalho et al., 2012; Brandão, 2003).

A graviola 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).

Além desses, pode-se destacar a utilização do suco do fruto, usado internamente como antitérmico, diurético e no combate a insônias leves. O bochecho é indicado no combate às aftas. A infusão das folhas secas é usada contra insônias graves, dores de cabeça e como emagrecedor, ao passo que a decocção das folhas frescas é indicada contra cistite (Araújo, 2013).

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).

Além disso, 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*.

Portanto, observa-se que os diferentes constituintes químicos presentes em *Annona muricata* L. exercem diversas atividades biológicas.

### 3.8.3 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, as quais são encontradas também nas folhas, casca e raízes da planta (Ferelli et al., 2005).

Alguns açúcares foram obtidos nas espécies de *Annona*, como a glicose encontrada nas folhas de *A. muricata* e nos frutos de *A. squamosa*, a frutose obtida a partir do fruto de *A. squamosa*, a sacarose a partir da polpa dos frutos de *A. cherimolia* e *A. squamosa*, sendo que na espécie *A. muricata* foi encontrada a sacarose, a glicose e a frutose (Araújo, 2013).

Em relação aos lipídios em *A. muricata* L., já foram identificados o ácido oleico, linoleico, linolênico, palmítico, palmitoleico, esteárico e mirístico nas sementes (Restrepo & Vinasco, 2010), enquanto que nas folhas foram identificados os ácido palmítico e oleico (Dorigoni, 2006). Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2011), observam-se traços de ácidos graxos saturados e poli-insaturados na polpa da graviola, sendo encontrado 0,05 g/100g de ácido palmítico.

Outros constituintes como a lignana (L-siringaresinol), aldeído aromático (siringaldeído) e esteroides foram isolados do caule de *A. montana*. Em *A. squamosa* e *A. senegalensis* foram isolados monoterpenos, enquanto diterpenos foram descritos em *A. squamosa* e sesquiterpenos em *A. bullata*. Inúmeras substâncias terpênicas foram isoladas a partir do fruto de *A. muricata* e de *A. reticulata* (Araújo, 2013).

Assim, estudos químicos com *A. muricata* L. conduziram ao isolamento de compostos de diversas classes, tais como: alcaloides, terpenoides, polifenóis e ácidos aminados. Todavia, nos últimos anos as pesquisas a partir desta espécie se dirigiram ao isolamento de compostos da classe das acetogeninas, principalmente a partir das folhas (Luna, 2006; Quispe et al., 2006; Yu et al., 1998; Gleye et al., 1997), visto ser esta classe uma promissora candidata ao tratamento de tumores. As acetogeninas são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa, sendo aparentemente de origem policetídica (C35-C37) (Souza, 2009; Liaw et al., 2005; Souza, 2003; Alali et al., 1999; Rupprecht et al., 1990).

Além disso, a determinação aproximada da composição nutricional e das propriedades físico-químicas da polpa, das sementes e do óleo extraído das sementes da graviola também foi avaliada 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, carotenoides e polifenóis nos frutos (Spada et al. 2008).

Outros exemplos de substâncias também são encontrados no gênero *Annona* como, os esteróides (Wu et al., 1987; Inoue et al., 2010), alcalóides (Chen et al., 1996a; Kuo et al., 2001; Soni et al., 2012), flavonoides (Vega, 2006), peptídeos (Morita et al., 2006; Wéle et al., 2008) e diterpenos ((Nascimento, 2008).

Em relação aos flavonoides, 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 (Valter et al., 2008; Santos & Salatino, 2000; Soares et al., 2000; Soares, 1996; Harborne, 1994b).

Os membros do gênero *Duguetia* destacam-se pela aparente ausência de glicosídeos de quercetina. Observa-se que foram identificados nas folhas de *Duguetia furfuracea* os seguintes flavonoides glicosilados: 3-O-galactosilgalactosilkaempferol, 3-O-galactosil-isoramnetina, 3-O-galactosilramnosil-isoramnetina e 3-O-ramnosilglucosil-isoramnetina. *Anaxagorea dolichocharpa* aparentemente não possui de flavonas e flavonóis (Santos & 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 isoprenoides, principalmente monoterpenos foram os principais compostos em *Duguetia asterotricha*. Estas espécies têm terpenoides e, geralmente, pequenos teores 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. dolichocharpa* 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 concentrações elevadas de compostos benzênicos (benzoato de metila e álcool 2-feniletíl) (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; Marchese, 2009; Luna, 2006; Esquinca, 2005; Jurgens et al., 2000; Leboeuf et al., 1982).

Outra importante classe de compostos isolados a partir da família Annonaceae são os terpenos. A abundância de diterpenos do tipo caurano é evidente (Luna, 2006). Em *Annona squamosa* e *Annona senegalensis* foram isolados monoterpenos, enquanto diterpenos foram descritos em *A. squamosa* e sesquiterpenos em *Annona bullata*. Inúmeros compostos terpenoides 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 que torna o presente trabalho de pesquisa valioso sob o enfoque do avanço de conhecimento químico e físico-químico acerca desta espécie vegetal no que se refere às substâncias presentes na polpa do fruto, bem como da sua ação antineoplásica e antioxidante.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos relacionados à parte química foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA / UENF). Contou-se com a colaboração do Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal (LZNA) para a realização de algumas das análises físico-químicas (fibras e proteínas), do Laboratório de Fitotecnia (LFIT), setor de nutrição mineral de plantas, para a análise de minerais. As análises de CG-MS e infravermelho foram realizadas no Centro de Ciências e Tecnologias (LCQUI) e as análises de Ressonância Magnética Nuclear foram em colaboração com o Laboratório de Multiusuários de Análises do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (UFRJ) e também com o Laboratório de Multiusuários (UENF). Já para os experimentos relacionados à parte biológica contou-se com a colaboração do Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR / CBB / UENF).

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

O material vegetal foi coletado no Município de Bom Jesus do Itabapoana – RJ (Latitude = -21° 08' 02". Longitude = 41° 40' 47") nos períodos de frutificação, os quais correspondem aos meses de dezembro a fevereiro de 2011. A exsiccata foi depositada sob o código H5488 no Herbário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

## **4.2 Parte Química**

### **4.2.1 Técnicas Cromatográficas**

A Cromatografia é uma das técnicas mais empregadas em diversas indústrias como alimentícias, farmacêuticas, petroquímicas, laboratórios de análises clínicas, etc., onde frequentemente é necessário purificar, isolar ou quantificar substâncias de misturas muito complexas. Sendo esta a técnica mais apropriada para uma separação mais eficiente de extratos brutos como também para controlar a pureza final de compostos isolados (CRQ, 2010).

#### **4.2.1.1 Cromatografia em Camada Delgada**

Todas as amostras foram, em princípio, avaliadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a qual se constitui em uma técnica rápida e de baixo custo para uma análise qualitativa e semiquantitativa (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). 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 e também de solução de vanilina (método químico) (Sabudak et al., 2005).

#### **4.2.1.2 Cromatografia em Coluna**

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

- *Sílica para cromatografia de fase inversa RP-2 e RP-18*: Consiste em uma fase estacionária não-polar constituída de 2 carbonos e 18 carbonos, respectivamente, 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).

#### **4.2.1.3 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas**

Também foi empregada a Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM), a fim de se avaliar e estabelecer o perfil químico das substâncias, visto ser esta técnica muito útil para separação de compostos que podem ser vaporizados sem decomposição (Baggio & Bragagnolo, 2004).

Para as análises no Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM), modelo CGMSQP5050A Shimadzu, utilizou-se coluna DB-5ms (comprimento 30m, espessura 0,25 µm e diâmetro de 0,25mm), gás carregador hélio (He), volume de injeção de 1µL, temperatura de 80°C a 280°C com aumento de 10°C/min, mantendo a temperatura final por 40 minutos, temperatura inicial de injeção: 280 °C, modo de controle split, fluxo da coluna de 1,5 mL/min, velocidade linear de 44,7cm/s, fluxo total de 17, 3 mL/min. As condições do detector de massas foram: temperatura de interface: 280 °C, impacto de elétrons de 70 eV, razão scan: 1scan/s, com faixa de aquisição de massa de 40-400u.

#### 4.2.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para averiguar a pureza das substâncias identificadas, foi empregada a CLAE, a qual é uma técnica que possui alta sensibilidade e informação qualitativa do pico desejado (Baggio & Bragagnolo, 2004).

O sistema de solvente usado foi água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) (bomba A) e acetonitrila (bomba B), sendo a eluição gradiente, conforme ilustrado na Tabela 4, com fluxo de 1 ml/min. As amostras foram preparadas na concentração de 5 mg/ml (p/v).

**Tabela 4:** 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	75	15
15	80	20
20	70	30
25	60	40
30	30	70
40	0	100
45	0	50
50	0	0

O equipamento utilizado para as análises em CLAE foi Shimadzu Class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, sendo a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 e 350 nm (detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A), com injetor Rheodyne 7725i, volume de injeção de 20 µL, e coluna RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm).

#### 4.2.1.5 Métodos Espectroscópicos

Para a identificação e caracterização das substâncias foram usados os métodos espectroscópicos como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e APT e técnicas bidimensionais como COSY  $^1\text{H}$  - $^1\text{H}$ , HMQC e HMBC. A

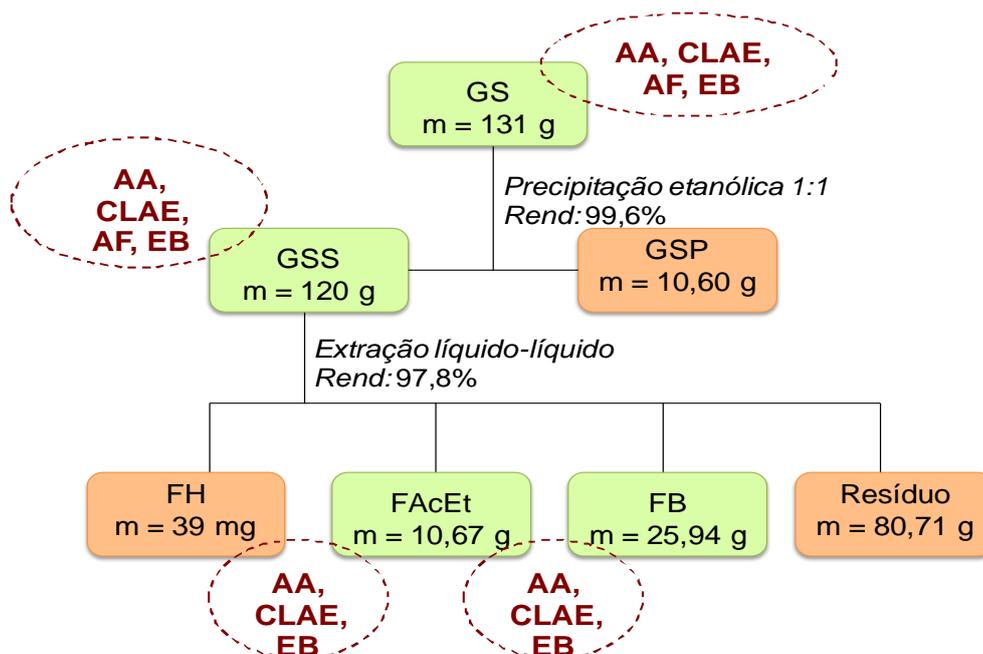
amostra foi solubilizada em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>) e o equipamento utilizado para as análises foi:

- Varian 400 MHz e 500 MHz, do LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por RMN);
- Varian 500 MHz (Laboratório de Análises por RMN- CCT - UENF)

A espectrofotometria de infravermelho também foi empregada. A pastilha de KBr (seco) 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 na região de 4000 a 500cm<sup>-1</sup>. O equipamento usado foi o Modelo IRAffinity-1 de Transformada de Fourier (Shimadzu), com softawre IR solution.

#### 4.2.2 Preparação do Extrato Aquoso e Frações

Os frutos de *Annona muricata* L. foram lavados com água destilada e separadas as suas partes (casca, semente e polpa). A polpa foi submetida à extração com água, originando o extrato aquoso (GS), o qual foi preparado na proporção de 75% (p/v), em liquidificador comercial, sendo depois centrifugado e liofilizado. Uma parte do extrato aquoso foi submetida a uma precipitação com etanol (1:1) originando um sobrenadante (GSS) e um precipitado (GSP) (Figura 10).



**Figura 10:** Esquema da obtenção do extrato aquoso e frações a partir da polpa de *A. muricata* L. AA = Atividade Antioxidante. EB = Ensaio Biológico.

Após, realizou-se uma extração líquido-líquido a partir do sobrenadante (GSS) com solventes em ordem crescente de polaridade, originando as seguintes frações: hexano (FH), acetato de etila (FACeT), butanol (FB). A outra parte do extrato aquoso foi submetida aos ensaios biológicos.

Sendo este um estudo bioguiado, as frações FACeT e FB foram selecionadas para as purificações e outros ensaios por serem aquelas que apresentam as substâncias mais promissoras, visto terem apresentado atividade biológica.

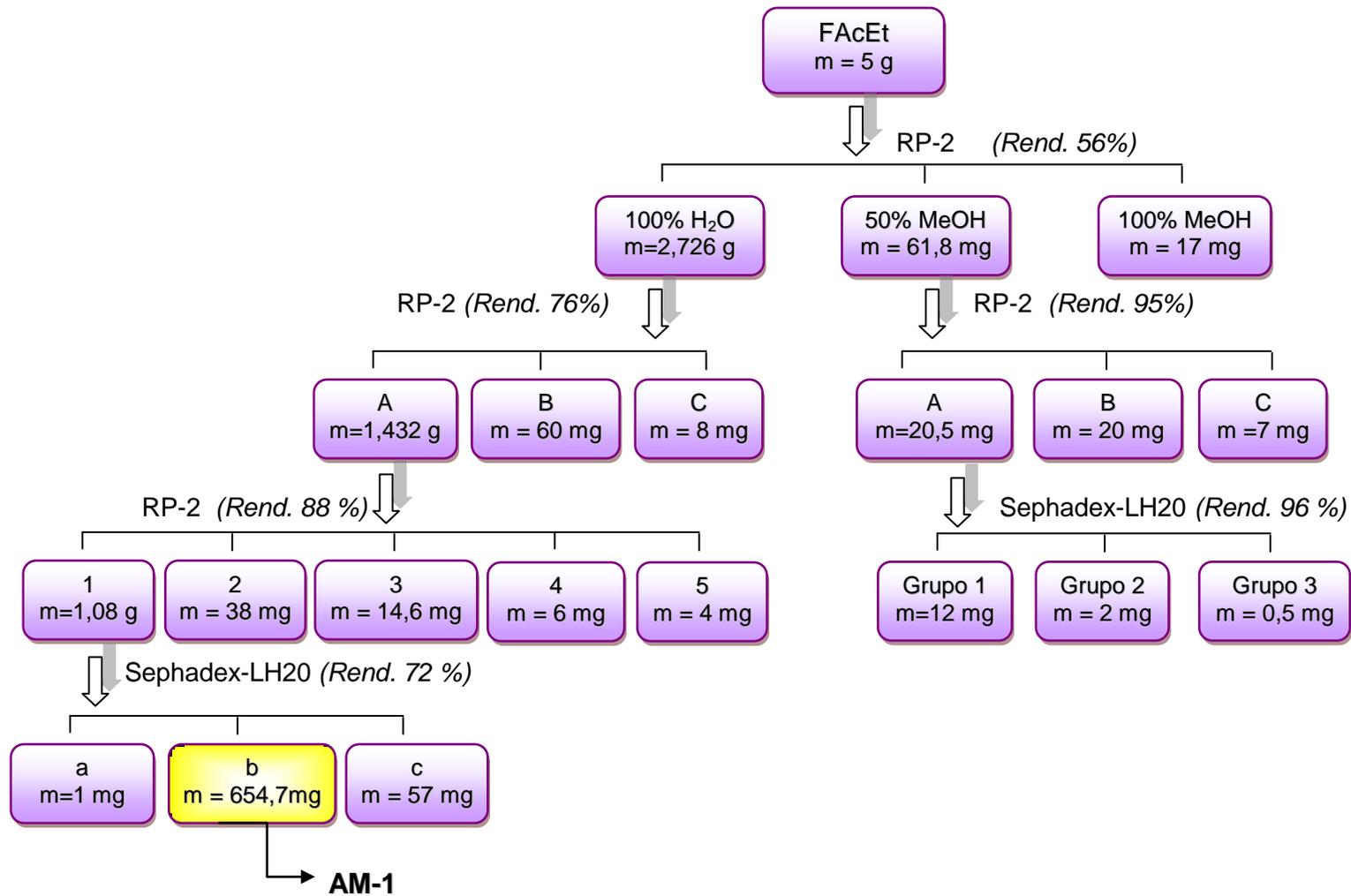
#### 4.2.3 Fracionamento, Isolamento e Identificação de Substâncias

Após obtenção, as frações (FACeT e FB) foram submetidas às técnicas cromatográficas como especificado no item 4.2.2 A fase móvel empregada nas colunas cromatográficas até a obtenção das frações é apresentada na Tabela 5. Já as fases estacionárias utilizadas para a montagem das colunas cromatográficas empregadas, bem como as subfrações resultantes e seus rendimentos são mostrados nas Figuras 11 e 12. Vale ressaltar que o processo de fracionamento foi direcionado pela CCD, onde as frações eluídas foram agrupadas em conjuntos de acordo com as manchas semelhantes entre si.

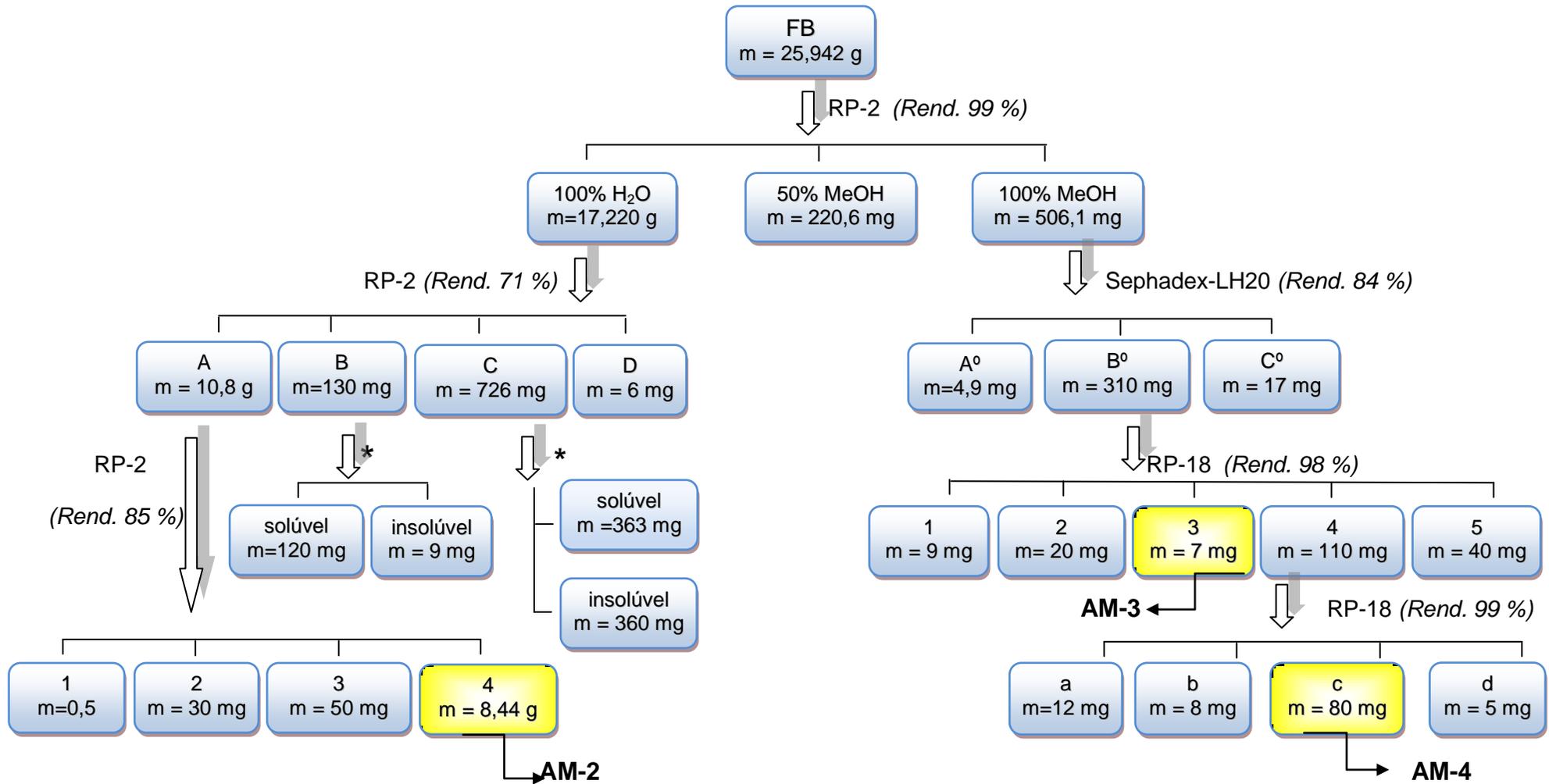
**Tabela 5:** Sistema de solventes utilizado na cromatografia em coluna aberta.

<b>Concentração de A (Água acidificada)</b>	<b>Concentração de B (Acetonitrila)</b>
100	0
70	30
50	50
30	70
0	100

Todas as frações e subfrações foram submetidas à análise por CLAE. As substâncias isoladas foram codificadas por: AM-1, AM-2, AM-3, AM-4 e AM-5.



**Figura 11:** Esquema do fracionamento da FAcEt. **A** = Subfração 0% MeOH. **B** = Subfração 50% MeOH. **C** = Subfração 100% MeOH. **1** = Subfração 0% MeOH. **2** = Subfração 30% MeOH. **3** = Subfração 50% MeOH. **4** = Subfração 70% MeOH. **5** = Subfração 100% MeOH. **AM-1** = Substância isolada.



**Figura 12:** Esquema do fracionamento da FB. **A** = Subfração 0% MeOH. **B** = Subfração 50% MeOH. **C** = Subfração 70% MeOH. **D** = Subfração 100% MeOH. **A<sup>o</sup>** = Subfração 0% MeOH. **B<sup>o</sup>** = Subfração 50% MeOH. **C<sup>o</sup>** = Subfração 100% MeOH. **1** = Subfração 0% MeOH. **2** = Subfração 30% MeOH. **3** = Subfração 50% MeOH. **4** = Subfração 70% MeOH. **5** = Subfração 100% MeOH. **a** = Subfração 0% MeOH. **b** = Subfração 50% MeOH. **c** = Subfração 70% MeOH. **d** = Subfração 100% MeOH. **AM-2**, **AM-3**, **AM-4** = Substâncias isoladas. \* = lavagem com THF.

### 4.3 Análises de Parâmetros Físico-Químicos

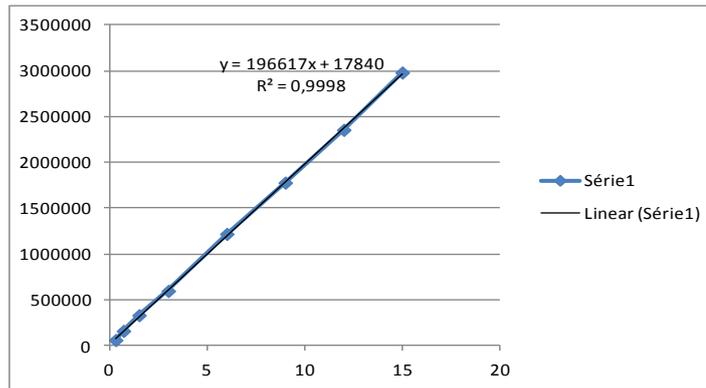
#### 4.3.1 Açúcares Redutores

A análise do teor de açúcares redutores foi feita com 1g de polpa fresca diluída em 10 mL de água Milli-Q, a qual foi centrifugada por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado (filtro 0,45 $\mu$ m) e injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, modelo CBM-20<sup>a</sup>, utilizando coluna rezex RCM-Monosaccharide Ca<sup>+2</sup> (300 X 7,8 mm) com fluxo de 0,6 mL/min, temperatura de 85°C; volume de injeção de 20  $\mu$ l; detector de índice de refração RI YL9170; sendo a fase móvel aquosa (Rezex, 2011; Zuleta & Sambucetti, 2006).

Foi empregado o método de padronização externa. Uma curva analítica com diferentes concentrações (0,3 a 15mg/mL) de padrões de glicose (Merck) (Tabela 6; Figura: 13) e outra para frutose (Merck) (Tabela 7; Figura: 14) foram realizadas. Através de regressão linear foi obtida a equação da reta e a partir desta, a concentração de glicose e frutose na amostra.

**Tabela 6:** Dados de massa (em mg/mL) de glicose injetada e as respectivas áreas obtidas.

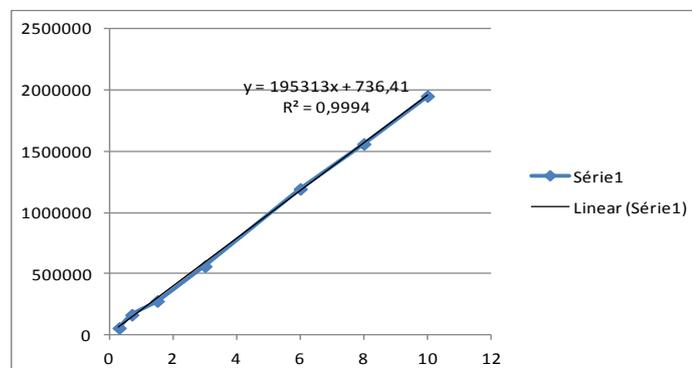
Massa de glicose injetada (em mg/mL)	Área correspondente ao pico
15	2.981.595
12	2.355.575
9	1.778.897
6	1.218.826
3	5.963.665
1,5	331.133
0,7	159.543
0,3	60.102



**Figura 13:** Gráfico da área do pico X massa (em mg/mL) injetada de glicose obtido a partir dos valores apresentados na Tabela 3.

**Tabela 7:** Dados de massa (em mg/mL) de frutose injetada e as respectivas áreas obtidas.

Massa de frutose injetada (em mg/mL)	Área correspondente ao pico
10	1.951.828
8	1.560.578
6	1.193.124
3	561.416
1,5	277.340
0,7	165.280
0,3	57.311
10	1.951.828



**Figura 14:** Gráfico da área do pico X massa (em mg/mL) injetada de frutose obtido a partir dos valores apresentados na Tabela 4.

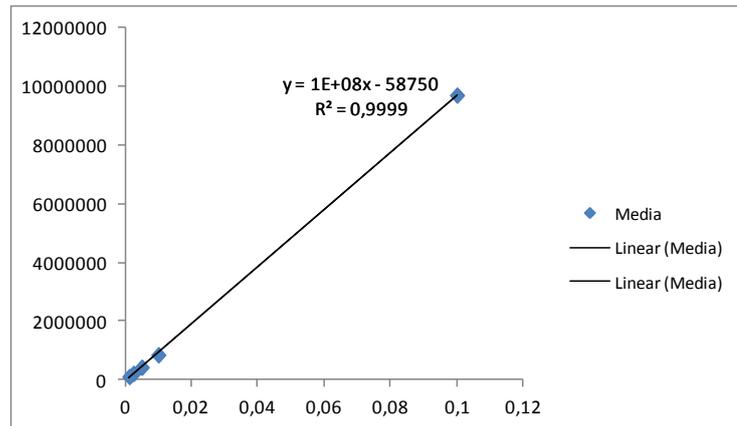
### 4.3.2 Ácido Ascórbico

Para a análise do teor de vitamina C foi empregada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Cerca de 1g de amostra foi homogeneizada em solução de ácido oxálico 0,5% em um volume final de 10 mL e centrifugada por 10 minutos. O sobrenadante foi levado ao ultrassom por 10 minutos. A amostra foi filtrada (filtro milipore 0,45 $\mu$ m) e injetada no cromatógrafo, sendo usada a coluna C-18 Macherey-Nagel. O sistema de solvente utilizado foi fosfato de potássio monobásico (P.A.) e brometo de cetil trimetil amônio, com eluição isocrática usando fluxo de 1mL/min no comprimento de onda de 254nm e DAD (detector de ultravioleta). Uma solução padrão de ácido ascórbico foi utilizada para a determinação do tempo de retenção do mesmo (AOAC, 1995).

Foi empregado o método de padronização externa. Uma curva analítica com diferentes concentrações (0,00125 a 1mg/mL) de padrão ácido ascórbico (Merck) (Tabela 8; Figura: 15) foi realizada. Através de regressão linear foi obtida a equação da reta e a partir desta, a concentração de ácido ascórbico na amostra.

**Tabela 8:** Dados de massa (em mg/mL) injetada de ácido ascórbico e as respectivas áreas obtidas.

<b>Massa de Ác. Ascórbico injetada (em mg/mL)</b>	<b>Área correspondente ao pico</b>
1	62.094.786
0,5	32.412.488
0,15	9.963.386
0,1	9.706.600
0,01	8.473.635
0,005	423.682
0,0025	211.841
0,00125	105.921



**Figura 15:** Gráfico da área do pico X massa (em mg/ml) injetada de ácido ascórbico obtido a partir dos valores apresentados na Tabela 5.

### 4.3.3 Sólidos Solúveis Totais- °Brix

Os sólidos solúveis totais foram expressos em °Brix. Foram determinados por refratômetro digital Quimies-Q-1098, e os valores expressos em °Brix (AOAC, 1997- proc. 920.151), gotejando-se duas gotas da amostra na superfície do aparelho devidamente calibrado.

### 4.3.4 Umidade

Os cadinhos de porcelana foram secos, com suas respectivas tampas, por meia hora, na estufa a 130° C e colocados no dessecador para esfriar antes de pesar. Pesou-se cerca de 2g da amostra em cadinho seco e tarado, o qual foi levado à estufa regulada a 100 – 105 °C por 4 horas. Após, a amostra foi pesada em balança analítica e repetiu-se a operação até se obter peso constante na pesagem ou que a diferença entre as pesagens não fosse superior a 0,01g (AOAC, 1995). As análises foram realizadas em triplicata. Foi empregada a seguinte fórmula para obtenção do valor de % de umidade:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{(PA - PAS) \times 100}{PA}$$

Onde:

PA = peso da amostra úmida

PAS = peso da amostra seca

#### 4.3.5 Proteínas

Para determinação do nitrogênio total (NT) alíquotas com aproximadamente 2g de polpa de graviola foram submetidas às etapas de digestão, destilação e titulação de acordo com os procedimentos sugeridos pelo método de Kjeldahl que mensura a concentração de nitrogênio total contido na amostra *in natura*. O teor de proteína foi calculado através da multiplicação do teor de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25 calculado a partir do perfil de aminoácidos da amostra (AOAC, 1995).

Foi também realizada a determinação do teor de proteínas na amostra seca, seguindo a metodologia sugerida por Thiex et al. (2002), onde pesa-se aproximadamente 0,25g de amostra seca, embrulha-se em papel de seda e coloca-se nos tubos digestores. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em g de proteína total ou bruta/100g de amostra.

#### 4.3.6 Fibras

A quantificação do teor de fibras foi realizada segundo Mertens (2002), onde as fibras em detergente neutro tratadas com amilase (aNDF<sub>om</sub>) foram determinadas por gravimetria, sendo o valor expresso em g/100 g de amostra, o qual corresponde à lignina, celulose e hemicelulose.

A solução de detergente neutro (ND) é estável ao calor e  $\alpha$ -amilase é usada para dissolver facilmente proteínas, lípidios, açúcares, amidos, pectinas digeridos na alimentação animal, deixando um resíduo fibroso que é principalmente composto de parede celular do material vegetal (celulose, hemicelulose, e lignina) e matéria nitrogenada indigesta em produtos de origem animal. O aNDF é um método gravimétrico que melhor estima a fibra insolúvel total e está inversamente relacionado com a digestibilidade. Matérias solúveis em ND são quase completamente digeridas pela maioria dos animais; no entanto, a digestibilidade de aNDF é variável entre os alimentos e está relacionada com a lignina e outros constituintes em fibra (Mertens, 2002).

Solução ND aquecida tem capacidade limitada para solubilizar amido; por conseguinte, uma amilase estável ao calor é usada para hidrolisar amido de sacarídeos que podem ser facilmente removidos a partir de fibras por meio de

filtração. Amilases estáveis ao calor são usadas em soluções quentes para inativar enzimas contaminantes potenciais em extratos brutos de amilase que podem degradar componentes fibrosos. Para assegurar que a atividade da amilase é suficiente para remover a maior parte do amido e para reduzir as dificuldades de filtração, é necessário medir (Mertens, 2002).

#### **4.3.7 Teor de Minerais**

O material vegetal foi seco a 70°C em estufa de circulação forçada; triturado em moinho de facas (tipo Wiley) com peneira de 20 mesh; acondicionado em tubos falcon, sendo após submetido à digestão sulfúrica. Os teores de P, K, Ca, Mg, S, B, Fe, Zn, Mn e Cu foram determinados usando Espectrômetro de Emissão óptica acoplado em plasma (ICPE-9000) da marca Shimadzu, após digestão com HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em sistema de digestão aberta. Para as curvas de calibração foram utilizadas ampolas de padrões para absorção atômica (Peters, 2005).

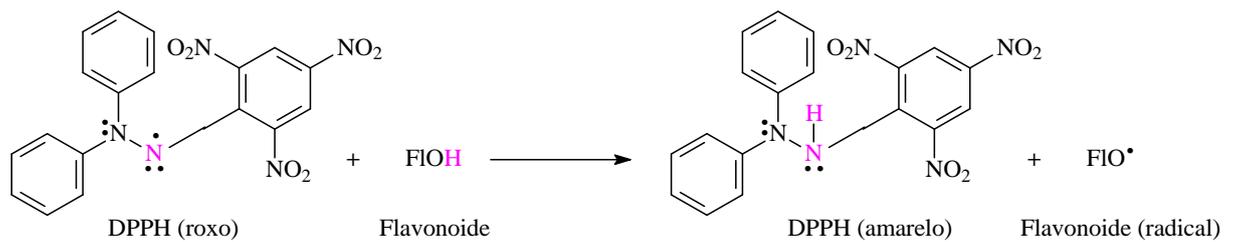
### **4.4 Atividade Antioxidante**

#### **4.4.1 Método de DPPH**

O extrato aquoso e o sobrenadante foram submetidos à avaliação quanto à atividade antioxidante pelo método fotocolorimétrico do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH – 0,1mM).

O DPPH é um método químico, aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade. Seu mecanismo de reação é baseado na transferência de elétrons (Bernardes, 2011).

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 515-520 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R<sup>•</sup>), o DPPH<sup>•</sup> é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) (Figura 16). A redução do radical DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorvância durante a reação (Sucupira et al., 2012).



**Figura 16:** Representação da reação do radical DPPH com um antioxidante (Flavonoide) (Ali et al., 2009).

Este método consiste na adição de 1 mL do extrato em concentrações que variam de 0,1 - 1000  $\mu\text{g/mL}$ , 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), bem como a quercetina (Sigma-Aldrich, Brasil), rutina (Sigma-Aldrich, Brasil) e apigenina (Sigma-Aldrich, Brasil). Após, o percentual sequestrador (PS%) de radicais livres foi calculado (Koleva et al., 2002). A capacidade de sequestrar radicais livres foi expressa como percentual de inibição da oxidação do radical e foi calculada mediante a seguinte fórmula (Yen & Duh, 1994):

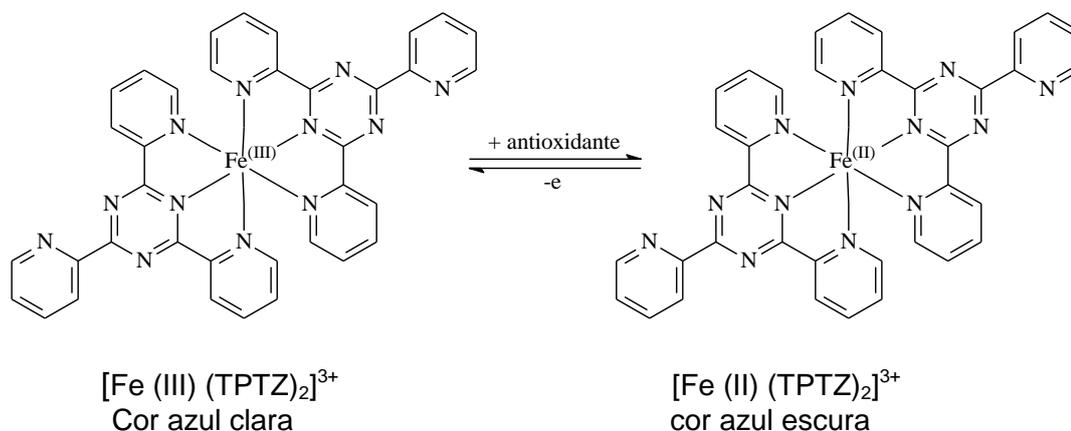
$$\% \text{ de inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}}) / A_{\text{DPPH}}) * 100$$

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

#### 4.4.2 Método de Redução do Ferro (FRAP)

O método FRAP também é utilizado para medir a capacidade antioxidante de frutos. Neste método, o complexo férrico-tripiridiltriazina ( $\text{FeIII-TPZ}$ ) é reduzido

ao complexo ferroso (FeII-TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas (Figura 17).



**Figura 17:** Representação da reação FRAP mostrando a redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) em complexo ferroso (FeII-TPZ) (Rufino et al, 2006).

Os extratos e o sobrenadante também foram submetidos à avaliação da atividade antioxidante pelo método Redução do Ferro (FRAP). Foram pesadas 2 mg de amostra, a qual foi solubilizada com 500µL de metanol a 50% e 500µL de acetona a 70%. O reagente FRAP foi obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 90 µL das amostras diluídas para tubos de ensaio, acrescentados 270 µL de água destilada com 2,7 mL do reagente FRAP, a qual foi mantida em banho-maria a 37 °C. A leitura foi feita a 595 nm após 30 minutos da mistura preparada e o reagente FRAP usado como branco para calibrar o espectrofotômetro. Uma curva padrão foi feita com o Trolox entre 50µM e 1500µM, sendo os resultados expressos em µM Trolox/mg de amostra.

## 4.5 Parte Biológica

### 4.5.1 Cultura das linhagens de células de origem neoplásica

As linhagens U937 (célula humana de linfoma histiocítico), THP-1 (leucemia monocítica aguda) e célula H460 (carcinoma de pulmão) foram

cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL). As culturas foram replicadas a cada dois dias e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada.

#### **4.5.2 Avaliação do efeito citotóxico dos compostos frente às células neoplásicas por análise da viabilidade celular por metabolização do MTT**

As células U937, THP-1 e H460 foram plaqueadas em volume de 100 µL/poço (1x10<sup>6</sup>cels/mL) em placas de 96 poços, tratadas com os extratos, as frações ou as substâncias isoladas nas concentrações finais de 400 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg e 25 µg. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada.

Como controles negativos todas as células foram incubadas com meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). Para os extratos, as frações ou as substâncias isoladas testadas, as células foram incubadas com DMSO (SIGMA<sup>®</sup>) na concentração ideal. Como fármaco padrão, a doxorrubicina foi utilizada para fins comparativos com as mesmas concentrações dos compostos com grau de pureza elevado.

O microensaio colorimétrico utilizando MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) foi realizado após tratamento para avaliar a viabilidade celular. As células foram incubadas por 48 horas com os extratos/frações/substâncias isoladas e após o tempo determinado foram adicionados 20 µL de MTT (Sigma, 5 mg/mL) para cada 100 µL de cultivo. As amostras foram mantidas na estufa por quatro horas para a metabolização do MTT. Após esse período foram retirados 150 µL do sobrenadante de cada poço e depois adicionados 100 µL de uma solução de HCl com isopropanol, homogeneizando bem para permitir a solubilização dos cristais de formazan. A leitura dos valores da absorbância da placa de 96 poços foi realizada em espectrofotômetro (EPOCH<sup>™</sup>, BioTax<sup>®</sup> Instruments, Inc.) em comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

## 4.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas para os testes de viabilidade e indução de apoptose utilizando o programa GraphPad versão 4.0. Para ambos os experimentos foi utilizado o teste estatístico One-way ANOVA. As diferenças significativas foram consideradas como  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ .

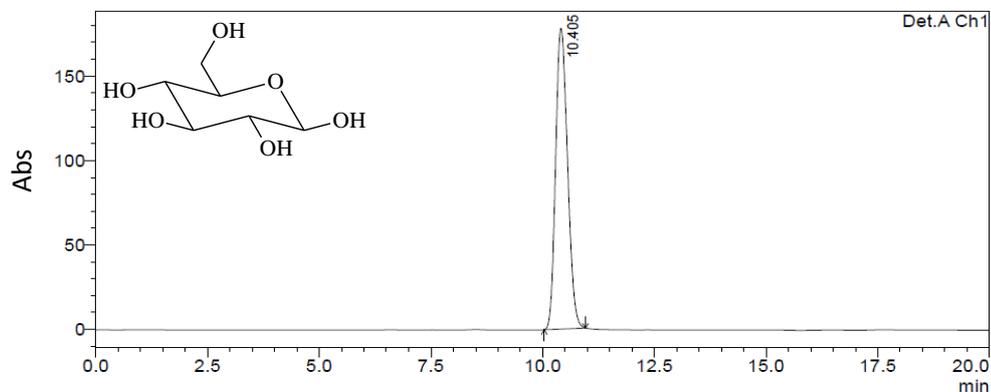
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análises dos Parâmetros Físico-químicos

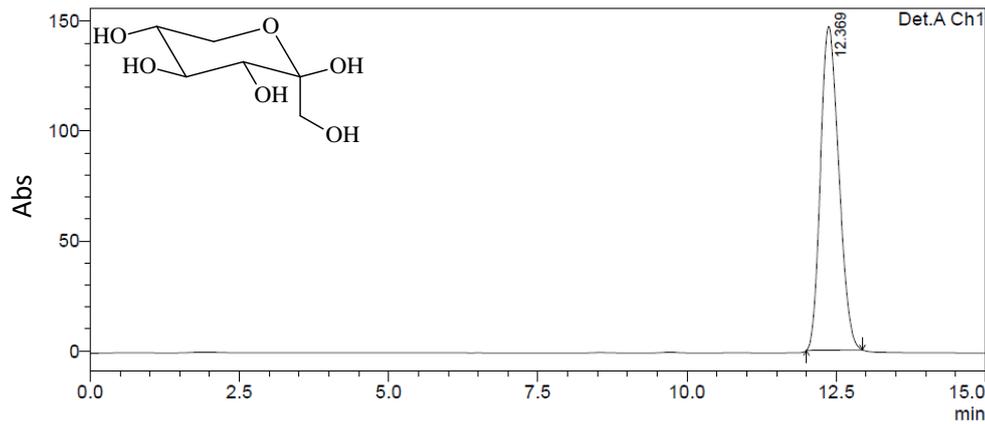
#### 5.1.1 Açúcares Redutores

Os carboidratos simples mais encontrados nos alimentos são a glicose, e a frutose, sacarose, lactose e, entre os mais complexos, o amido (Chitarra, 2000).

Na análise de carboidratos presentes na polpa de *Annona muricata L.* foram aplicados 2 padrões, a glicose (Figura 18) e a frutose (Figura 19), com a finalidade de avaliar qualitativamente os padrões e quantificar esses açúcares nesta espécie vegetal.



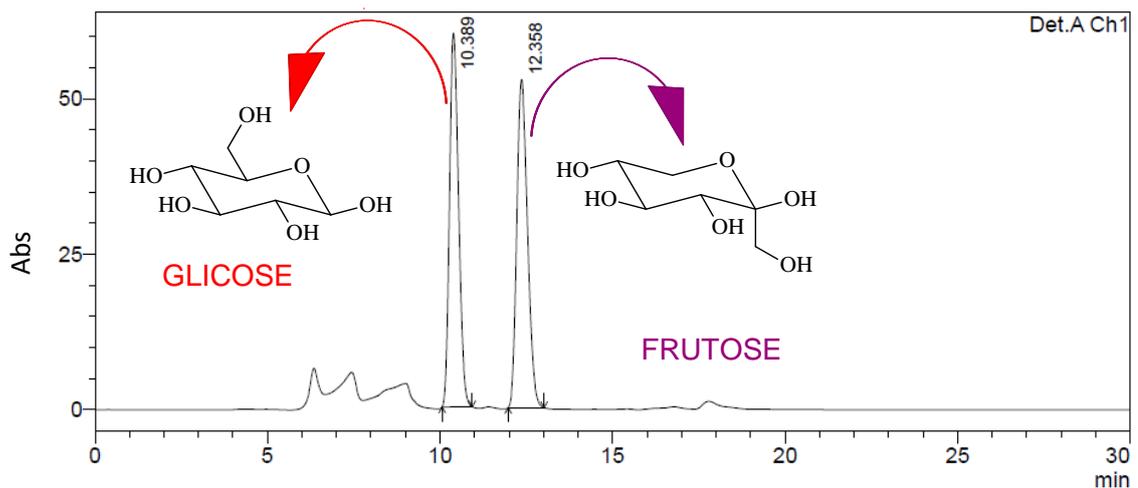
**Figura 18:** Cromatograma do padrão de glicose avaliado por CLAE. C=1mg/mL



**Figura 19:** Cromatograma do padrão de frutose analisado por CLAE. C=1mg/mL

Observando as Figuras 18 e 19 é possível notar que os picos estão com boa base e bem finos, significando que os padrões estão conforme especifica a literatura, podendo também observar que há somente um pico em cada cromatograma significando que a análise por CLAE corresponde ao observado na literatura (Collins et al., 2006).

A Figura 20 mostra o cromatograma da análise do teor de carboidratos da polpa da graviola, onde é possível verificar os picos correspondentes tanto da glicose (Tr 10,389min) como da frutose (Tr 12.358 min).



**Figura 20:** Cromatograma da análise de açúcares identificados na polpa de *A. muricata L.*

A partir da curva padrão de glicose e frutose realizada (descrita no item 4.2.1.1) foi possível quantificar esses dois açúcares presentes, sendo os resultados obtidos mostrados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Teor de glicose e frutose identificados na polpa de graviola.

<b>Carboidratos</b>	<b>Concentração</b>	
	<b>(g/100g)</b>	<b>%</b>
Glicose	2,047	2,0
Frutose	2,892	2,9

Segundo Cardozo (2009), a graviola é uma fruta rica em carboidratos e ácidos. Em especial, os frutos são ricos em carboidratos, principalmente, sacarose, glicose e frutose, e possuem baixíssimos teores de gorduras.

Almeida et al. (2009) estudando a composição de açúcares em frutas tropicais do nordeste brasileiro, detectaram um teor superior destes carboidratos (53,0 % de frutose e 47,0 % de glicose) na graviola, a qual pode ser consequência, provavelmente, da hidrólise da sacarose pelas invertases.

Lima et al. (2002) avaliando a qualidade e a suscetibilidade ao escurecimento oxidativo da graviola durante a maturação pós-colheita verificaram que o conteúdo de açúcares após a colheita ocorre devido à degradação do amido, mas há diferenças na intensidade do processo em função de vários fatores, inclusive estádios de maturação. O conteúdo de açúcares redutores, cujos principais são glicose e frutose, aumentou linearmente durante a maturação até atingir 12,4%, nos frutos maduros. Há relatos de valores de açúcares redutores em graviolas maduras, respectivamente, de 3,0 e 8,0% (Paull et al., 1983) e 3,0 e 9,0 % (Aziz & Yusof, 1994). Embora glicose e frutose se encontrem em percentuais similares durante o desenvolvimento e a maturação da graviola, no estágio ideal para consumo têm sido verificados níveis levemente maiores de um deles (Aziz e Yusof, 1994).

De acordo com Chitarra & Chitarra (1990), o teor de açúcares individuais (glicose e frutose) é importante quando se deseja quantificar o grau de doçura do produto, uma vez que o poder adoçante desses açúcares é variável. Não

obstante, a maioria dos trabalhos não quantifica os açúcares individualmente, mas sim, os açúcares totais.

Rios (2013) detectou o teor de 11,5 a 18,2 g/100g de glicídios e 10,1 a 16,8 g/100g de açúcares totais. Leung & Flores (1961) apud Falcão et al. (1982), determinaram o teor de 14,9 g de carboidratos totais para a polpa de graviola. Abbo et al. (2006) relatam que o suco de graviola é composto de água e 11,3% de carboidratos.

Já a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) atribui à polpa de graviola *in natura* o teor de 15,8g/100g de carboidratos. Vale destacar que estes valores são referentes a carboidratos totais e no presente estudo identificou-se apenas a glicose e frutose estando, portanto, os valores encontrados abaixo do que registra a TACO.

A ingestão de frutose no Brasil não está bem estabelecida. Estima-se um consumo médio de cerca de 4,34g/dia de frutose livre, originária de frutas, doces, hortaliças e outros vegetais. A concentração de frutose proveniente da sacarose é de aproximadamente 27,5g/dia. Essa estimativa foi baseada em dados estatísticos de consumo de produtos alimentares fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2002).

As anonáceas, como graviola, são denominadas climatéricas e apresentam padrão de liberação de CO<sub>2</sub> bastante distinto da maioria das espécies, com climatério difuso, com mais de um ponto máximo. Juntamente com o climatério respiratório, ocorre a produção autocatalítica de etileno, e os frutos continuam o processo de amadurecimento após a colheita. Assim, geralmente os frutos climatéricos, como as anonáceas, podem ser colhidos em estádios iniciais de maturação, com possibilidade de amadurecimento e boa qualidade pós-colheita (Farias et al., 2011).

Além disso, os frutos climatéricos apresentam consideráveis mudanças no conteúdo de açúcares totais, que aumentam não só durante o período de sua maturação na árvore, como também durante o período entre a colheita e o ponto de amadurecimento para ser comestível. Há predominância de sacarose sobre os açúcares redutores (glicose + frutose), sendo maior a concentração deste açúcar, nas últimas semanas de maturação.

A elevação no teor de açúcares se deve à maturação do fruto, que também ocasiona decréscimo na acidez e na adstringência, pela redução do teor de

ácidos e fenólicos e pelo aumento nas características do aroma, devido à emissão de compostos voláteis. Contudo, teores mais elevados de açúcares permanecem por curtos períodos, decrescendo após armazenamento prolongado (Chitarra & Chitarra, 1990).

É importante mencionar que açúcares como a glicose, frutose e sacarose apresentam papel essencial no metabolismo das plantas, pois além de servirem como substrato para a respiração, são fontes de carbono para a produção de uma grande variedade de metabólitos incluindo aminoácidos, lipídios, proteínas e carboidratos mais complexos, como o amido e a celulose. Estes açúcares também têm desempenhado o papel de sinalizadores moleculares, os quais podem interagir com diferentes hormônios vegetais e causar alterações na expressão gênica (Rolland et al., 2006).

A frutose é um açúcar vastamente utilizado, sendo um açúcar de grande interesse industrial e que pode ser aplicado em diversos processos e produtos, principalmente nas indústrias de alimentos e de bebidas. Por ser saudável, existe uma diversidade de alimentos que fazem uso das características desse açúcar, tornando estes produtos com teores calóricos menores, com o mesmo poder dulcificante. No entanto, a ingestão de frutose deve ser feita com parcimônia, principalmente em se tratando de produtos industrializados, visto que este açúcar é precursor de lipídeos (Farber, 2011).

Sendo utilizado especialmente em produtos dietéticos, apresenta-se cerca de 1,3 a 1,8 vezes mais doce que os outros açúcares, dependendo de sua forma tautomérica em solução. Além disso, não requer o uso de insulina em seu processo metabólico, como a glicose, possibilitando seu uso em produtos destinados aos diabéticos (Silva, 2010).

A frutose tem sido incorporada com sucesso a formulações no preparo de frutas enlatadas, geleias, doces em pasta, bolos, pudins, tabletes, pó para bebidas, refrigerantes, bebidas espumantes, vinhos, alimentos assados, condimentos, *ketchup*, salsichas, produtos de laticínios (sorvetes, chocolate ao leite, iogurte), conservas, picles, tabacos, etc (Silva, 2010).

De acordo com Farber (2011), suas principais aplicações fora do contexto alimentar correspondem à produção de 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) e ácido levulínico. Os derivados do HMF são intermediários de elevado potencial, os quais possuem síntese adaptável para larga escala. O HMF também possui

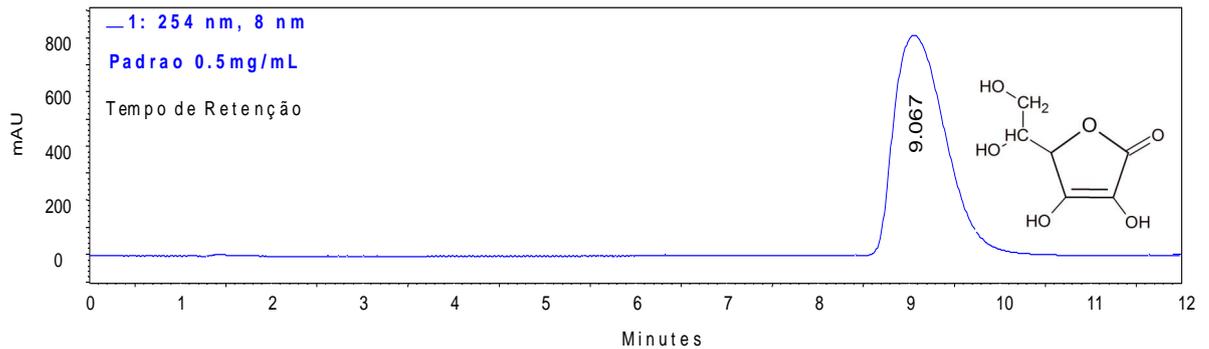
grande potencial como intermediário a um monômero para polímero verde, o ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA). A produção de FDCA a partir da frutose é uma alternativa interessante, pois este ácido representa um potencial substituto do ácido tereftálico, obtido por processo petroquímico, na síntese do polietileno tereftalato (PET).

Já a glicose é vastamente encontrada na natureza, pois é o principal constituinte da celulose, da sacarose e do amido (Pereira Jr. et al., 2008) e oferece a possibilidade de transformação em substâncias acíclicas, furanosídicas ou piranosídicas. Esta característica é o que torna a glicose tão atrativa industrialmente. A partir destes produtos, uma gama de outros produtos pode ser obtida, através de reações simples como oxidação, redução, glicosilação e isomerização. Por exemplo, a partir da reação de isomerização, frutose pode ser obtida, e a partir de frutose pode-se produzir HMF (Farber, 2011).

### **5.1.2 Ácido Ascórbico (Vitamina C)**

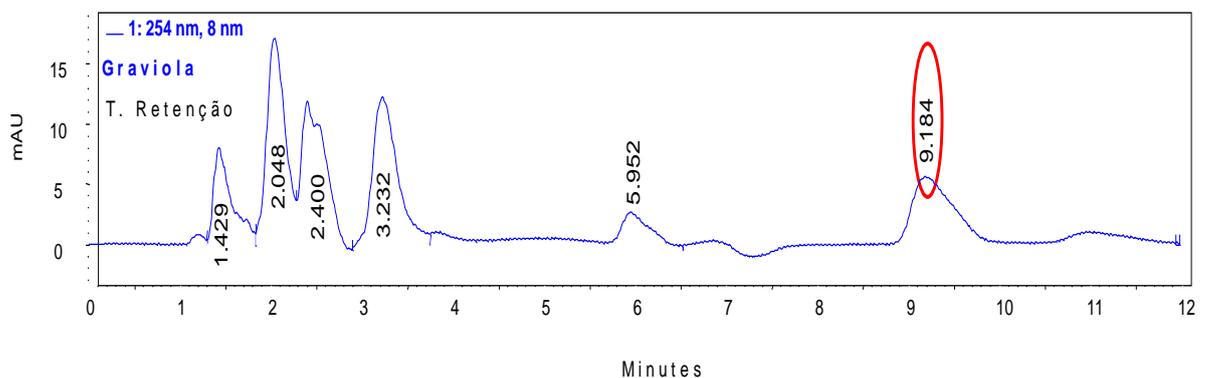
O ácido ascórbico possui grande importância fisiológica, pois atua como antioxidante, na reciclagem de tocoferóis e na produção e manutenção de colágeno e na redução do ferro-férrico no trato intestinal. Essas características fazem com que a vitamina C seja recomendada como suplementação alimentar. Além disso, é bastante utilizada na estabilização da cor e do sabor de uma ampla variedade de frutas processadas na forma de sucos, polpas e outras bebidas (Elhadi et al. 2011).

Além disso, o efeito protetor de frutas e vegetais é geralmente atribuído a seus constituintes antioxidantes, incluindo vitamina C, vitamina E, carotenoides, glutathione, fenólicos e outros compostos (Yahia, 2010). Para identificação do ácido ascórbico presente na polpa de *Annona muricata L.* foi aplicado o padrão no CLAE (Figura 21).



**Figura 21:** Cromatograma do padrão ácido ascórbico em CLAE.

Como se pode observar na Figura 22, foi possível identificar a presença da vitamina C na polpa da graviola, bem como estimar o seu teor com base na curva padrão, sendo este de 2,17mg/100g de amostra.



**Figura 22:** Cromatograma de identificação da vitamina C presente na polpa da graviola por CLAE.

A ingestão diária recomendada de vitamina C para adultos é de 60 mg / dia (Caldas et al., 2010; Padh, 1994). Além disso, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2000), no Regulamento Técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de graviola, a polpa ou purê de graviola deverá ter um mínimo de 10 mg/100g para valores de ácido ascórbico.

Duke & duCellier (1993) quantificaram um teor de 4 mg/100g de vitamina C em frutos de *Annona muricata*. Rios (2013) detectou o teor de 10,5 a 57 mg/100g de vitamina C em frutos de *Annona muricata* L., sendo este valor superior ao resultado encontrado neste trabalho. Leung & Flores (1961) apud Falcão et al.

(1982), determinaram o teor de 26,0 mg de vitamina C, estando este valor também acima do encontrado neste trabalho. Em concordância, Sacramento et al. (2003) avaliaram os valores de ácido ascórbico para as variedades Morada, Lisa e Comum de *Annona muricata* e encontraram 35,60 mg/100g, 37,67 mg/100g e 38,51 mg/100g, respectivamente, não havendo diferença significativa entre os frutos quanto a essas características químicas.

Silva et al. (2009) avaliaram a qualidade físico-química de polpas de frutas congeladas produzidas no interior do Ceará. A polpa de graviola apresentou valores de ácido ascórbico de 52,48mg/100g, sendo que este valor não atende aos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ`s) de polpas de frutas congeladas, pois os valores obtidos situaram-se em nível inferior ao mínimo recomendado pela legislação vigente (Brasil, 1993).

Caldas et al. (2010) também avaliaram a qualidade de polpas de frutas congeladas, produzidas e comercializadas nos estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte e no que diz respeito à adequação aos PIQ`s vigentes e estipulados pela legislação brasileira, se defrontaram com valores médios de ácido ascórbico de 3,50mg/100g em polpa da graviola, sendo este teor de ácido ascórbico bastante inferior ao mínimo estabelecido pela legislação de PIQ de polpa.

Canuto et al. (2010), em estudo da caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia, detectaram 0,1mg de ácido ascórbico/100g. Portanto, observa-se que o valor encontrado na presente análise é superior ao encontrado por Canuto e seus colaboradores.

A Tabela TACO (2011) atribui 19,1 mg/100g de vitamina C à polpa de graviola e a Tabela de Composição de Alimento do Endef/IBGE (1999) atribui o teor de 26mg/100g, ambos os valores são superiores ao teor quantificado neste trabalho.

### **5.1.3 Sólidos Solúveis, Umidade, Fibras, Proteínas e Minerais**

O conhecimento quanto ao teor dos compostos orgânicos de qualquer alimento é de suma importância para a população (Manhães, 2007). Sendo assim, também foram avaliados nesse trabalho o teor de sólidos solúveis, de umidade, de fibras e proteínas presentes na polpa de *Annona muricata* L. De

acordo com Canciam (2014), o teor de sólidos totais (medidos em °Brix) indica a concentração de substâncias dissolvidas na amostra, sendo constituídas, em sua maioria, por carboidratos (glicose, frutose e sacarose)

Os resultados encontrados nessas análises, bem como aqueles relatados na literatura encontram-se na Tabela 10.

**Tabela 10:** Quantificação dos parâmetros físico-químicos (g/100g de amostra) e sólidos solúveis (°Brix).

<b>Análise</b>	<b>Média ± Desvio Padrão</b>	<b>Literatura</b>
		82,2*
Umidade	85,1 ± 0,5	83,1** 87,1***
Proteínas bruta "in natura"	0,91 ± 0,01	0,8* 1,0** 1,2***
Proteínas bruta Amostra seca	6,5 ± 0,5	-
Fibras "in natura"	1,7 ± 1,0	1,9* 1,1** 2,5***
Fibras Amostra seca	11,5 ± 0,5	-
Sólidos Solúveis	13,2 ± 0,5	-

\* Taco, 2011.

\*\* Tabela de Composição de Alimento do Endef/IBGE, 1999.

\*\*\* Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo- TBCA, 2008.

Como já era esperado, verificou-se que há uma diferença no teor encontrado para proteínas e fibras de acordo com o estado da amostra, ou seja,

observou-se na amostra "*in natura*" uma concentração menor de proteínas e fibras do que para a amostra seca.

Comparando-se os resultados obtidos com as tabelas oficiais de composição e alimentos, a saber: as tabelas TACO, TBCA e Endef, observou-se que os resultados são compatíveis, exceto para TBCA, a qual apresenta valores superiores aos encontrados nesta pesquisa, bem como às próprias tabela TACO e Endef.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2000), no Regulamento Técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) para polpa de graviola, esta deverá obedecer às seguintes características e composição: mínimo de 9,00 para valores de sólidos solúveis em °Brix a 20°C, o que está em conformidade com os resultados encontrados neste trabalho.

Leung & Flores (1961) apud Falcão et al. (1982), determinaram a composição química da polpa da graviola na região de Manaus, encontrando os seguintes resultados para 100g de polpa: 83,1% de água, 1,0g de proteínas e 1,1g de fibras na amostra *in natura*, o que corrobora com os dados encontrados nesta pesquisa.

Canuto et al. (2010) encontraram para 100g de polpa da graviola, os seguintes resultados: 12,0 °Brix para sólidos solúveis e umidade=88,1, os quais também corroboram com os encontrados neste trabalho.

Estes resultados também corroboram com os estudos realizados por Cardozo et al. (2012), os quais com o objetivo de avaliar as características fisiológicas e físico-químicas que expressam as mudanças metabólicas mais significativas que ocorrem na graviola (*A. muricata* L.) durante pós-colheita, por meio de um estudo realizado em frutos do vale do Cauca, na Colômbia, encontraram valores de 12,8 ° para Brix.

De acordo com Chitarra & Chitarra (1990) o teor de umidade dos frutos geralmente está acima de 90%. A transpiração é um processo fisiológico que continua acontecendo na fase pós-colheita, em maior ou menor intensidade, dependendo das condições ambientais. A perda de massa fresca é maior durante as primeiras horas ou primeiros dias de armazenamento, quando o produto ainda está sendo refrigerado. Quanto mais longo for o período de resfriamento do produto, maior será sua perda de água. Esse fato poderia justificar o teor abaixo

de 90% encontrado nos resultados (85%). É importante mencionar que as perdas entre 3% e 6% são suficientes para causar redução na qualidade de muitos produtos, enquanto que outros, mesmo perdendo 10% ou mais ainda podem ser comercializados.

Abbo et al. (2006) relatam que a polpa de graviola é composta de água (87,5%), proteínas (0,64%), minerais (0,51%) e lipídios (0,05%). Rios (2013) verificou a seguinte composição de cada 100g de polpa de graviola: 78 a 85% de água; 0,62 a 1,7 g/100g de proteínas; de 1,10 a 4,21g/100g de fibras, o que corrobora com os dados encontrados neste trabalho.

Em trabalho de Salgado et al. (1999), que também avaliaram as características físico-químicas da polpa de graviola congeladas, foi verificado valores de 12,66 °Brix e umidade de 87,12g%. Apesar de ter se tratado de uma amostra congelada, ao contrário do procedimento empregado no presente trabalho que utilizou a amostra fresca, nota-se que os resultados são semelhantes, não havendo diferenças significativas.

Além disso, Lima et al. (2002), com o objetivo de avaliar a qualidade e a suscetibilidade ao escurecimento oxidativo após a colheita de graviolas do tipo “Crioula”, colhidas na maturidade fisiológica e mantidas sob temperatura ambiente (26,3±0,6°C e 87,6±12,2% UR) durante 1, 2, 3, 4 e 5 dias, encontraram nos frutos maduros valores de sólidos solúveis de 17,6° Brix.

Sacramento et al. (2003) avaliaram a qualidade de graviolas produzidas na região Sul da Bahia e suas características físicas e químicas, verificando valores de sólidos solúveis (°Brix) de 13,85 para a variedade Lisa, a qual é também a variedade analisada neste trabalho, estando os resultados de ambas as pesquisas em concordância. Estes valores são superiores aos valores mínimos estabelecidos no Padrão de Identidade e Qualidade do Ministério da Agricultura, para polpa de graviola.

Resultado inferior ao verificado neste trabalho em relação ao teor de sólidos solúveis foi encontrado por Mata et al. (2005), que encontraram valores de sólidos solúveis da polpa da graviola *in natura* de 10,7°Brix.

Mosca (1997), trabalhando com identificação do ponto de colheita em graviola, coletou frutos em três estádios de maturação, “de vez”, maturo fisiologicamente e maduro e os manteve a 24,5 °C e 70% UR, então, observou acréscimo de 7 °Brix a 9 °Brix, até 16 °Brix a 18 °Brix, durante o amadurecimento.

O amadurecimento nas anonáceas, como a graviola, vem acompanhado de aumento nos teores de sólidos solúveis e acidez, perda de água, redução da firmeza, a cor da polpa perde o brilho e fica mais clara. Estes fenômenos estão associados ao aumento do pico respiratório e de etileno, hidrólise do amido e modificações da parede celular (Farias et al., 2011).

Em estudo realizado por Morton (1987), quantificou-se 1g/100g de proteína e 0,8 g/100 de fibra em amostras "*in natura*", dados estes que corroboram aos encontrados neste trabalho.

De forma semelhante, Santos (1982) encontrou o valor proteico de 1,4g/100g para a graviola, sendo este valor pouco superior ao encontrado neste trabalho, e Matos (2007) estimou o valor de 1,1g/100g, o qual é ligeiramente superior aos resultados encontrados neste trabalho.

Mesquita et al. (2014) analisando a composição centesimal de frutos típicos da região do vale do Juruá-Amazônia ocidental identificaram na polpa de graviola 6,6% de proteína bruta a partir da amostra seca, corroborando com o resultado encontrado neste trabalho.

Kelmer (2012) averiguou o teor de proteínas na polpa de graviola *in natura* e seca e estimou o valor de 8,4% e 6,0%, respectivamente, de forma que o valor para amostra seca é ligeiramente inferior e o da amostra *in natura* é superior aos resultados encontrados neste trabalho.

De acordo com Cruz (2011), geralmente, as frutas são pobres em proteínas, em média, 1%, sendo a casca a parte mais rica que as partes comestíveis. Contudo, a importância delas para a sobrevivência do organismo é extremamente significativa, visto que sua deficiência pode promover as síndromes de Kwashiorkor e Marasmo.

Já as fibras alimentares têm como definição clássica ser uma classe de compostos vegetais constituída, principalmente, de polissacarídeos e substâncias associadas que, quando ingeridos, não sofrem hidrólise, digestão e absorção no intestino delgado de humanos. As fibras alimentares consistem dos remanescentes de células vegetais, polissacarídeos, lignina e substâncias associadas resistentes à hidrólise (digestão) pelas enzimas endógenas do tubo digestivo dos humanos (Prosky, 2001).

As fibras alimentares são divididas em fração insolúvel (celulose, hemicelulose, lignina e amido resistente) e solúvel (hemiceluloses solúveis,

pectinas, gomas e mucilagens), as quais exercem diferentes funções no organismo humano. Fibras insolúveis, como a celulose, encontrada nas paredes celulares de plantas, ajudam a dissipar e remover toxinas, por meio de vários mecanismos (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION - ADA, 2008). A fibra insolúvel, por ter capacidade de reter água, causa aumento no volume fecal e na pressão osmótica, diminuindo o tempo de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal. As fibras solúveis têm alta capacidade de fixar substâncias orgânicas e inorgânicas, sequestrando os sais biliares, o que acarreta aumento de sua excreção e, conseqüentemente, redução na sua circulação entero-hepática. Com isso, o organismo tenta suprir o déficit de sais biliares, sintetizando-os a partir de suas reservas de colesterol (Márques, 2001).

A ingestão de frutas e vegetais ricos em fibras é benefício à saúde humana. O Food and Drug Administration (FDA) determinou um valor diário de 25 g de fibras para uma dieta de 2.000 kcal, sendo considerado satisfatório o consumo de 5 g de fibras em cada refeição (ADA, 2008).

Segundo Maihara et al. (2006), as fibras alimentares são de grande interesse, uma vez que dietas ricas em fibras estão associadas a melhor saúde do cólon, incidência reduzida de diabetes em adultos e pressão arterial e nível de colesterol menor. Dietas ricas em frutas e vegetais fornecem fibras necessárias para o bom funcionamento do intestino. Assim, uma dieta rica em fibras está relacionada à prevenção de muitas doenças, entre elas o câncer (Mc Dougal et al., 1996), bem como as fibras de frutas, legumes e vegetais têm sido associadas à redução do nível do colesterol sérico (Garcia Diez et al., 1996).

Em relação à análise à quantificação de minerais, obteve-se os resultados mostrados na Tabela 11.

Em relação aos minerais, Azevedo (2004) salienta que a importância das anonáceas se deve principalmente à sua riqueza em sais minerais, como cálcio, potássio e magnésio, especialmente em relação à *Annona muricata* L., tradicionalmente usada para tratar várias doenças, incluindo o câncer. A fruta *in natura* é consumida para combate aos vermes e parasitas, febre, aumentar o leite materno após o parto e como um adstringente para diarreia e disenteria. Relata-se também, a presença de propriedades antioxidantes (George et al., 2012).

**Tabela 11:** Minerais quantificados em *Annona muricata* L.

Minerais	Teor	Unidade
B	7,8	(mg/Kg)
Ca	1,2	(g/Kg)
Cu	4,9	(mg/Kg)
Fe	19,9	(mg/Kg)
K	1,2	(mg/Kg)
Mg	1,2	(g/Kg)
Mn	5,2	(mg/Kg)
P	1,2	(g/Kg)
Zn	4,5	(mg/Kg)
Ca	1,2	(g/Kg)

O cálcio também desempenha um importante papel antineoplásico. No tubo digestivo, este mineral inibe a proliferação e aumenta a diferenciação de células intestinais, inibe a ativação da enzima ornitina descarboxilase (ODC) e promove a ativação da apoptose de células tumorais, através tanto da ativação das enzimas caspases, que promovem a desestruturação nuclear e das organelas, quanto da ativação das transglutaminase (Ferrari & Torres, 2002).

Leterme et al. (2006) estudaram um total de 68 espécies de alimentos ricos em amido, frutas tropicais, folhas e tubérculos coletadas nos Andes colombianos e nas florestas tropicais da costa do Pacífico colombiano, dentre eles a *Annona muricata* L. Foram analisados os macrominerais na polpa da graviola (mg/100g): Ca=38, P=30, K= 523, M=25 Na=20 Cl=20 S=16 e microminerais: Mn=0,07; Zn=0.11; Fe=0.38; Cu=0.10 (em mg/100g); Se=nd; Co=nd; Ni=0,03; Cr=nd (em µg/100g). O estudo concluiu que as frutas tropicais fornecem boas fontes de macro e microminerais.

Leung & Flores (1961) apud Falcão et al. (1982), determinaram a composição química da polpa da graviola na região de Manaus, encontrando os seguintes resultados para 100g de polpa: 28,0 mg de fósforo, 24,0 mg de cálcio, 0,5 mg de ferro.

Almeida et al. (2009) determinaram os teores de macrominerais (Na, K, Mg, Ca, P) e microminerais (Fe, Mn, Cu, Zn, Ni, Co e Se) em 11 espécies de frutas

cultivadas no nordeste brasileiro: abacaxi, ata, graviola, jaca, mamão, mangaba, murici, sapoti, seriguela, tamarindo e umbu. A graviola apresentou a seguinte composição de macrominerais (mg/100g): Na=6,73, K=227,67, Ca=14,19, Mg=23,14, P=32,43. Para microminerais (em mg/100g) apresentou: Fe=0,83, Mn=0,07, Cu=0,15, Zn=0,46; e (em  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ): Se=0,79, Co=17,00 e Ni=19,54. Assim, o consumo diário de frutas como ata, graviola, sapoti e murici podem ser classificadas como boas fontes de pelo menos dois minerais, tais como K, Mg, Cu e Ca, pois proporciona 10 a 19% da ingestão diária recomendada (IDR).

Spada et al. (2010) elaboraram o primeiro banco de dados para quantificar os níveis de minerais em 23 amostras de frutas congeladas, mais consumidas em todo o mundo e de algumas frutas nativas da Floresta Amazônica, Brasil. Considerando-se as Referências de Ingestão Diárias, 100g de frutas congeladas podem fornecer 0,2-2,8% de macro e de 2,5 a 100% dos microminerais para adultos (31-50 anos). Para os valores de macronutrientes a graviola apresentou em mg% (p / p): Mg = 8,48; Cl = 2,36; P = 3,21; Ca = 5,72; K = 1,09; S = 2,19; Na = nd (não determinada). Para os micronutrientes, apresentou em mg% (p / p): Fe = 0,18; Mn = nd; Cu = nd; Zn = nd; Cr = nd; Si = 1,29 e Al=4,83.

Levando-se em consideração todos os resultados referentes à análise de minerais, obteve notável apreciação o teor de boro encontrado na polpa do fruto analisado neste trabalho, o qual foi muito superior ao encontrado na literatura. Moraes (2013), por exemplo, avaliou os teores de microminerais em polpa de graviola fresca após 30, 60 e 90 dias de congelamento e verificou 0,34 mg/100g de boro na fruta fresca e após 30 dias de congelamento não foi detectado este mineral.

De acordo com Melo et al. (2008), estes valores discrepantes podem ser decorrentes das características ambientais de cultivo, variedade da cultivar e maturidade dos frutos, além da metodologia específica utilizada.

O boro (B) está envolvido na síntese da parede celular, na integridade da membrana plasmática e nas atividades metabólicas da planta (Taiz e Zeiger, 2013). Logo, está relacionado a muitos processos fisiológicos vegetais que são afetados pela sua deficiência, como transporte de açúcares, síntese da parede celular, lignificação, estrutura da parede celular, metabolismo de carboidratos, metabolismo de RNA, respiração, metabolismo fenólico, metabolismo de ascorbato e integridade da membrana plasmática. Entre as diversas funções,

duas estão muito bem definidas: síntese da parede celular e integridade da membrana plasmática (Cakmak & Römheld, 1997).

É absorvido como ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) e, provavelmente, como ânion borato ( $B(OH)^4-$ ) em pH elevado, tanto por via radicular, como foliar (Silva, 2014). Dentre os micronutrientes, Marschner (2012) afirma que o B pode estar atuando em possíveis pontos das rotas metabólicas, sendo que, um desses pontos é regulando o metabolismo dos compostos fenólicos.

O boro começou a atrair a atenção nos últimos anos devido a estudos recentes que apontam seus possíveis benefícios para saúde na prevenção da osteoporose, além de promover melhoras no tratamento da artrite. A dose diária recomendada é de 1 a 3 mg (Fiorini, 2008). Logo, exerce um papel importante na fixação do cálcio nos ossos (Hirschbruch, 1999) e reduz a excreção renal tanto de cálcio como de magnésio, lembrando que o cálcio possui funções diretamente relacionadas à formação dos ossos e dentes, além de participar do crescimento e ser um cofator/regulador em várias reações bioquímicas. A coagulação sanguínea também é dependente da presença de cálcio (Dutra de Oliveira, 1998). Além disso, a suplementação alimentar com este mineral tem sido recomendada também nos casos de artrite reumatoide, doenças cardíacas e menopausa (Falcato, 2014).

Outro ponto importante é que o boro tem sido apontado como um importante colaborador para tratamento do câncer. A Terapia por Captura de Nêutrons pelo Boro (Boron Neutron Capture Therapy – BNCT) é uma radioterapia experimental tida como uma possível ferramenta para o tratamento de diversos tipos de cânceres agressivos, incluindo o glioblastoma multiforme cerebral. O mecanismo de ação atua entregando-se seletivamente mais boro às células tumorais do que às sadias, e posteriormente induzindo o decaimento desse boro com nêutrons de baixa energia. Os produtos formados pela reação têm curto alcance e desta maneira, atingem somente as células que incorporam boro. Diversos compostos têm sido estudados, para aumentar a seletividade de captura pelas células tumorais. BNCT atua como uma terapia localizada e com mínimos efeitos colaterais para o tratamento do câncer. Esse efeito seletivo faz com que a BNCT seja uma opção válida para o tratamento de tumores que invadem um órgão por inteiro, como no caso de disseminações metastáticas (Flores & Maria, 2011).

Desta forma, fica evidente a importante contribuição do boro no tratamento de patologias e sendo a polpa da graviola rica nesse mineral, agregase valor a esta espécie vegetal, a qual possui atributos para ser utilizada como alimento funcional.

## 5.2 Atividade Antioxidante

A capacidade de sequestrar radicais livres em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) no extrato aquoso 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 convertem-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.

Os resultados podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante, micromols de equivalente do padrão utilizado, como EC<sub>50</sub>, o qual expressa a concentração de antioxidante ou amostra necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre do meio em 50% (Salvador, 2011).

Os padrões empregados foram os flavonoides quercetina, rutina e apigenina, e o padrão comercial de estrutura fenólica, BHT (Butil-hidroxi-tolueno). Os flavonoides 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).

Pelo método do DPPH, pode-se observar que as amostras apresentam atividade sequestradora de radicais livres nas três concentrações avaliadas (1000, 100 e 10 µg/mL) como mostra a Tabela 12.

Os percentuais de ação antioxidante mostraram-se bastante expressivos para as amostras na concentração de 1000µg/mL e, na concentração de 100µg/mL, tanto o extrato aquoso (71,7%; EC<sub>50</sub> 34,44 ± 6,6µg/mL) quanto o sobrenadante (59,3%; EC<sub>50</sub> 18,41 ± 4,3µg/mL) apresentaram atividade sequestrante de radicais livres superior ao padrão comercial BHT (52,1%; EC<sub>50</sub> 40,35 ± 1,51 g/mL), fato este que evidencia a ação antioxidante das amostras.

**Tabela 12:** Atividade antioxidante pelo método do DPPH em comparação com os padrões de referência quercetina, rutina, apigenina e BHT.

Amostras	Concentrações			EC <sub>50</sub>
	1000 µg/mL (%)	100 µg/mL (%)	10 µg/mL (%)	
GS	91,2 ± 1,7	71,7 ± 2,7	43,4 ± 3,2	34,4 ± 6,6
GSS	88,2 ± 2,2	59,3 ± 3,2	40,2 ± 1,9	18,4 ± 4,3
Quercetina	95,4 ± 0,9	93,4 ± 1,2	91,7 ± 0,7	0,7 ± 1,9
Rutina	88,5 ± 0,6	85,8 ± 0,7	0,8 ± 0,1	41,3 ± 1,4
Apigenina	60,5 ± 1,0	42,1 ± 1,1	9,6 ± 0,7	270,6 ± 1,4
BHT	100 ± 0,9	52,1 ± 2,2	43,6 ± 1,5	40,3 ± 1,5

\*Média ± Desvio Padrão (n=3).

O sobrenadante (GSS) foi a amostra que se apresentou como o melhor antioxidante frente ao DPPH (EC<sub>50</sub> 18,41 ± 4,3µg/mL), seguido do extrato aquoso (EC<sub>50</sub> 34,44 ± 6,6 µg/mL). Com isso, infere-se que as substâncias com capacidade antioxidante presentes no sobrenadante possam estar atuando em sinergismo intensificando a capacidade de sequestro de radicais livres.

Quando se compara o extrato aquoso e o sobrenadante com o padrão quercetina (EC<sub>50</sub> 0,7 ± 1,9 µg/mL) observa-se que o percentual de seqüestro é inferior aos valores encontrados para a quercetina.

Em comparação ao flavonoide rutina, o extrato aquoso (1000µg/mL) apresentou atividade antioxidante superior. Já na concentração de 10µg/mL, tanto o extrato aquoso quanto o sobrenadante exibiram um potencial de seqüestro de radicais livres superior a rutina (EC<sub>50</sub> 41,3 ± 1,4µg/mL) e na concentração de 100µg/ este percentual é inferior a este flavonoide.

Quando se observa o potencial antioxidante das amostras em comparação a apigenina (EC<sub>50</sub> 270,6 ± 1,4 µg/mL), um outro flavonoide empregado como padrão, nota-se que em todas as concentrações analisadas, o extrato aquoso e o sobrenadante também exibiram um percentual de sequestro superior a este padrão.

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).

O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes. O método de sequestro do radical livre DPPH pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em curto período de tempo (Sucupira et al. 2012).

O método DPPH tem sido muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de frutas. O método apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos, e por ser um radical livre estável está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas (como ocorre com o método ABTS), além de facilitar seu uso (Lima, 2008). Contudo, apresenta como desvantagem o fato de sofrer influência pelo solvente, de não especificar a espécie sequestradora de radicais livres e de impossibilidade de avaliação da atividade de antioxidante em hidrofílicos (de Oliveira et al., 2009).

Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor (Salvador, 2011).

Já o método do FRAP pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas. É simples, rápido e não requer equipamentos sofisticados. Porém, apresenta como desvantagem ser uma metodologia mais limitante que o DPPH, por exemplo, e requer um sistema aquoso, não podendo detectar compostos que agem por meio da doação de átomos de hidrogênio, particularmente, tióis, como a glutathione, e proteínas, o que pode levar a subestimação da capacidade antioxidante. Todavia, essa característica pode ser vantajosa, uma vez que a glutathione é encontrada em altas concentrações em alimentos, porém é degradada no intestino, sendo pouco

absorvida pelos humanos (Salvador, 2011). Pelo método de redução do ferro (FRAP) também se evidenciou a atividade antioxidante (Tabela 13).

Como pode ser observado pela Tabela 10, o sobrenadante foi a amostra que conseguiu reduzir a maior quantidade de redução do  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  ( $256,227 \pm 10,9 \mu\text{M}$  de Trolox/mg) seguida do extrato aquoso ( $613,348 \pm 13,5\mu\text{M}$  de Trolox/mg), em concordância com os resultados obtidos pelo método do DPPH.

**Tabela 13:** Atividade antioxidante pelo método do FRAP em comparação com os padrões fenólicos quercetina, rutina, apigenina.

Amostras	[ ] $\mu\text{M}$ Trolox/mg de amostra
GS	$613,3 \pm 13,5$
GSS	$256,2 \pm 10,9$
Quercetina	$407,5 \pm 0,3$
Rutina	$395,1 \pm 0,2$
Apigenina	$236,4 \pm 0,6$

\*Média  $\pm$  Desvio Padrão (n=3).

Quando comparados essa metodologia de redução do ferro com o DPPH que se baseia no sequestro, pode-se observar que as amostras apresentam alta capacidade antioxidante. O sobrenadante nas duas metodologias foi o que apresentou melhor potencial antioxidante ( $\text{EC}_{50}$   $18,41 \pm 4,3\mu\text{g/mL}$  – DPPH e  $256,2 \pm 10,9 \mu\text{M}$  de Trolox/mg – FRAP).

Quando se compara o extrato aquoso com os padrões fenólicos observa-se que o percentual de seqüestro de radicais livres é inferior aos valores encontrados para a quercetina ( $407,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$  de Trolox/mg) e rutina ( $395 \pm 0,2 \mu\text{M}$  de Trolox/mg). Já em relação à apigenina ( $236,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$  de Trolox/mg), o extrato aquoso ( $613,3 \pm 13,5 \mu\text{M}$  de Trolox/mg) apresentou um potencial antioxidante inferior, enquanto o sobrenadante ( $256,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$  de Trolox/mg) possui uma atividade antioxidante superior a este padrão. Contudo, é o sobrenadante que se destaca pela análise nessa metodologia, em concordância com o método do DPPH.

Mediante estes resultados é possível constatar o potencial antioxidante exibido pelas amostras e também sua comparação com a atividade sequestrante

de radicais livres para com o padrão BHT, bem como para os padrões fenólicos (rutina, quercetina e apigenina) em ambas as metodologias aplicadas.

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 à sua pouca polaridade. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes (Ramalho & Jorge, 2006).

Kuskoski et al. (2006) avaliaram a atividade antioxidante de polifenóis e antocianinas de frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas, incluindo a graviola, com o objetivo de determinar a sua atividade antioxidante *in vitro* pelo método do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e compará-la com o conteúdo de polifenóis totais e antocianinas das polpas congeladas e comercializadas no sul do Brasil. Para a graviola encontraram alto índice de polifenóis totais (84,3 mg100g<sup>-1</sup>); a fruta também demonstrou alta capacidade antioxidante, apresentando 2,88 µmolg<sup>-1</sup> de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (antioxidante sintético e hidrossolúvel similar à vitamina E). Em geral, os frutos analisados nesse experimento demonstraram correlação direta entre o conteúdo total de compostos fenólicos e a atividade antioxidante; concluindo-se que mesmo congelados os frutos e as polpas mantiveram suas propriedades, podendo ser excelentes fontes de compostos fenólicos com capacidades antioxidantes.

Canuto et al. (2010) determinaram níveis de fenólicos totais e sua correlação com a atividade anti-radical livre em quinze amostras de polpas de frutos procedentes da região Amazônica (abiu, acerola, açaí, araçá-boi, bacaba, bacuri, buriti, cajá, cajarana, caju, cupuaçu, graviola, murici, noni e tamarindo). A atividade de radicais livres foi avaliada pelo método de ABTS. Os resultados para a graviola foram: fenóis totais=0,6 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido gálico e atividade anti-radical livre equivalente ao Trolox=2,2 µmol.L<sup>-1</sup> de Trolox. Observou-se correlação entre atividade antioxidante e teores de ácido ascórbico e, principalmente, compostos fenólicos totais.

Kuskoski et al. (2005), determinaram o conteúdo de compostos fenólicos totais (FT), estimaram as antocianinas totais (AT) e a capacidade antioxidante de polpa de frutas comercializadas congeladas, aplicando os métodos espectrofotométricos mais citados na literatura para determinar a atividade

antioxidante (ABTS e DPPH). Neste estudo, buscou-se determinar a atividade antioxidante das polpas de frutas de maior consumo no mercado sul brasileiro (amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá), aplicando o método ABTS com medidas em dois tempos (1 e 7 minutos), DPPH (30 e 60 minutos) e DMPD (10 minutos). Para a graviola foram obtidos valores elevados de fenóis totais: 84,3mg/100g e moderada atividade antioxidante, com sequestro de DPPH (30 min) em equivalentes de vitamina C = 57,15.

Melo et al. (2008), em um estudo quanto à avaliação do teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas comercializadas na cidade do Recife-Pernambuco, obtiveram para a polpa da graviola os seguintes valores de fenólicos totais (mg em equivalente catequina.100g<sup>-1</sup>): 183,29 no extrato aquoso, 20,65 no extrato metanólico e 203,94 no total. Em relação à capacidade de sequestrar o radical DPPH, o extrato metanólico da graviola nos primeiros 15 min apresentou ação moderada, passando a exibir forte capacidade a partir de 30 minutos da reação. Extratos metanólicos de polpas congeladas de frutas, contendo 12,68 a 206,40 µg de fenólicos totais.mL<sup>-1</sup>, foram considerados com fraca a moderada capacidade de sequestrar o radical DPPH, tendo a graviola apresentado 206,40 µg de fenólicos totais.mL<sup>-1</sup>. Para efeito de classificação, as polpas de frutas que exibiram capacidade de sequestro acima de 70%, entre 50 e 70% e abaixo de 50% foram consideradas como forte, moderada e fraca capacidade de sequestro, respectivamente.

Luna et al. (2009) avaliaram o potencial antioxidante da polpa industrializada e *in natura* da *Annona muricata* L. com o objetivo de fazer uma analogia entre a polpa industrializada da graviola e a polpa *in natura* da mesma sendo utilizados dois extratos (aquoso e etanólico) utilizando o método DPPH. Os autores concluíram que a polpa industrializada quando comparada com os extratos, aquoso e etanólico da polpa *in natura* da graviola, apresenta um potencial antioxidante maior que os demais, por apresentar um EC<sub>50</sub> (concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical) menor em relação aos outros; porém, observaram que os dois tipos de polpa só começaram a ser antioxidante a partir de 200mg/mL.

Souza et al. (2011) determinaram a concentração dos compostos fenólicos dos resíduos de polpas de frutas tropicais acerola (*Malpighia glabra* L.), goiaba

(*Psidium guayaba* L.), abacaxi (*Ananas comosus* L.), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), bacuri (*Platonia insignis*) e graviola (*Annona muricata* L.), bem como avaliaram a sua capacidade antioxidante *in vitro*, pelos métodos de captura de radicais DPPH• e ABTS+. Foram identificados para a *Annona muricata* L. teores de compostos fenólicos de 18,60 mg GAE 100g<sup>-1</sup> para extratos aquosos e 24,11 mg GAE 100g<sup>-1</sup> para hidroalcóolicos. Os extratos de graviola também apresentaram moderada capacidade de sequestro do radical DPPH•, ao longo do tempo da reação.

Um extrato que apresenta alto potencial em sequestrar radicais livres possui baixo valor de EC<sub>50</sub>. Desta forma, uma pequena quantidade de extrato é capaz de decrescer a concentração inicial do radical DPPH em 50%. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o seu EC<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante (Roesler *et al.*, 2007).

Vale ressaltar que o principal grupo de agentes inibidores da carcinogênese é representado por antioxidantes e, nesse sentido, é importante mencionar que a eficiência antioxidante de substâncias bioativas em alimentos de origem vegetal depende de sua estrutura e da sua concentração no alimento. Também se deve entender que a concentração destas substâncias nestes alimentos é fortemente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta. Sabe-se, ainda, que a capacidade antioxidante é influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica de extração utilizada, bem como pelo binômio tempo-temperatura (Naczki & Shahidi, 2004). Sendo assim, em grande parte dos trabalhos relatados, procura-se identificar o princípio ativo com atividade antioxidante ou apenas isolar as frações detentoras dessa atividade (Agati *et al.*, 2012).

De acordo com Souza *et al.* (2012), a comercialização de frutas representa uma oportunidade para agricultores locais de obter acesso aos mercados especializados, onde os consumidores demonstram preferência por características exóticas e pela presença de nutrientes capazes de prevenir doenças degenerativas. As escolhas para consumo do fruto não são mais puramente baseadas em gosto e preferência pessoal, mas também no interesse em melhorar a saúde, o que está motivando o aumento na exploração econômica

dos produtos e subprodutos de frutas específicas, atribuído a essa crescente preocupação dos consumidores sobre a relação entre dieta e saúde.

Desta forma, é de grande importância a determinação da presença significativa de compostos fenólicos totais e elevado potencial antioxidante na graviola, pois, de acordo com Canuto et al. (2010), a caracterização física e química dos frutos e a quantificação dos seus componentes bioativos são importantes para a compreensão do seu valor nutritivo e para aumentar a qualidade e o valor do produto final. Portanto, tais conhecimentos sobre a graviola podem incrementar o consumo pela população, aumentando sua comercialização e criando maior oportunidade de geração de renda para o produtor.

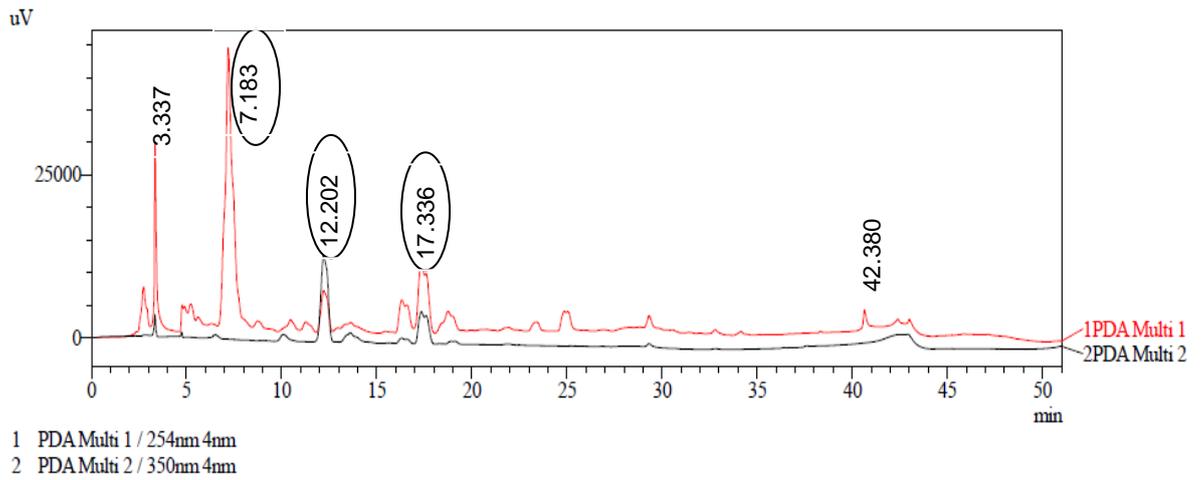
### **5.3 Fracionamento e Identificação**

Em princípio, o extrato aquoso foi submetido 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 (Reis, 2011).

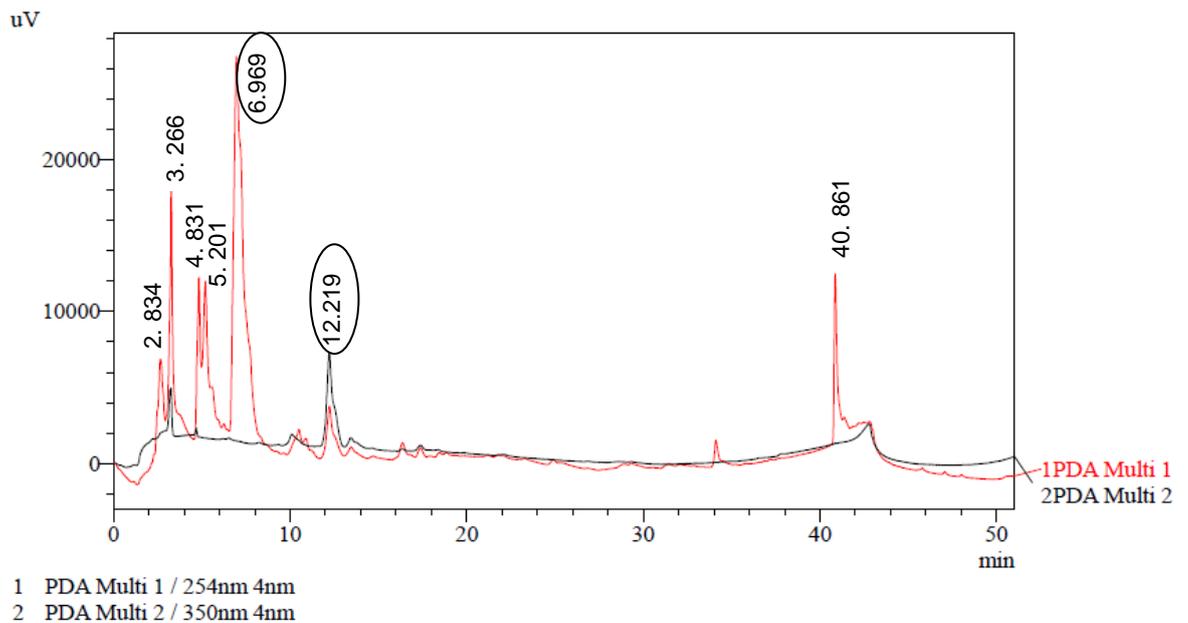
Pela CCD com a fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAcEt) e fração butanólica (FB) observaram-se manchas de interesse. Contudo, como não havia massa suficiente para proceder a purificação da FH optou-se pela purificação da FAcEt e FB (Figura 11 e 12).

Com o intuito de conhecer o perfil químico dessas frações de interesse, outra técnica cromatográfica, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi empregada para se conhecer as substâncias presentes (Figura 23 e 24). Esta é uma técnica extremamente útil e desempenha um papel valioso na separação de misturas complexas como, por exemplo, as substâncias aromáticas (Oliveira, 2005).

Vale ressaltar que este estudo foi bioguiado e, portanto, o fracionamento foi realizado de acordo com os resultados obtidos nos ensaios biológicos.



**Figura 23:** Cromatograma do perfil químico da fração acetato de etila (FACet) avaliado por CLAE. C= 10 mg/mL.



**Figura 24:** Cromatograma do perfil químico da fração butanólica (FB) avaliado por CLAE. C= 10 mg/mL.

Depois de realizada a CLAE nas frações de interesse, pôde-se observar picos que variam no tempo de retenção ( $T_r$ ) de 3 a 42 minutos, sendo que na FACet há um pico bem pronunciado no  $T_r$  de 7.183 ( $\lambda = 254$  nm), com área de 835.570 e outros dois picos também de média absorvância em ambos os

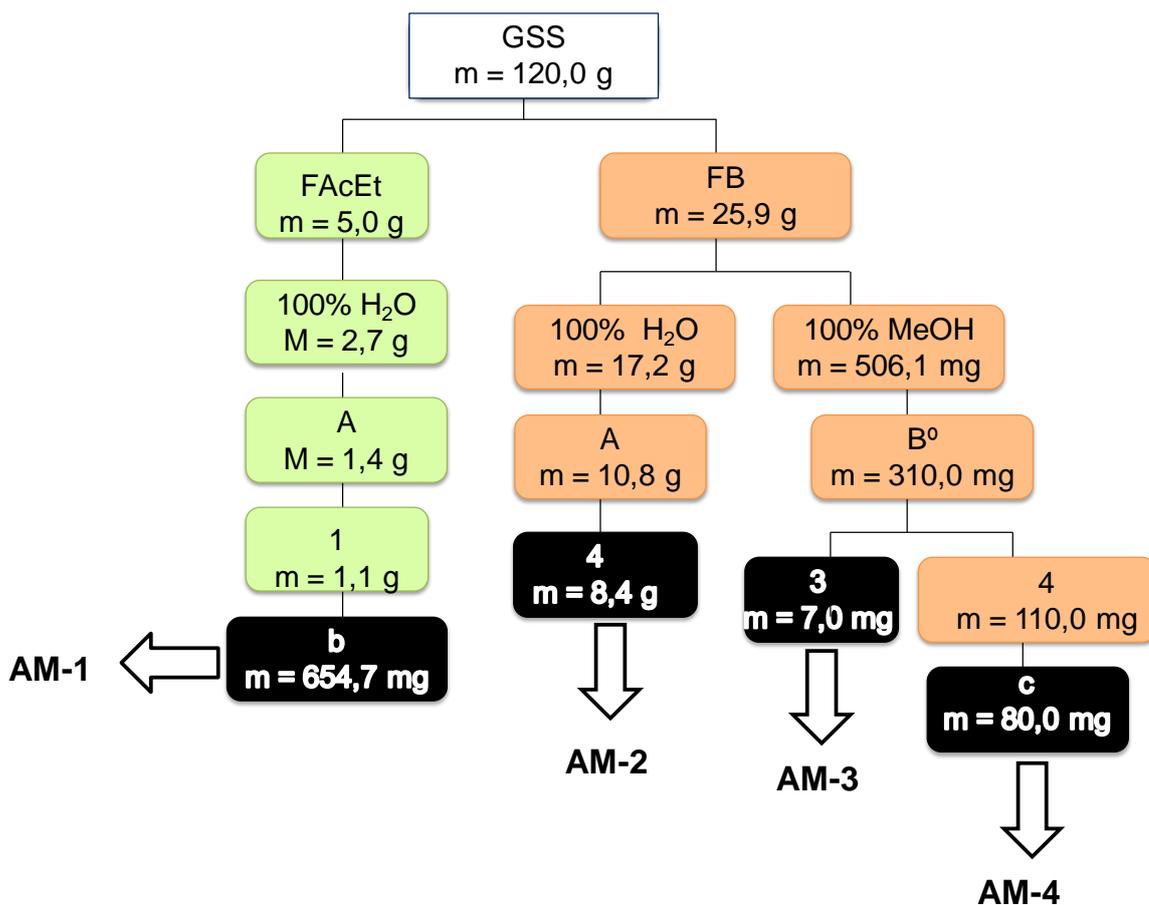
comprimentos de onda analisados no Tr de 12.202 e 17.336, com áreas de 283.132 e 129.224, respectivamente.

Na FB pôde-se observar picos que também variam no Tr de 2 a 42 minutos, havendo um pico majoritário no Tr de 6,969 ( $\lambda = 254$  nm), com área de 959.228 e outros picos também de média absorvância, alguns absorvendo nos dois comprimentos de onda averiguados e outros absorvendo apenas no  $\lambda = 254$  nm.

A absorção em apenas um comprimento de onda ( $\lambda = 254$  nm) indica a presença de ácidos fenólicos, enquanto que a presença de bandas de absorção em ambos os comprimentos de onda ( $\lambda = 254$  nm e 350 nm) é característica de compostos fenólicos (flavonoides) (Harborne, 1994b).

Com o objetivo de separar as substâncias de interesse, as frações (FACeT e FB) foram fracionadas conforme descrito no item 4.4.1. Para tanto, foram realizadas diversas cromatografias em coluna aberta (fase inversa RP-2, RP-18 e Sephadex-LH20), conforme exemplifica as Figuras 11 e 12.

Almejando verificar o isolamento e o perfil químico dessas substâncias foi realizada a CLAE e CG-MS, bem como a avaliação do espectro de UV das substâncias identificadas, visto que o significativo grau de pureza permitiu sua elucidação. As substâncias isoladas foram codificadas como AM-1, AM-2, AM-3 e AM-4. O esquema a seguir mostra de forma simplificada o processo de purificação da qual essas moléculas foram extraídas (Figura 25).



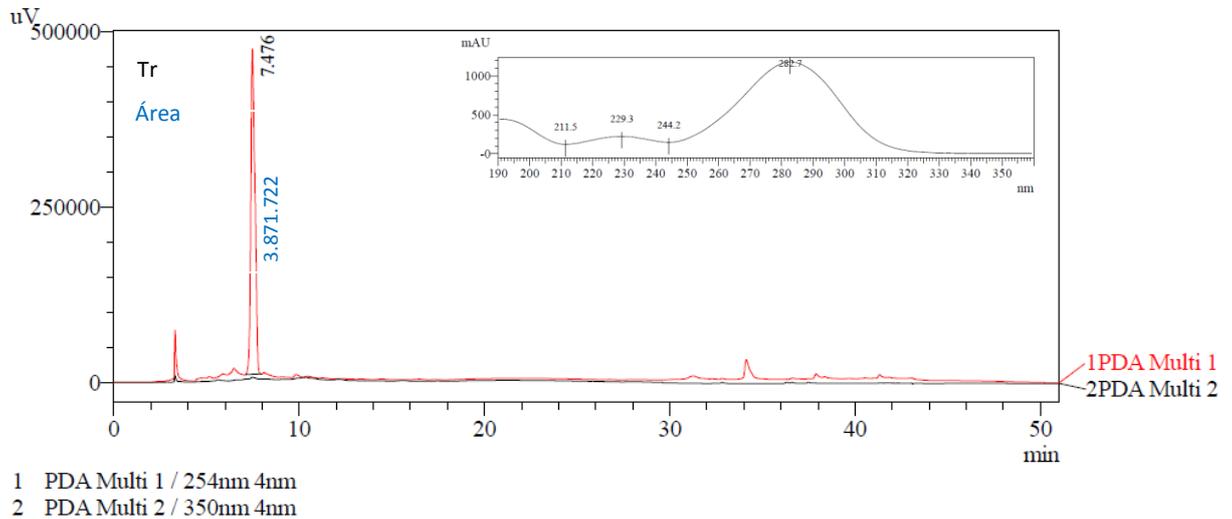
**Figura 25:** Esquema simplificado do processo de purificação da qual foram extraídas as moléculas AM-1, AM-2, AM-3 e AM-4. **A** = Subfração 0% MeOH. **B°** = Subfração 50% MeOH. **1** = Subfração 0% MeOH. **3** = Subfração 50% MeOH. **4** = Subfração 70% MeOH. **b** = Subfração 50% MeOH. **c** = Subfração 70% MeOH.

#### 5. 4 Elucidação Estrutural de AM-1 e AM-2

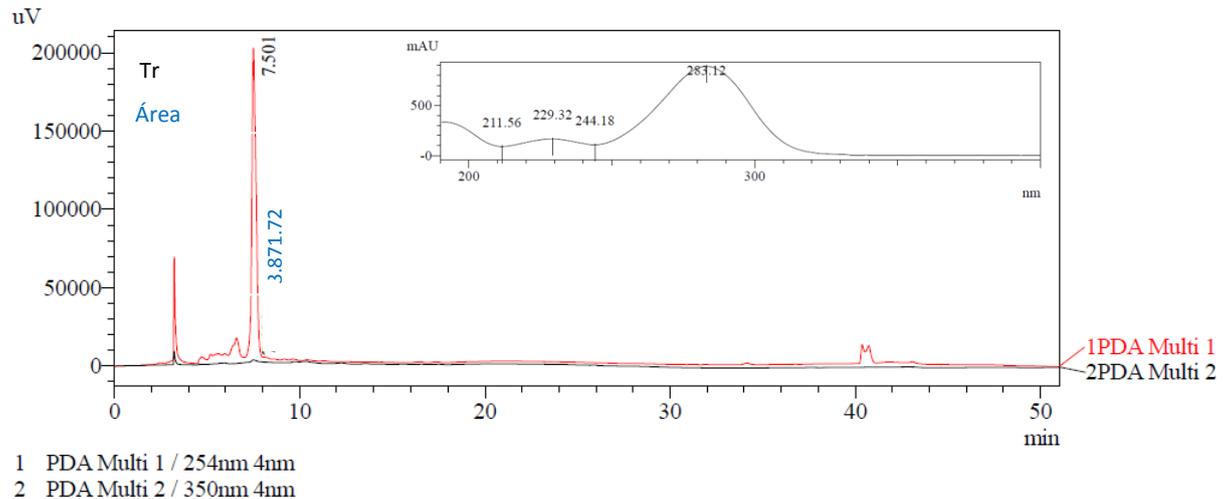
As amostras AM-1 e AM-2, apesar de serem advindas de frações distintas, são constituídas pelas mesmas substâncias, apenas em concentrações diferentes, como será apresentado a seguir.

As amostras AM-1 e AM-2 foram isoladas a partir da FAcEt e FB, respectivamente, absorvendo em 254 nm (Figura 26 e 27). Observa-se um pico em cada cromatograma próximo a 7,5 minutos referente à substância identificada, bem como um pico em aproximadamente 3 minutos, o qual corresponde ao

solvente acetonitrila (dados não mostrados). No espectro de UV observa-se uma banda em torno de 282 nm, indicativa de composto aromático (McMurry, 2005).



**Figura 26:** Cromatograma do perfil químico da substância AM-1 avaliado por CLAE (C= 5 mg/mL) com o espectro de absorção do ultravioleta.



**Figura 27:** Cromatograma do perfil químico da substância AM-2 avaliado por CLAE (C= 5 mg/mL) com o espectro de absorção do ultravioleta.

Para a elucidação das moléculas identificadas foram necessárias outras técnicas para auxiliar sua caracterização como os métodos espectrofotométricos e Ressonância Magnética Nuclear.

### 5.4.1 Espectro de Infravermelho

No espectro da substância AM-1 e AM-2 (Figura 28) observam-se bandas de média absorção em torno de  $1726,36\text{ cm}^{-1}$ ,  $1641,49\text{ cm}^{-1}$  e  $11631.85\text{ cm}^{-1}$ , o que conforme Silverstein e Webster (1998) indica estiramento da carbonila alusivo à deformação axial de C = O. Observa-se também um sinal de forte absorção em  $3441,16\text{ cm}^{-1}$  alusivo à deformação axial de OH em ligações intermoleculares, bem como um sinal de média intensidade em  $2937,71\text{ cm}^{-1}$  indicativo de deformação de C-H do anel aromático (McMurry, 2005).

A banda de absorção em  $1408,10\text{ cm}^{-1}$  indica uma deformação axial de C = C do anel aromático. Por sua vez, as bandas absorvidas na região entre  $1300\text{ cm}^{-1}$  a  $900\text{ cm}^{-1}$  são bem complexas, visto que cada molécula possui um padrão de absorção característico. Contudo, destacam-se a banda de média absorção em  $1060,89\text{ cm}^{-1}$ , indicativa de deformação axial de C - O (McMurry, 2005). O espectro também possui picos na região entre  $814,00\text{ cm}^{-1}$  e  $777,35\text{ cm}^{-1}$ , os quais correspondem a deformações fora do plano C - H aromático dissustituído (Silverstein e Webster, 1998).

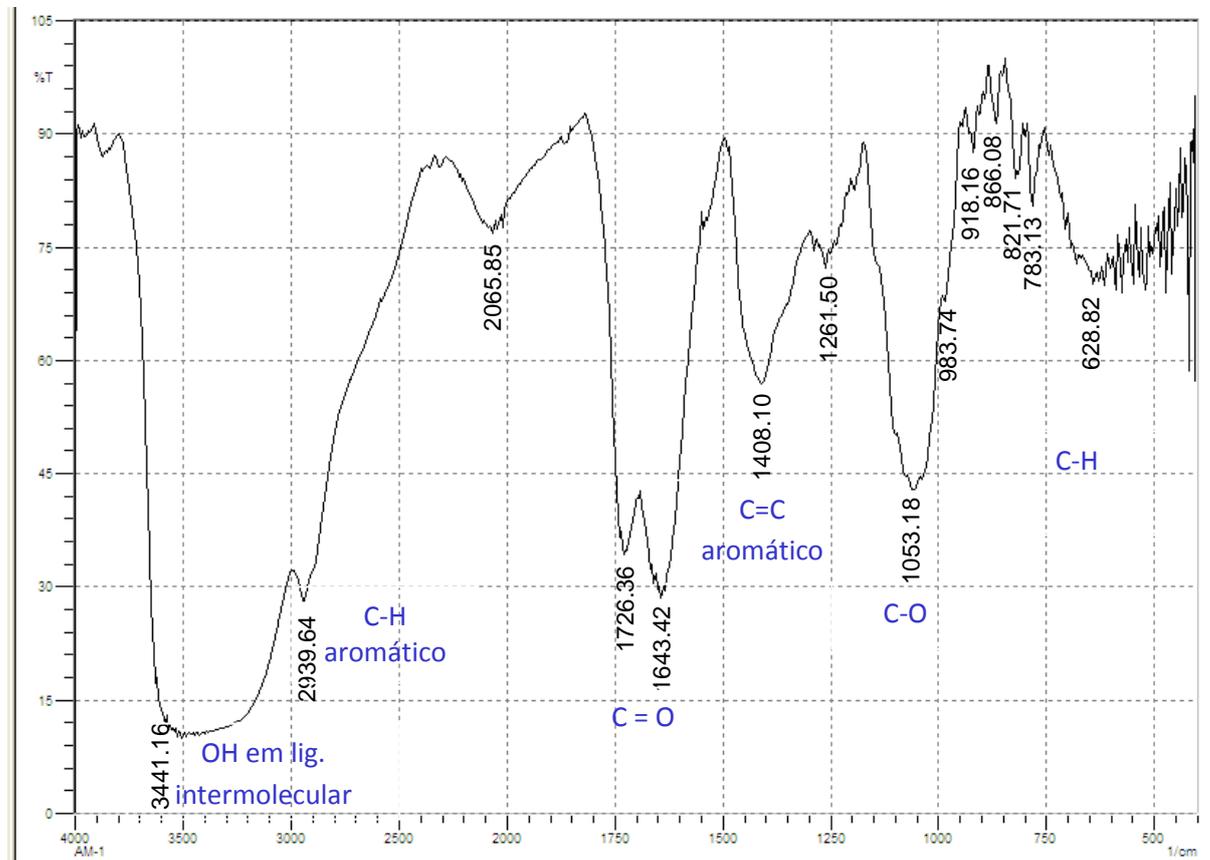


Figura 28: Espectro de Infravermelho da substância AM-1 e AM-2.

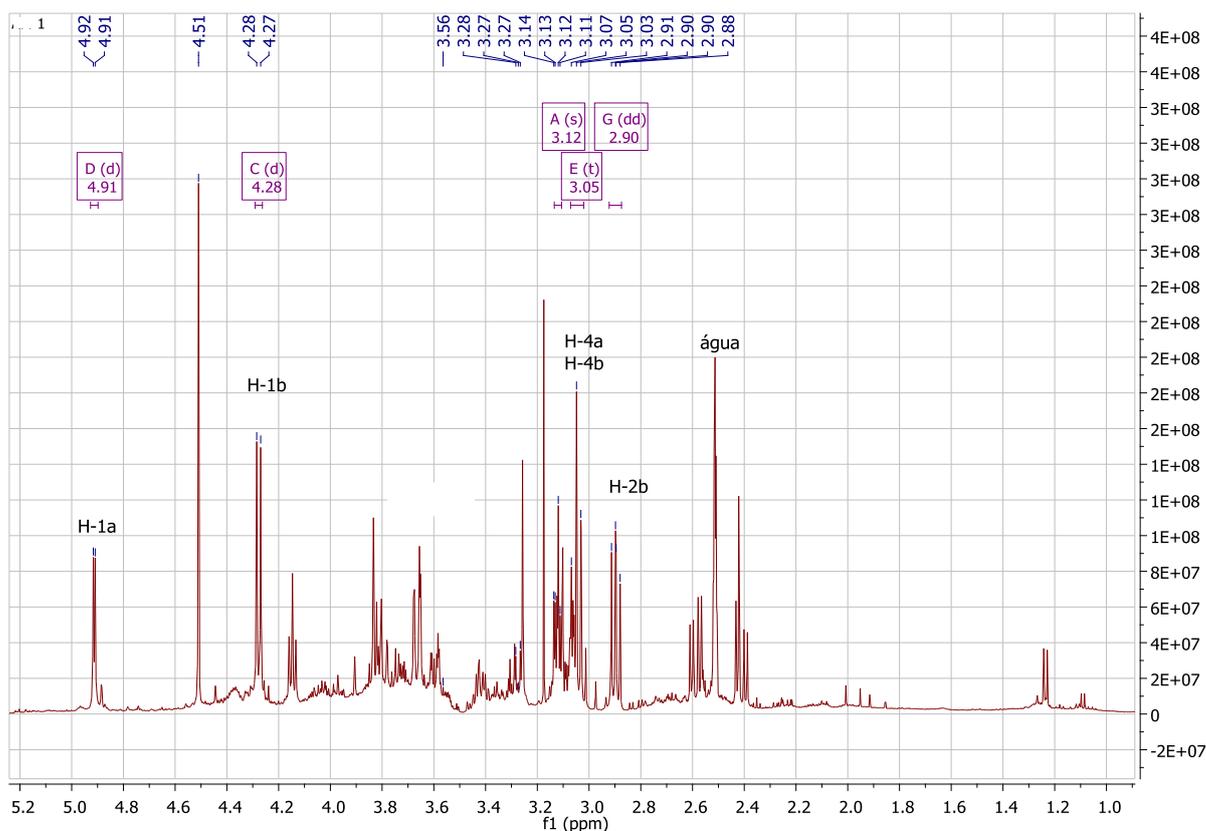
## 5.4.2 Técnicas Monodimensionais

As amostras AM-1 e AM-2 foram submetidas à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para identificação.

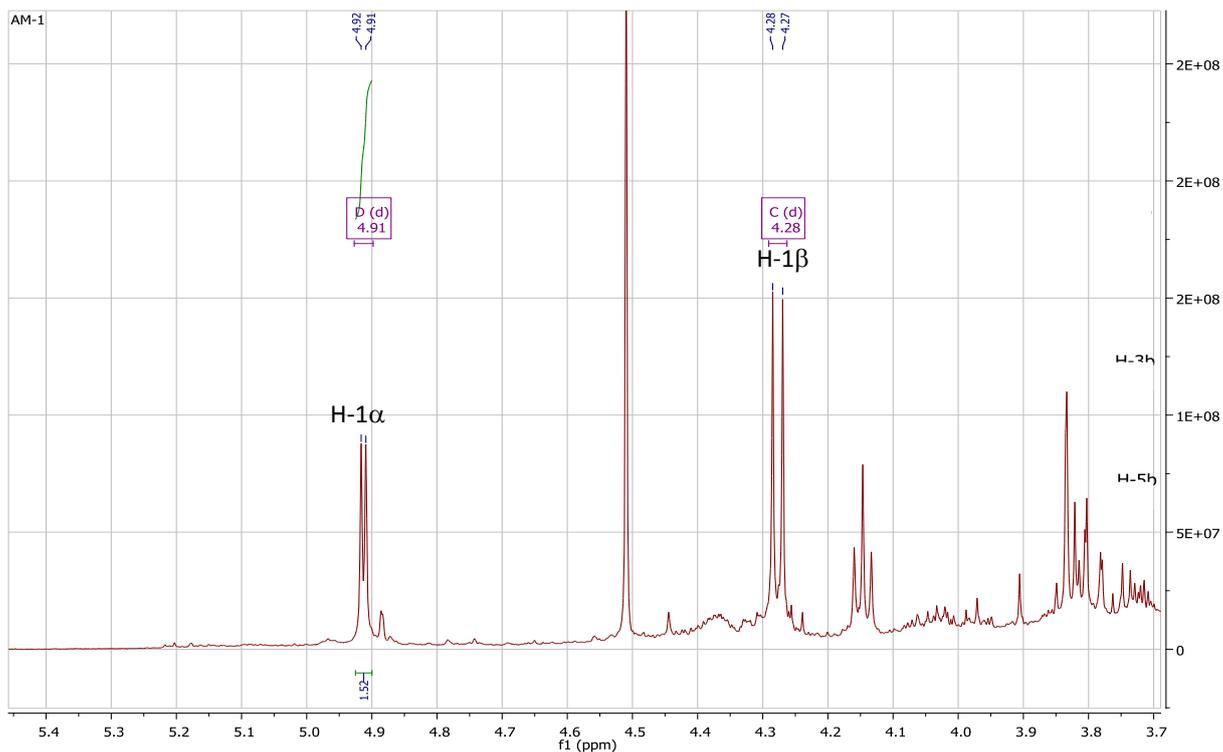
### 5.4.2.1 RMN $^1\text{H}$

Primeiramente, analisou-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AM-1 e AM-2 obtido em  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz) (Figura 29), bem como suas expansões (Figura 30 e 31). Este espectro apresentou sinais ( $\delta_{\text{H}}$ ) correspondentes aos grupos metilênicos e metínicos (Mabry et al., 1970).

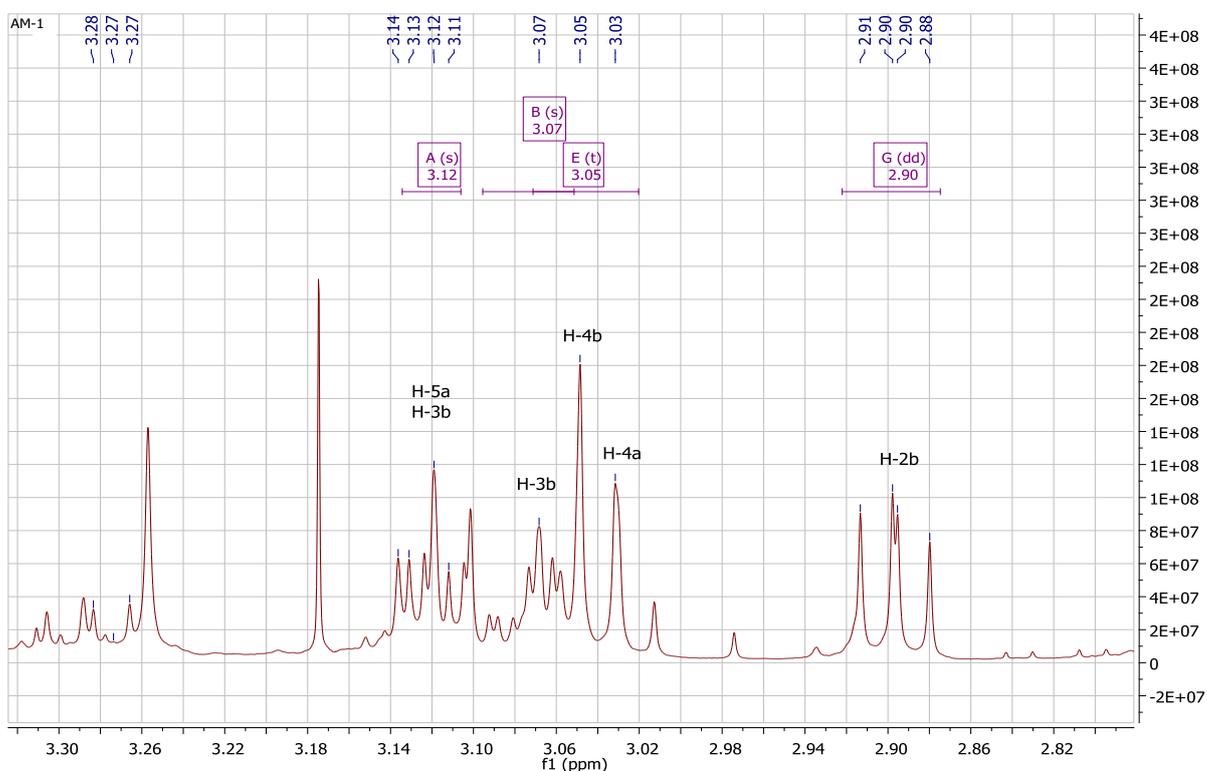
Os sinais observados inferem a características de uma substância glicosídica. O sinal em 4,91 ppm (d,  $J = 3.6$  Hz, 2H) representando um duplete foi atribuído ao hidrogênio H-1 $\alpha$ . Na região em torno de 3,12 ppm foram atribuídos dois sinais ao duplete: H-5 $\beta$  e H-3  $\alpha$  (Argondizo et al., 2007).



**Figura 29:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AM-1 e AM-2 (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



**Figura 30:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AM-1 e AM-2 (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ), com a expansão da região dos sinais entre 5,4 a 3,7 ppm.



**Figura 31:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AM-1 e AM-2 (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ), com a expansão da região dos sinais entre 3,20 a 2,72 ppm.

Os sinais na região em torno de 3,05 ppm ( $J = 9.2$  Hz, 4H) referente a um tripleto foram atribuídos ao H-4 $\beta$ , H-4 $\alpha$  e H-3  $\beta$ , enquanto que o duploduplete em 2,90 ppm ( $J = 9.0, 7.8$  Hz, 2H) foi atribuído ao H-2 $\beta$ . Já o hidrogênio ligado ao carbono 1 do anel  $\beta$  foi aferido ao sinal em 4,28 ppm.

Observa-se a presença de outros sinais, mas que não são referentes à substância identificada. Estes sinais são relativos a outras moléculas presentes em menor concentração e que não foram passíveis de identificação.

Os sinais de RMN  $^1\text{H}$  encontrados (Tabela 14) foram comparados com os dados na literatura (Argondizo et al., 2007; Araújo & Chaves, 2005; Correia, 2002).

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

O espectro de  $^{13}\text{C}$  da amostra AM-1 e AM-2 (Figura 32 e 33) forneceu sinais que corroboram com a proposta de uma substância glicosídica, a saber: D-glicopirranose, em suas duas formas isoméricas  $\alpha$  e  $\beta$  em equilíbrio, sendo que a porcentagem dos isômeros são para AM-1: 53,77%  $\beta$ -D-glicopiranosídeo, 29,78%  $\alpha$ -D-glicopiranosídeo e 16,45 % de compostos em menor concentração; e para AM-2 64,86 %  $\beta$ -D-glicopiranosídeo, 32,83%  $\alpha$ -D-glicopiranosídeo e 2,31 % de compostos em menor concentração.

Os sinais com deslocamentos químicos em 96,9 ppm e 92,3 ppm foram atribuídos aos carbonos C-1  $\beta$  e C-1  $\alpha$ , respectivamente. Já o sinal com deslocamento químico em torno de 76,8 ppm foi atribuído aos carbonos C-5  $\beta$  e C-3  $\beta$  (sobreposição de sinais), como pode ser observado no espectro de HSQC (Figura 38, página 107). O sinal observado em 74,8 ppm foi atribuído ao C-2  $\beta$ , respectivamente (Marchese, 2009; Argondizo et al. 2007).

Os sinais em 63,0 e 61,3 ppm foram atribuídos aos carbonos CH<sub>2</sub>-6  $\alpha$  e CH<sub>2</sub>-6 $\beta$ , enquanto os sinais em 70,6 e 70,4 ppm foram imputados aos C-4  $\alpha$  e C-4  $\beta$ . Além disso, observou-se sinais em 72,4 ppm, 73,2 ppm e 72 ppm, os quais foram atribuídos, respectivamente, aos C-2  $\alpha$ , C-3  $\alpha$  e C-5  $\alpha$  (Mabry et al., 1970).

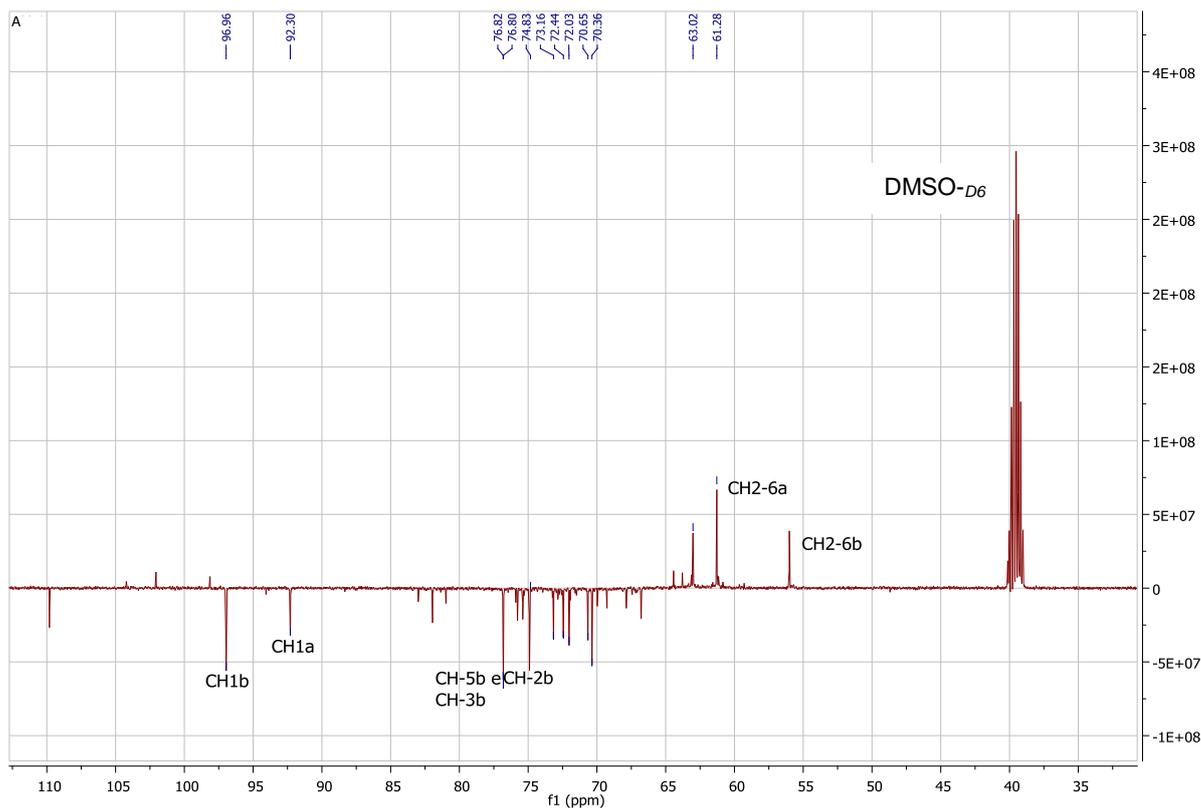


Figura 32: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de AM-1 e AM-2 (500 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).

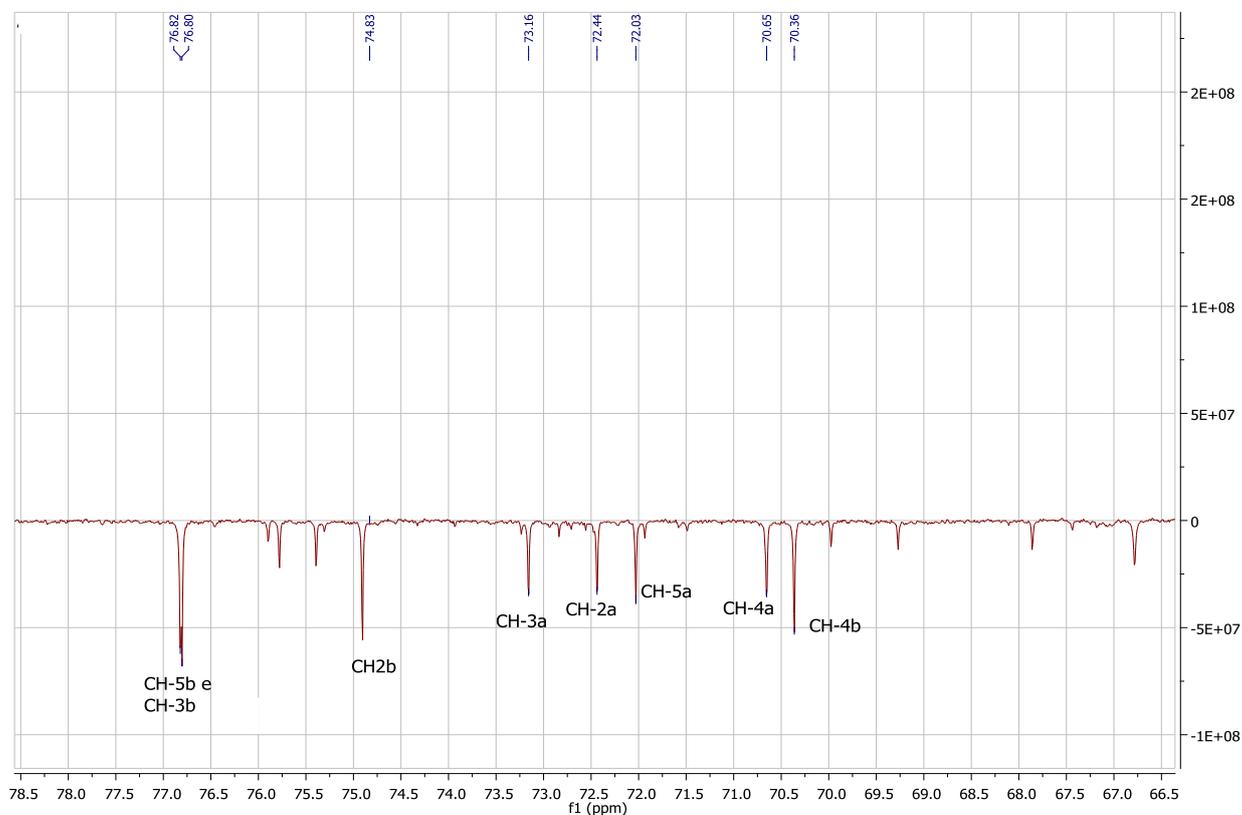
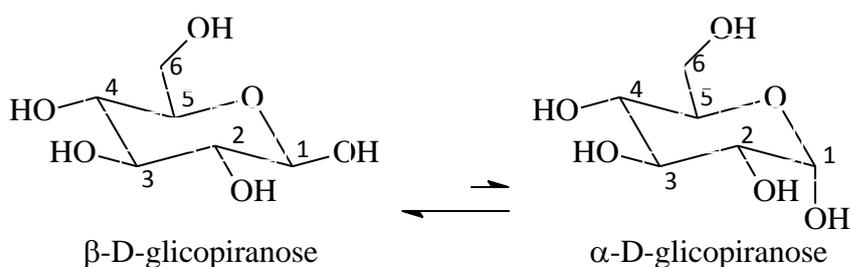


Figura 33: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) de AM-1 e AM-2 com a expansão dos sinais entre 78,5 a 66,5 ppm.

Portanto, os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitem inferir a identificação de ( $\alpha$ -D-glicopirranose e  $\beta$ -D-glicopirranose), como mostra a Figura 34. Entretanto, para confirmar a elucidação dessa molécula foram empregadas técnicas bidimensionais.



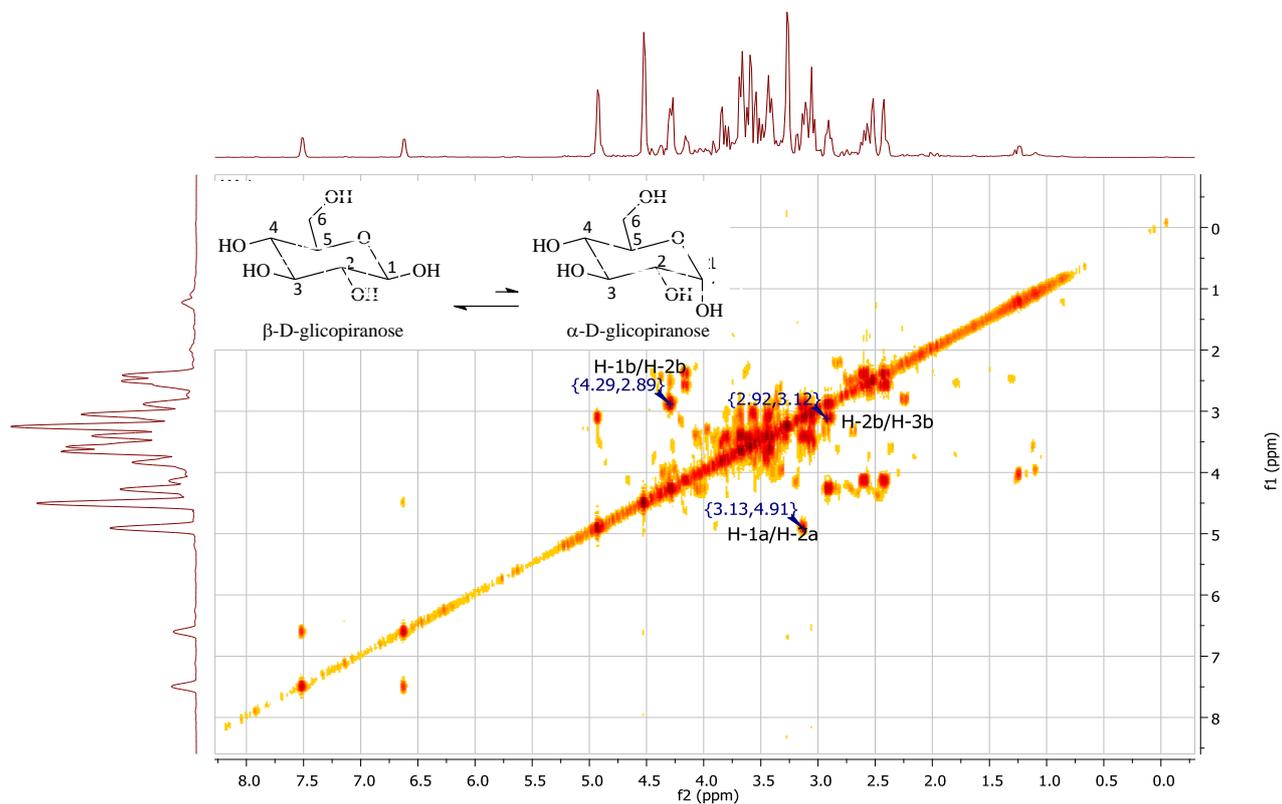
**Figura 34:** Estrutura química dos isômeros identificados:  $\alpha$ -D-glicopirranose e  $\beta$ -D-glicopirranose.

### 5.4.3 Técnicas Bidimensionais

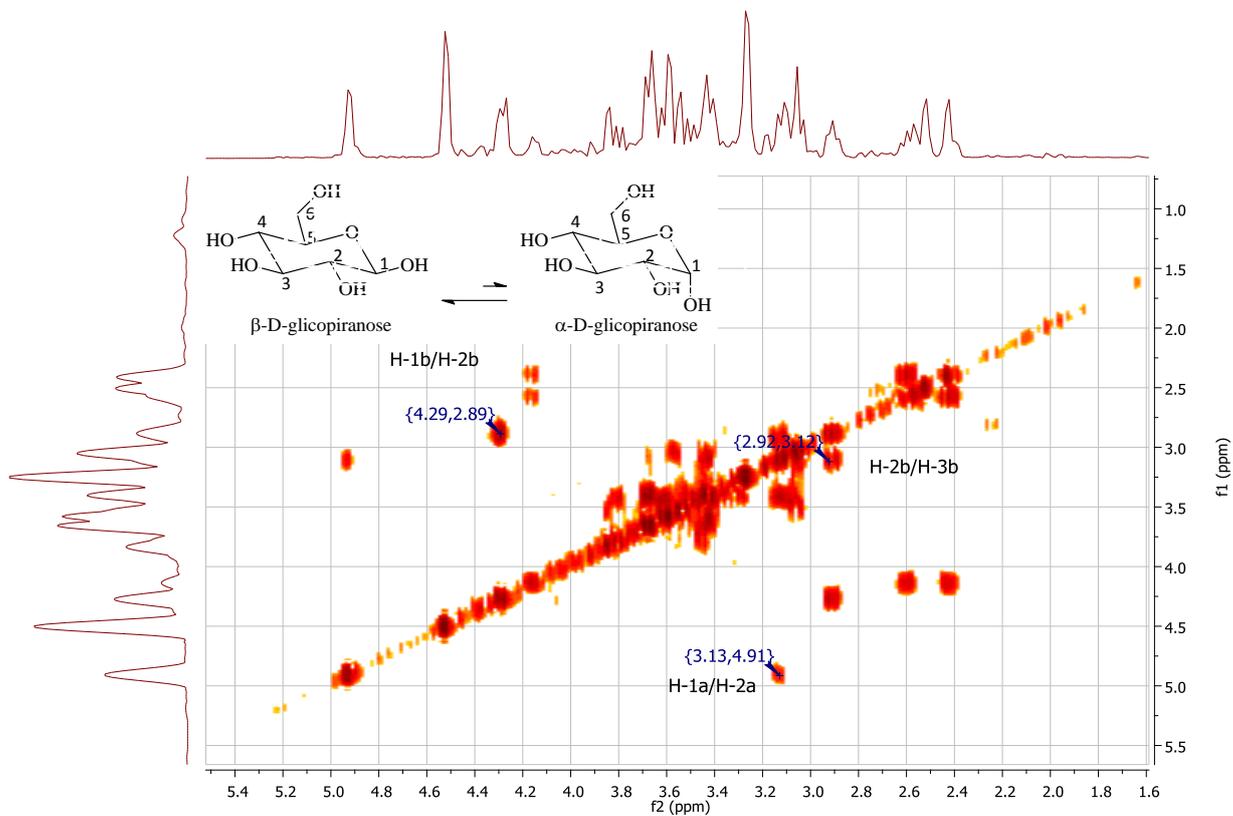
#### 5.4.3.1 COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$

A partir da análise do COSY foi possível identificar a correlação entre os hidrogênios vizinhos, mostrando a sua correlação. É possível ver que o H-2 $\beta$  está em correlação com o H-1 $\beta$  e H-3 $\beta$ , bem como o H-1 $\alpha$  está se correlacionando com o H-2 $\alpha$ .

A Figura 35 mostra o espectro de COSY  $^1\text{H}$  - $^1\text{H}$  com essas correlações, bem como sua expansão (Figura 36).



**Figura 35:** Espectro de RMN 2D- COSY para AM-1 e AM-2 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

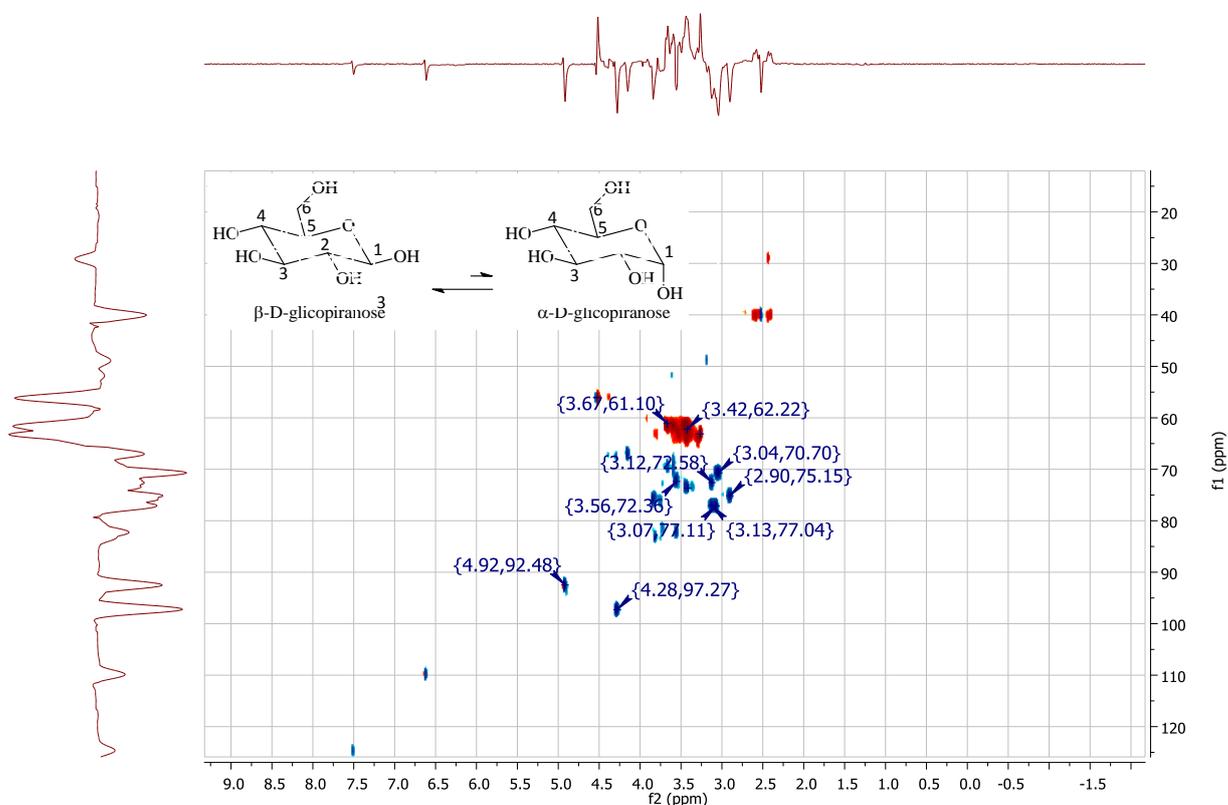


**Figura 36:** Espectro de RMN 2D- COSY para AM-1 e AM-2 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ) com a expansão da região dos sinais entre 5,4 e 1,6 ppm.

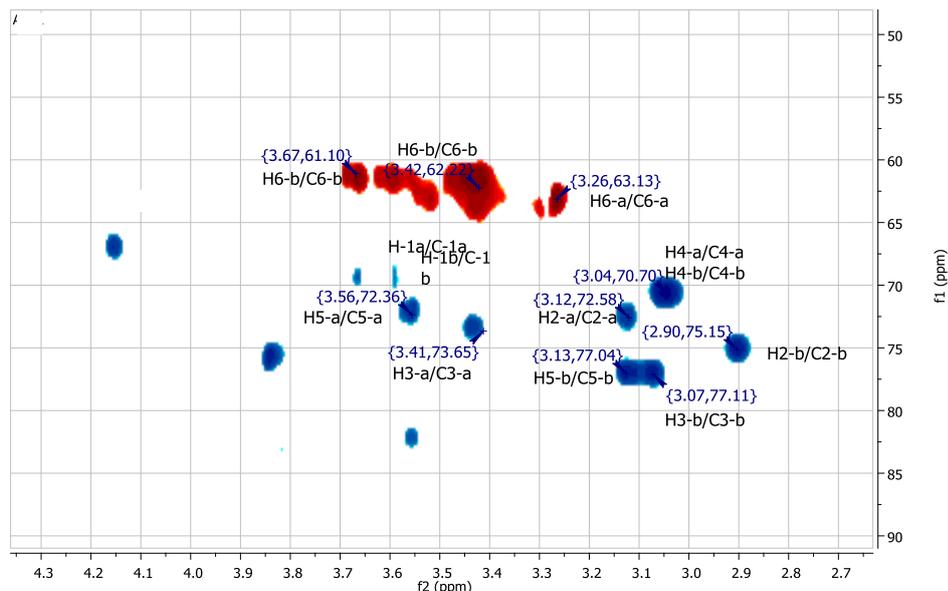
### 5.4.3.2 HSQC

Com base nos dados do espectro de HSQC (Figuras 37 e 38) 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 identificada possuíam um hidrogênio a eles ligado.

A complexidade das ressonâncias nos açúcares livres enriquecidos sugere que C-6 é dividido por ambos os anômeros (Walker et al. 1976).



**Figura 37:** Expansão do espectro de RMN -2D HSQC para AM-1 e AM-2 (500 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).



**Figura 38:** Espectro de RMN-2D HSQC para AM-1 e AM-2(500 MHz; DMSO- $d_6$ ) com expansão da região entre 4,3 ppm e 2,7 ppm.

#### 5.4.3.3 HMBC

Através da análise das correlações a longa distância  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Figura 39 e 40) 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, permitindo assim, a confirmação a correlação entre os sinais de  $^1\text{H}$  com  $^{13}\text{C}$  apresentadas na Tabela 14.

Pelo espectro de HMBC é possível correlacionar os sinais de H-1 com os carbonos CH-4 $\alpha$  e H-2 com o carbono CH-1 $\beta$ , ou seja, a correlação dos hidrogênios e carbonos ligados diretamente a eles, o que é corroborado pelos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Embora acoplamentos  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  de  $^2\text{J}_{\text{CH}}$  e  $^3\text{J}_{\text{CH}}$  sejam muito menores e menos previsíveis, tendências consistentes foram observadas na série de hexopiranoses.

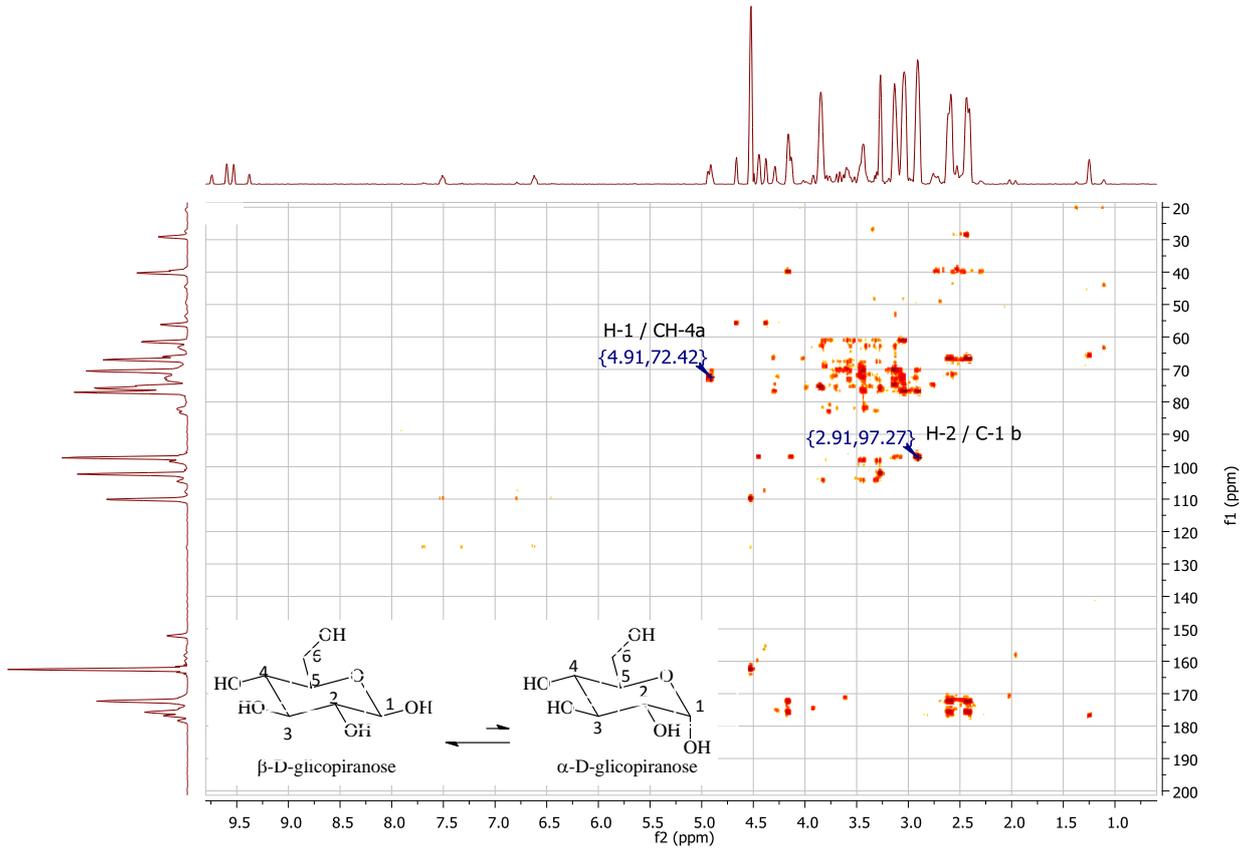


Figura 39: Espectro de RMN-2D HMBC para AM-1 e AM-2 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

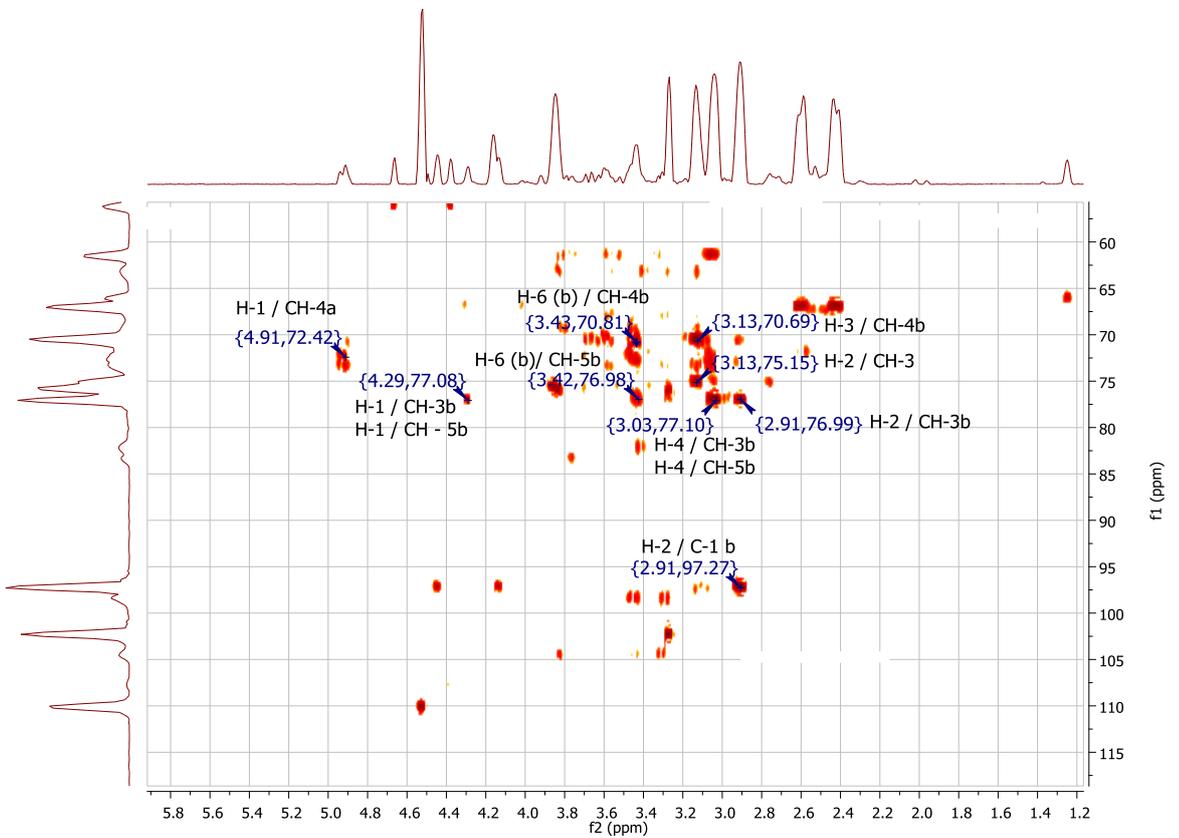
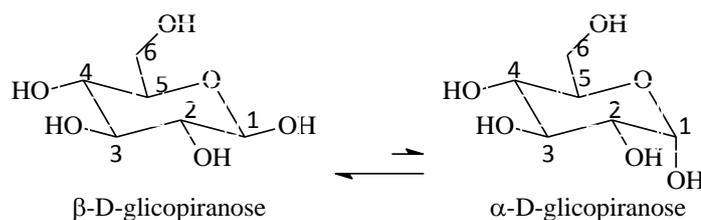


Figura 40: Expansão do espectro de RMN-2D HMBC para AM-1 e AM-2 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

Assim, a Tabela 14 apresenta um resumo dos dados obtidos para a substância AM-1 e AM-2 ( $\alpha$ -D-glicopiranosose e  $\beta$ -D-glicopiranosose) a partir das análises realizadas pela técnica de RMN em experimentos mono e bidimensionais, bem como uma comparação com dados encontrados na literatura.

**Tabela 14:** Sinais de carbono de AM-1 e AM-2 ( $\alpha$ -D-glicopiranosose e  $\beta$ -D-glicopiranosose) e suas correlações.



$\alpha$ -D-glicopiranosose

	HSQC		HMBC		Literatura
	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_c$
<b>CH</b>					
1	92,3	4,91	-	-	93,6
2	72,4	3,12	H-1	H-4	73,2
3	73,2	3,41	H-4	H-1	74,5
4	70,6	3,04	H-5	H-2	71,4
5	72,0	3,56	-	-	73,0
<b>CH<sub>2</sub></b>					
6	63,0	3,26	-	-	62,3

$\beta$ -D-glicopiranosose

	HSQC		HMBC		Literatura
	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_c$
<b>CH</b>					
1	96,9	4,27	H-2	-	97,4
2	74,8	2,90	-	-	75,9
3	76,8	3,07	H-2	H-1	77,5
4	70,4	3,04	H-3	H-6	71,3
5	76,8	3,13	H-4, H-6	-	77,4
<b>CH<sub>2</sub></b>					
6	61,3	3,67	-	-	62,5

\* Moura et al., 2011; Marchese, 2009; dos Santos, 2008; Argondizo et al., 2007; Araújo & Chaves, 2005; Walker et al., 1976.

É evidente a partir dos acoplamentos listados na Tabela 14 que a magnitude dos acoplamentos de carbono-carbono e carbono-hidrogênio geminados e vicinais varia de acordo com a configuração de cerca de C-1 dos monossacarídeos. Uma melhor compreensão da relação entre o acoplamento escalar e a configuração ou conformação dos monossacarídeos será extremamente útil para análise de espectros de compostos mais complexos e fazer atribuições de  $^{13}\text{C}$  a partir de  $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$  (Silverstein & Webster, 1998)

Os açúcares já são bem descritos na literatura, inclusive para a espécie *A. muricata* L. (Araújo, 2013; Rios, 2013; Almeida et al., 2009; Abbo et al., 2006; Ferelli et al., 2005; Aziz e Yusof, 1994; Paull et al., 1983; Falcão et al., 1982).

Os açúcares ou carboidratos constituem, geralmente, cerca de 90% da matéria seca dos vegetais. A designação D e L, comumente observada na terminologia dos açúcares, é de acordo com a posição do grupo hidroxila (- OH) no penúltimo carbono, isto é, do carbono próximo ao grupo  $\text{CH}_2$  (Melo Filho & Vasconcelos, 2011).

A grande maioria das hexoses naturais é em configuração D, o que justifica a presença desta conformação na estrutura identificada. Além disso, a glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) possui fórmulas estruturais tanto cíclica quanto acíclica. Em solução, a tendência das formas acíclicas da glicose é ciclizar, formando anéis piranosídicos. O aldeído em C-1, na forma em cadeia aberta, reage com a hidroxila em C-5, formando o anel piranose. Desta reação podem resultar duas formas anômeras designadas  $\alpha$ -D-glicopiranose e  $\beta$ -D-glicopiranose, sendo esta última a mais comum em solução (Farber, 2011).

Os carboidratos também fornecem a maior parte das calorias da dieta da população humana, bem como proporcionam texturas e paladares desejáveis, sendo reconhecidos como edulcorantes, isto é, em alimentos, os carboidratos atuam basicamente como agentes de sabor (doçura), agentes de escurecimento (reações das carbonilas provenientes dos carboidratos) e agentes formadores de goma, influenciando na textura dos alimentos. As propriedades dos açúcares estão diretamente relacionadas com a estrutura química deles e, então, é com base nelas que é possível escolher qual açúcar ou carboidrato será, por exemplo, utilizado para a fabricação de um determinado alimento. A indústria processadora de frutas utiliza as propriedades dos açúcares e as reações de escurecimento. Em relação à bioquímica de carboidratos, verifica-se que é bem desenvolvida,

principalmente quanto à obtenção de amidos especiais que se destinam a fins industriais específicos (Farber, 2011).

É importante salientar também que os carboidratos são os nutrientes mais largamente consumidos, seja na forma de açucarados naturais como as frutas e o mel, seja na forma de açucarados propriamente ditos como o açúcar comercial nas várias formas e de alimentos elaborados a base de açúcar (geleias, xaropes, etc.) (Chen & Andreasson, 2001).

A ingestão de açúcar leva ao aumento do consumo de calorias e sacia a fome, porém, impede o consumo de outros nutrientes. O excesso de ingestão de açúcar acelera o metabolismo quanto à produção de insulina e provoca hipoglicemia aparente (hiperglicemia verdadeira) (Silveira et al., 2011; Quast, 1999).

Interessantemente, há uma relação entre carboidratos e ácidos graxos. Randle et al (1963) propuseram a existência de uma competição entre glicose e ácidos graxos como substratos para a síntese de adenosina trifosfato (ATP) no músculo esquelético, cardíaco e adipócitos. Nesse processo, foi demonstrado que, sob elevada disponibilidade de lipídios, os músculos esqueléticos empregam predominantemente ácidos graxos para a síntese e obtenção de ATP. Em contraste, sob elevada disponibilidade de carboidratos, utilizam predominantemente glicose.

Como dito anteriormente, os carboidratos constituem uma rica fonte de energia ao organismo. Todavia, a capacidade de estoque desse substrato é limitada, requerendo-se a busca por estratégias de economia e armazenamento de energia na forma de carboidrato. O requerimento diário de glicose por esses tecidos é da ordem de 300 g/dia, ao passo que a capacidade do fígado, principal reservatório de carboidratos, em armazenar glicogênio é de cerca de 100 g/dia em adultos (Silveira et al., 2011).

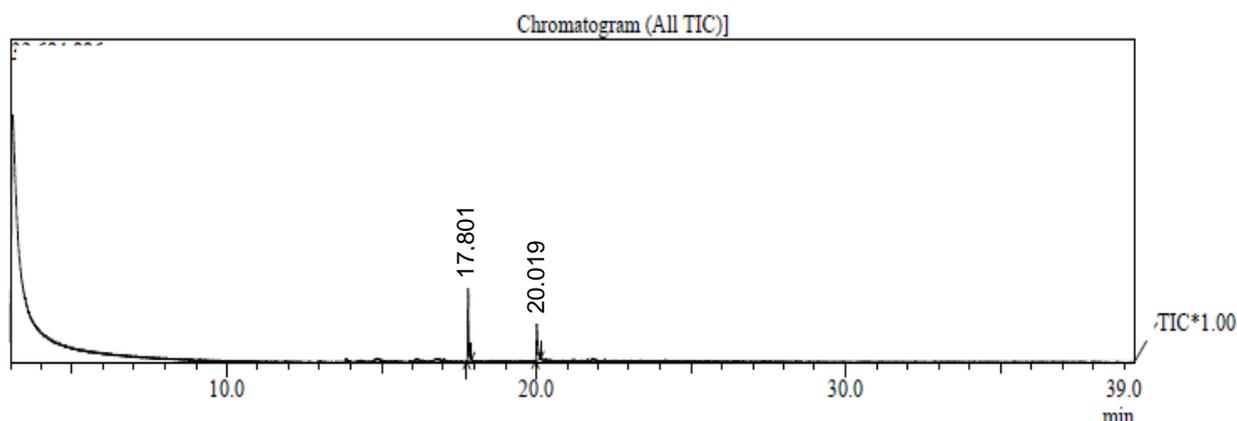
Por outro lado, as reservas de lipídios no organismo são muito superiores às de carboidratos, o que explicaria a preferência do organismo pelos lipídios em condições basais e principalmente de jejum, aumentando a disponibilidade de glicose para outros tecidos (sistema nervoso, sanguíneo e imunológico), os quais são essencialmente mantidos à custa desse substrato. A importância fisiológica desse mecanismo conhecido como ciclo glicose-ácido graxo, portanto, consiste não somente no aumento do fornecimento de energia

aos tecidos, mas principalmente na economia da utilização dos estoques limitados de glicose (Silveira et al., 2011).

Desta forma, fica evidente a importância dos carboidratos para os alimentos e para o metabolismo humano.

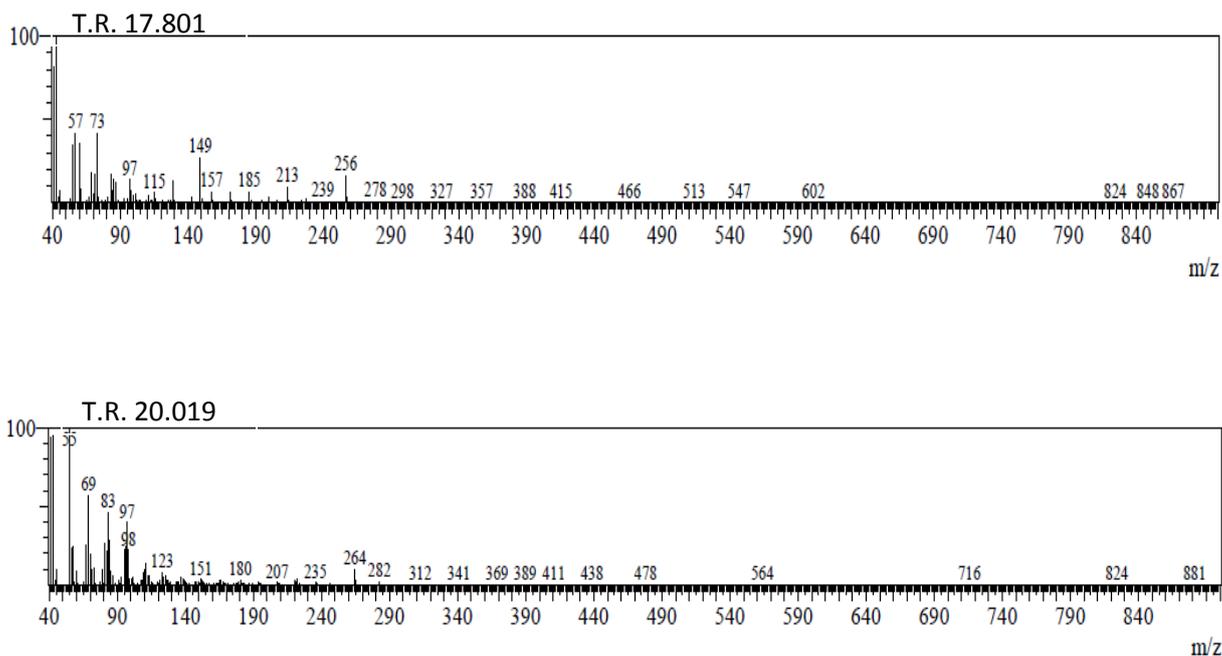
### 5.5 Elucidação Estrutural de AM-3

Por meio da CG-MS foi possível verificar que na amostra AM-3 há a presença de duas substâncias: uma substância majoritária com tempo de retenção de 17,801 minutos, área de 15.960.263, a qual corresponde a 55,83% da área e outra substância com tempo de retenção de 20,019 minutos, área de 12.624.645, a qual corresponde a 44,7% da área, sendo o seu grau de pureza suficiente para a identificação (Figura 41).



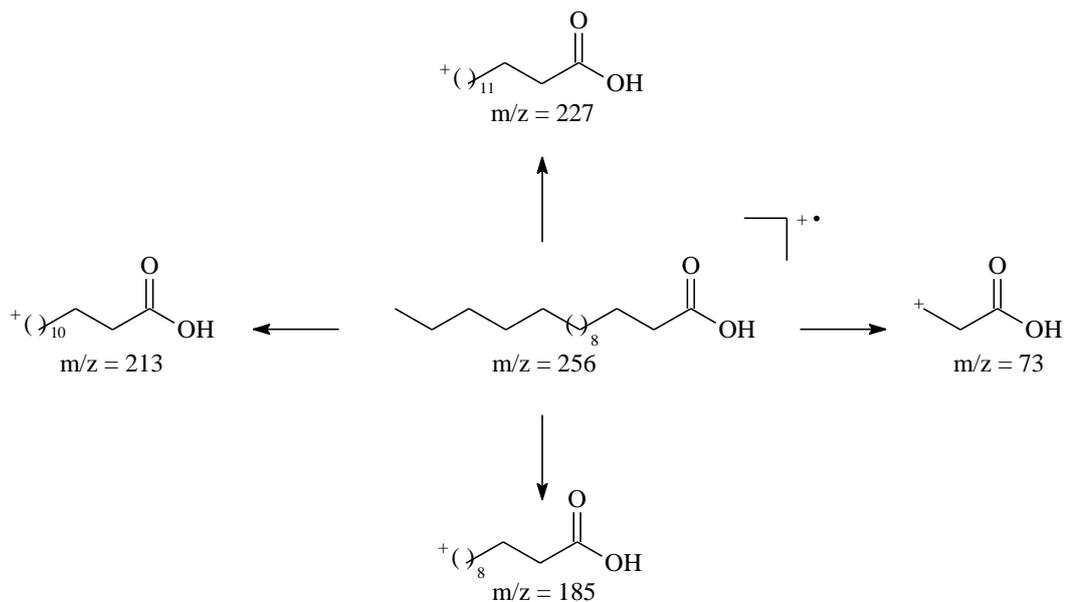
**Figura 41:** Cromatograma do perfil químico da substância AM-3 avaliado por CG-MS com a respectiva ampliação da área dos picos.

O espectro de massas com os sinais característicos é apresentado na Figura 42. Verifica-se no espectro da substância AM-3 referente à substância com tempo de retenção em torno de 17 minutos que o pico base é  $m/z$  57. Pode-se observar nos espectros que são formados íons característicos de alcanos lineares  $m/z$  57 e 73, devido à linearidade dos compostos. O fragmento em  $m/z$  97 corresponde à perda de grupos  $\text{CH}_2$  resultante de quebras sucessivas de C-C originando íons alquila. Conforme mostra a Figura 43, o íon  $m/z$  256 é característico do ácido palmítico referente a quebra da porção ácida da molécula (Saraiva, 2008; Siqueira et al., 2003).

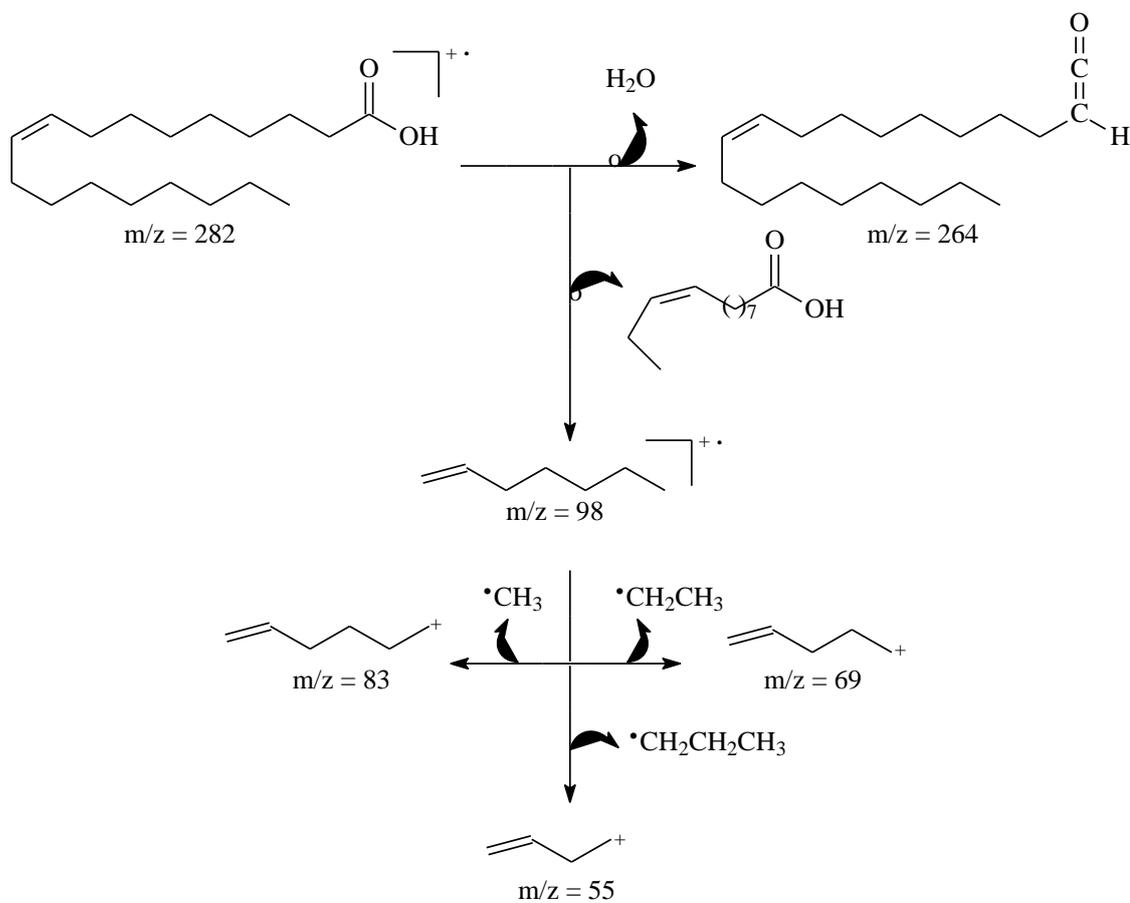


**Figura 42:** Espectro das substâncias presentes em AM-3 avaliado por CG-MS, faixa de aquisição de massa: 40-400u.

Já em relação à substância com tempo de retenção em torno de 20 minutos o pico base é  $m/z$  55. A formação de  $m/z$  69 resulta da quebra da ligação C-C de  $M^+ - 15$  (perda da metila), seguido da transferência de um átomo de hidrogênio para o carbono olefínico. Os fragmentos em  $m/z$  69, 83 e 97 correspondem à perda de grupos  $CH_2$  resultante de quebras sucessivas de C-C originando íons alquila, enquanto o íon  $m/z$  264 indica a perda da porção epóxido (Figura 44), justificado pela perda de água do íons molecular, possibilitando a indicação da dupla ligação nos carbonos C-9 e C-10 (Saraiva, 2008; Rebouças et al., 1999).



**Figura 43:** Proposta de rota de fragmentação para o ácido palmítico.



**Figura 44:** Proposta de rota de fragmentação para o ácido oleico.

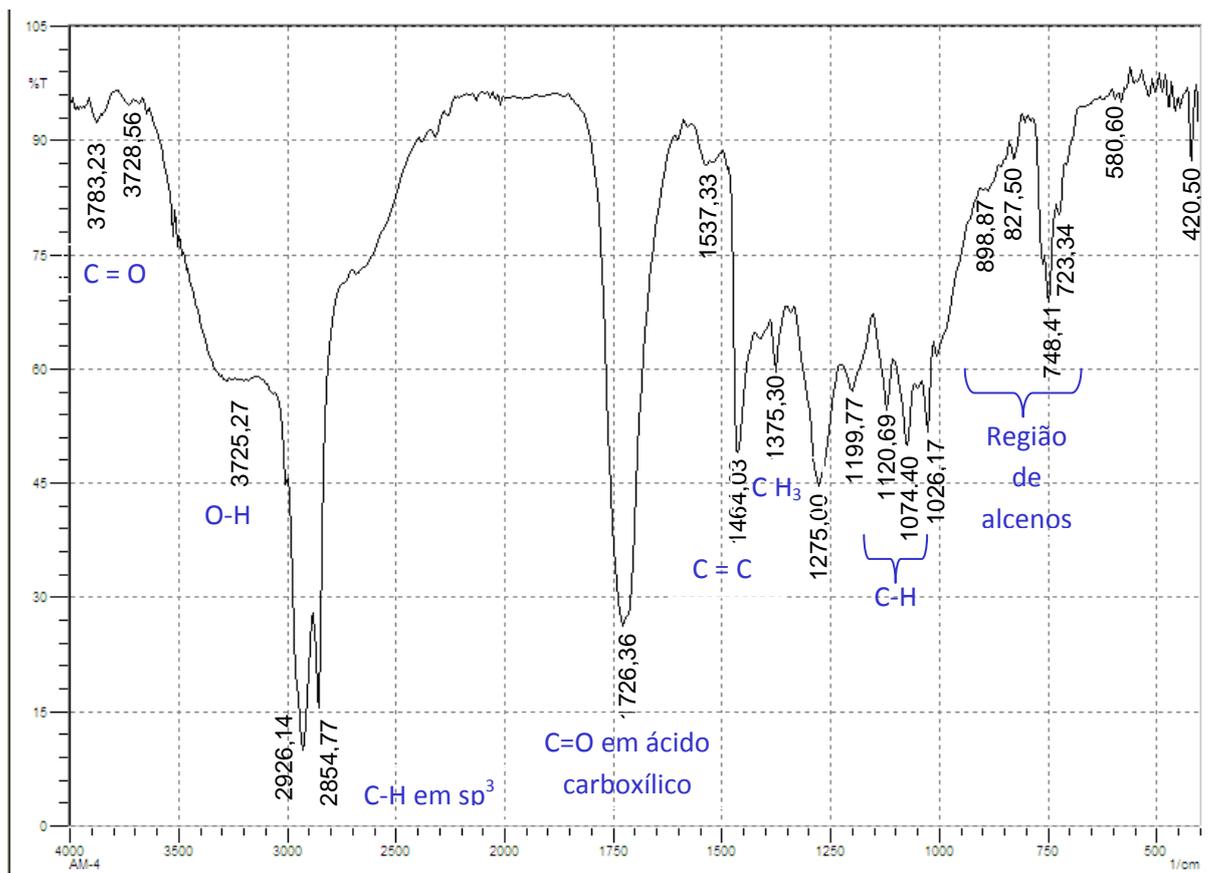
### 5.5.1 Espectro de Infravermelho

No espectro da substância AM-3 (Figura 45) observa-se uma banda de forte 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 à deformação axial de  $\text{C} = \text{O}$  de ácidos carboxílicos. Observam-se também os sinais de fraca intensidade em  $3873,23\text{ cm}^{-1}$  e  $3728,56$  alusivos à vibrações de estiramento harmônicas. Já o sinal em torno de  $3275,27$  é indicativo de O-H em ligações ROH.

A região entre  $1300\text{ cm}^{-1}$  a  $900\text{ cm}^{-1}$  é bastante complexa por apresentar um grande número de bandas de absorção, tal que cada molécula apresenta um padrão de absorção característico e único, como se fosse uma impressão digital da substância. Devido a esta complexidade fica muito difícil identificar todas as bandas de absorção (McMurry, 2005). Neste caso é possível verificar uma banda média de deformação simétrica ( $\text{CH}_3$ ) em  $1375,30\text{ cm}^{-1}$ .

Os sinais em  $2926,14\text{ cm}^{-1}$  e  $2854,77\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos à deformação axial de C - H em carbonos  $\text{sp}_3$ . Neste caso a intensidade nesta região é elevada devido ao maior número de ligações C-H (de grupos metil  $\{\text{CH}_3\}$ , metileno  $\{\text{CH}_2\}$  e metino  $\{\text{CH}\}$ ). A região entre  $1450\text{ cm}^{-1}$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$ , onde se observa o pico de intensidade média  $1464,03\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação  $\text{C} = \text{C}$  (Silverstein e Webster, 1998).

O espectro de IV também apresenta vários picos na região entre  $723,34\text{ cm}^{-1}$  e  $898,87\text{ cm}^{-1}$ , os quais correspondem a picos de desdobramento fora do plano alusivos a alcenos. Além disso, observa-se também bandas de absorção em  $1120,69\text{ cm}^{-1}$  e  $1074,40\text{ cm}^{-1}$  que são alusivas à deformação angular de C-H (McMurry, 2005).



**Figura 45:** Espectro de Infravermelho da substância AM-3.

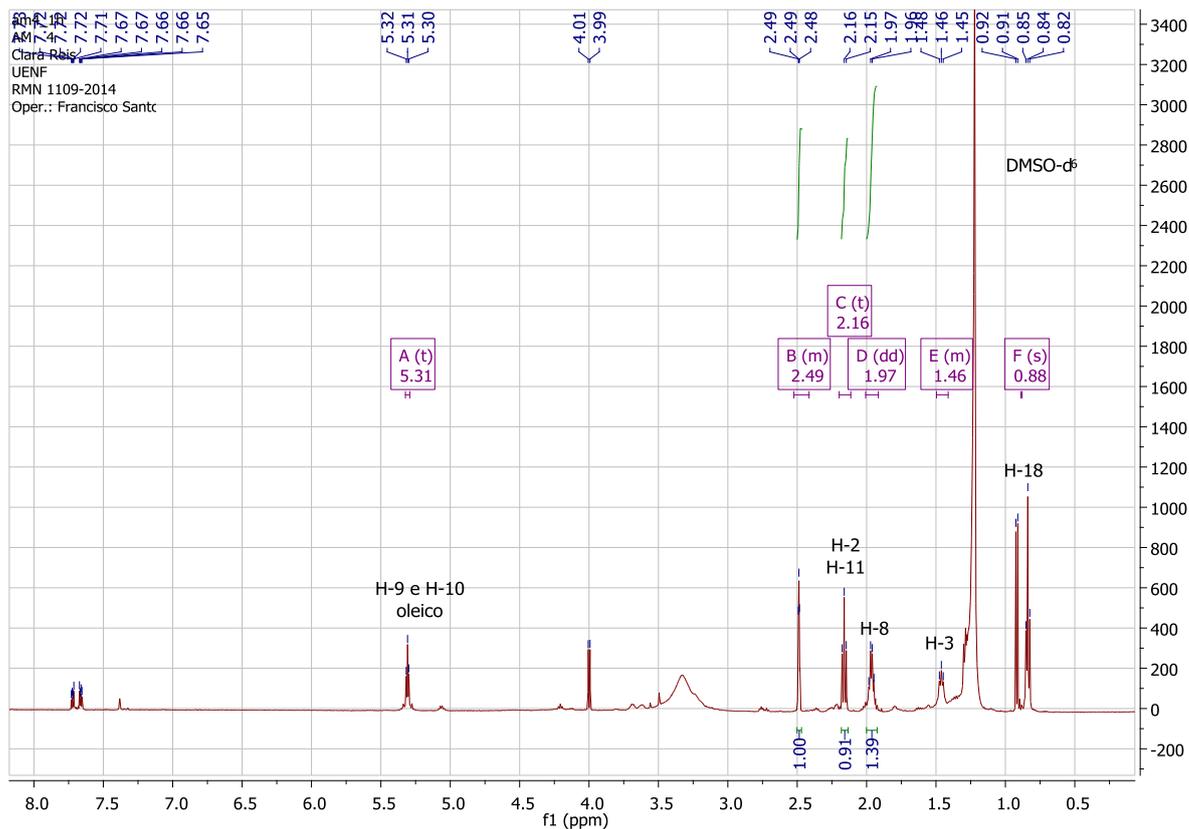
Esses dados corroboram com os sinais encontrados na literatura (dos Santos, 2008; McMurry, 2005; Carvalho et al. 1998).

## 5.5.2 Técnicas Monodimensionais

A amostra AM-3 foi submetida à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C para identificação.

### 5.5.2.1 RMN <sup>1</sup>H

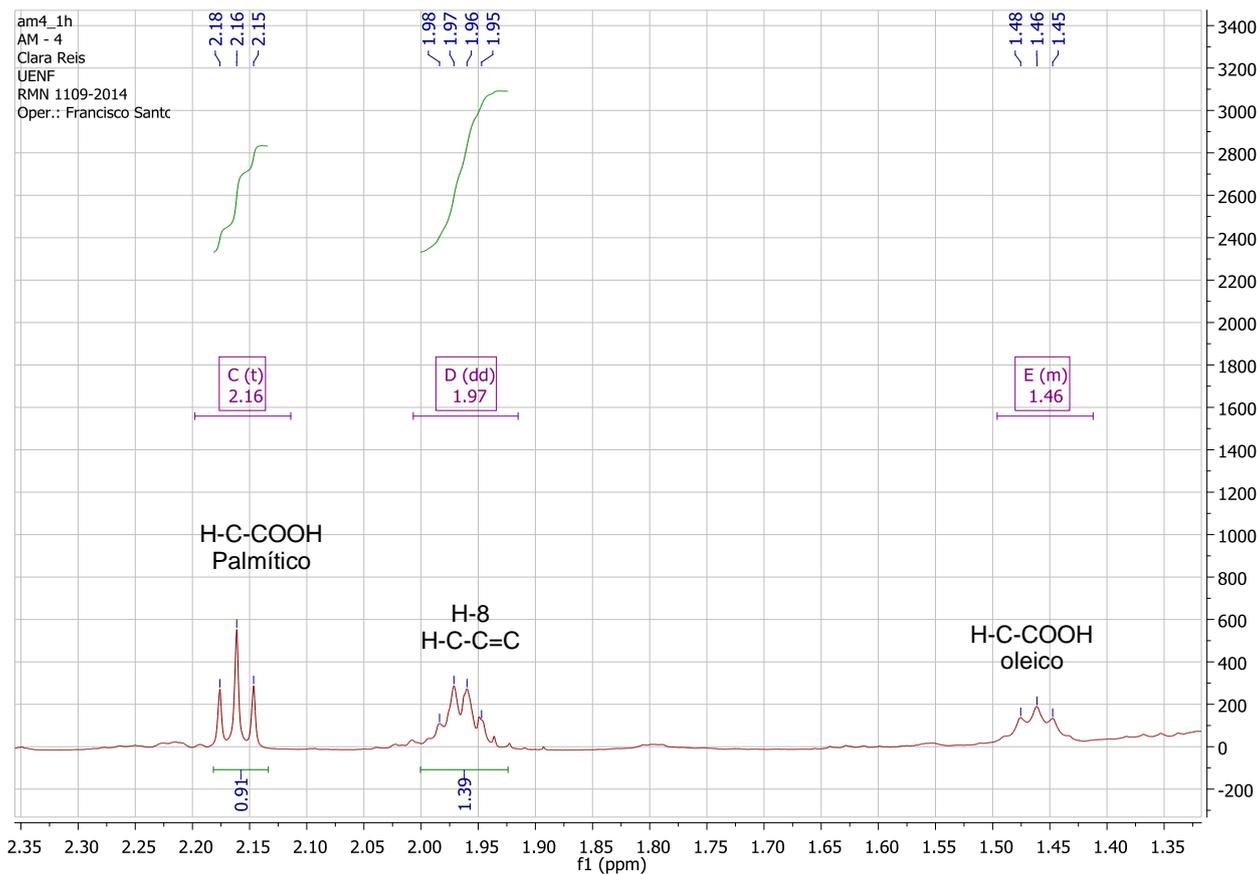
Primeiramente, analisou-se o espectro de RMN <sup>1</sup>H de AM-3 obtido em DMSO-*d*<sub>6</sub> (500 MHz) (Figura 46). Este espectro apresentou sinais ( $\delta_H$ ) correspondentes aos grupos metilênicos e metila (Mabry et al., 1970).



**Figura 46:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AM-3 (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Pode-se verificar que os sinais observados inferem a características de uma mistura de dois ácidos graxos: o ácido palmítico ( $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ) e o ácido oleico ( $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ), o que corrobora com o cromatograma CG-EM (Figura 41). A separação dessa mistura é complexa devido ao fato de ser a dupla ligação a responsável pela diferença estrutural entre elas.

O sinal em 5,31 ppm foi atribuído aos hidrogênios olefínicos H-9 e H-10 do ácido oleico. Na região do espectro correspondente ao deslocamento químico entre 0,8 e 2,4 ppm, referentes a hidrogênios de grupos metílicos e metilênicos, alguns sinais foram observados e se pode destacar para essa porção alifática da molécula a presença do sinal de 2,16 ppm (H-2) alusivo tanto ao ácido oleico como ao ácido palmítico (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H). O sinal em 1,96 ppm (dd,  $J = 12.0, 6.3$  Hz, 2H) foi atribuído ao H-8 do ácido oleico e o sinal em 1,46 ppm (m, 2H) ao H-3 do ácido oleico (Figura 47) (Argondizo et al., 2007).



**Figura 47:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AM-3 (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ), com a expansão da região dos sinais entre 1,35 a 2,35 ppm.

Os sinais de RMN  $^1\text{H}$  encontrados (Tabela 12) foram comparados com os dados na literatura (Argondizo et al., 2007; Araújo & Chaves, 2005; Correia, 2002).

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

O espectro de APT da amostra AM-3 (Figura 48) forneceu sinais que corroboram com as estruturas propostas. Os sinais com deslocamentos químicos próximos a 174,9 ppm foram atribuídos aos carbonos C-1 dos ácidos palmítico e oleico, respectivamente (Figura 49), lembrando que o ácido palmítico se apresenta em menor proporção que o oleico, conforme observado no cromatograma da Figura 41 (Marchese, 2009; Argondizo et al. 2007). A presença dos hidrogênios olefínicos H-9 e H-10 foi confirmada pelo sinal em aproximadamente 130,1 ppm. Os sinais 34,1 a 14,3 ppm foram atribuídos aos carbonos da porção alifática das moléculas.

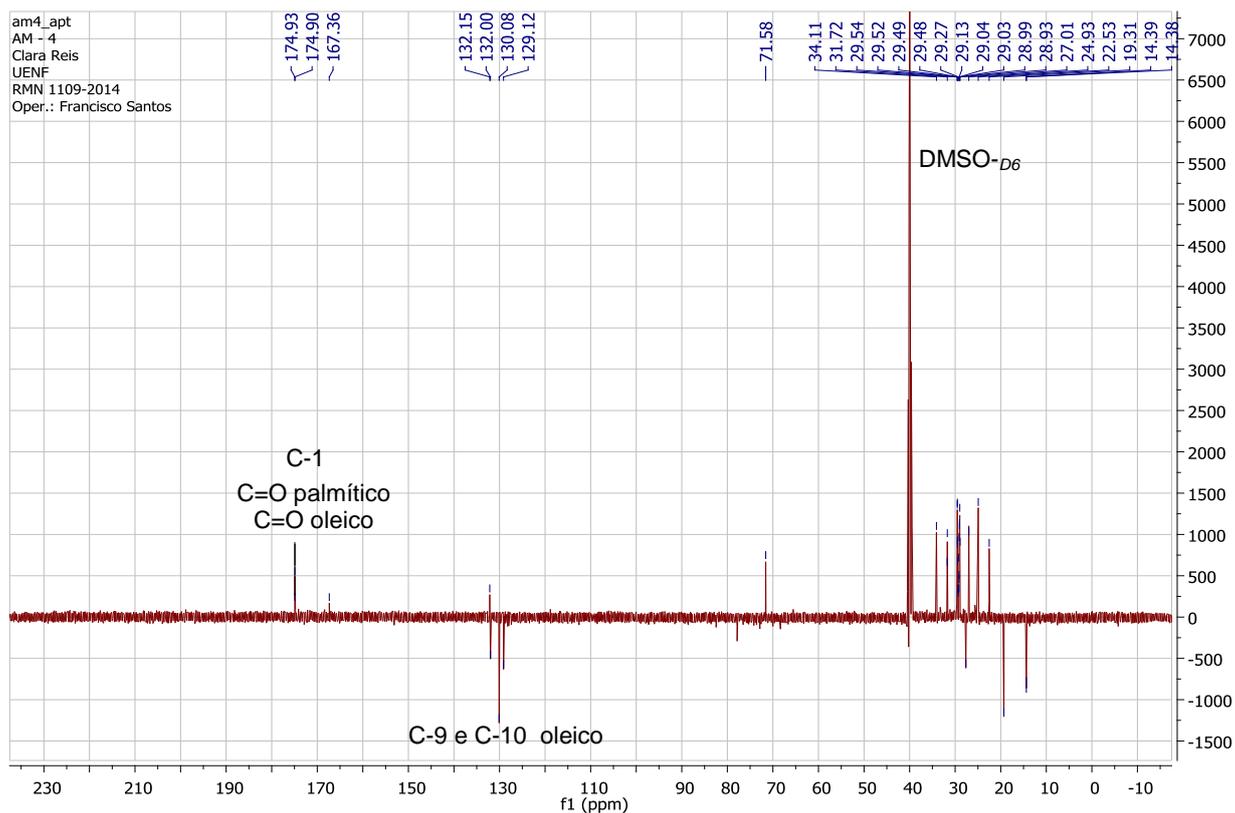


Figura 48: Espectro de RMN APT de AM-3 (500 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>).

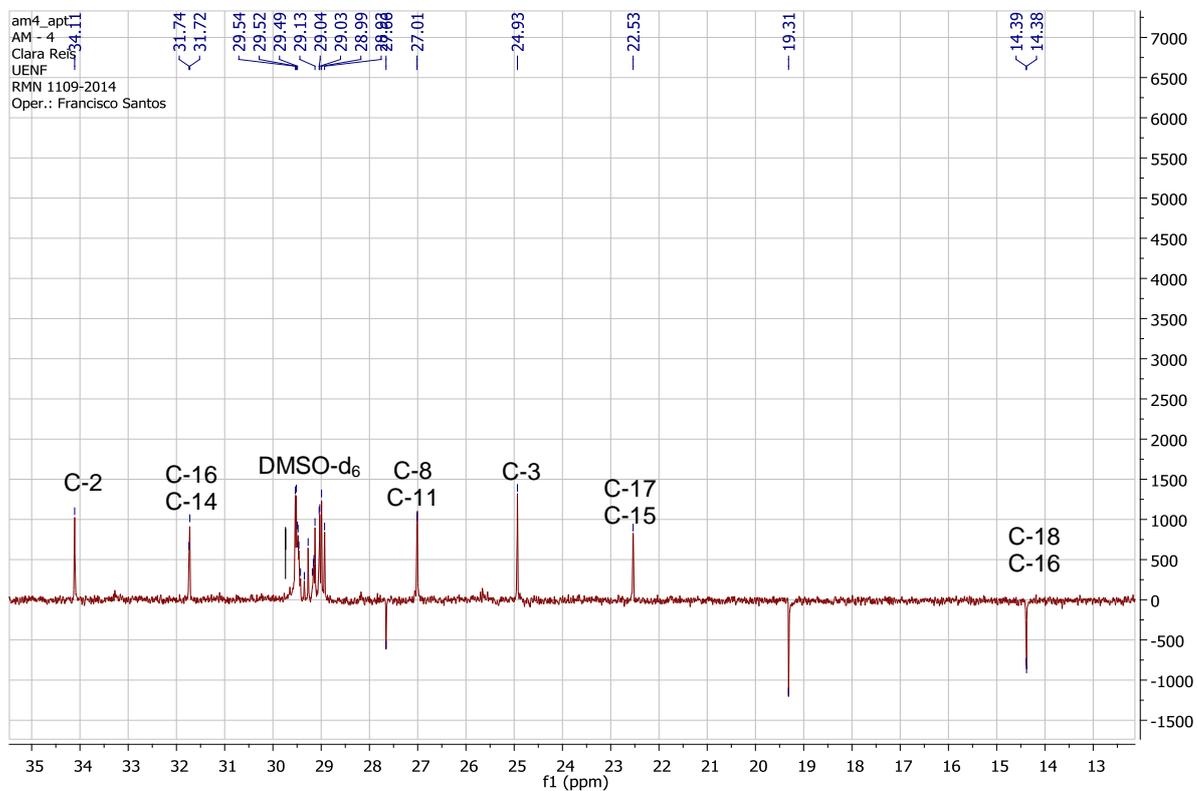
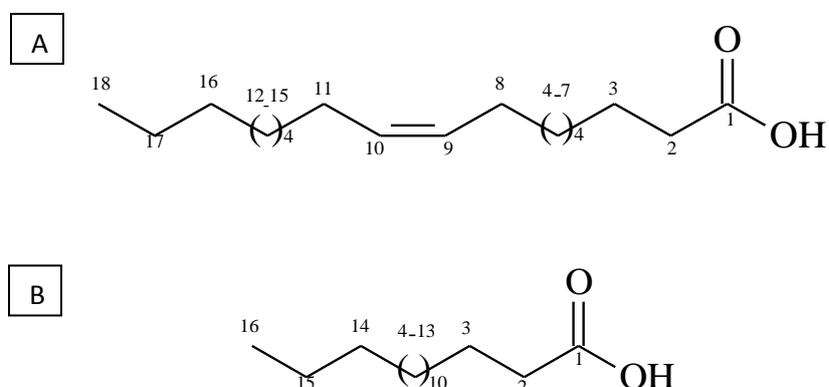


Figura 49: Expansão do espectro de RMN APT (500 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) de AM-3 (de 35,1 a 13,0 ppm).

Portanto, os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitem inferir a identificação de dois ácidos graxos elencados como ácido oleico e ácido palmítico, como mostra a Figura 50. Entretanto, para confirmar a elucidação dessa molécula identificada na fração butanólica, foram empregadas técnicas bidimensionais.

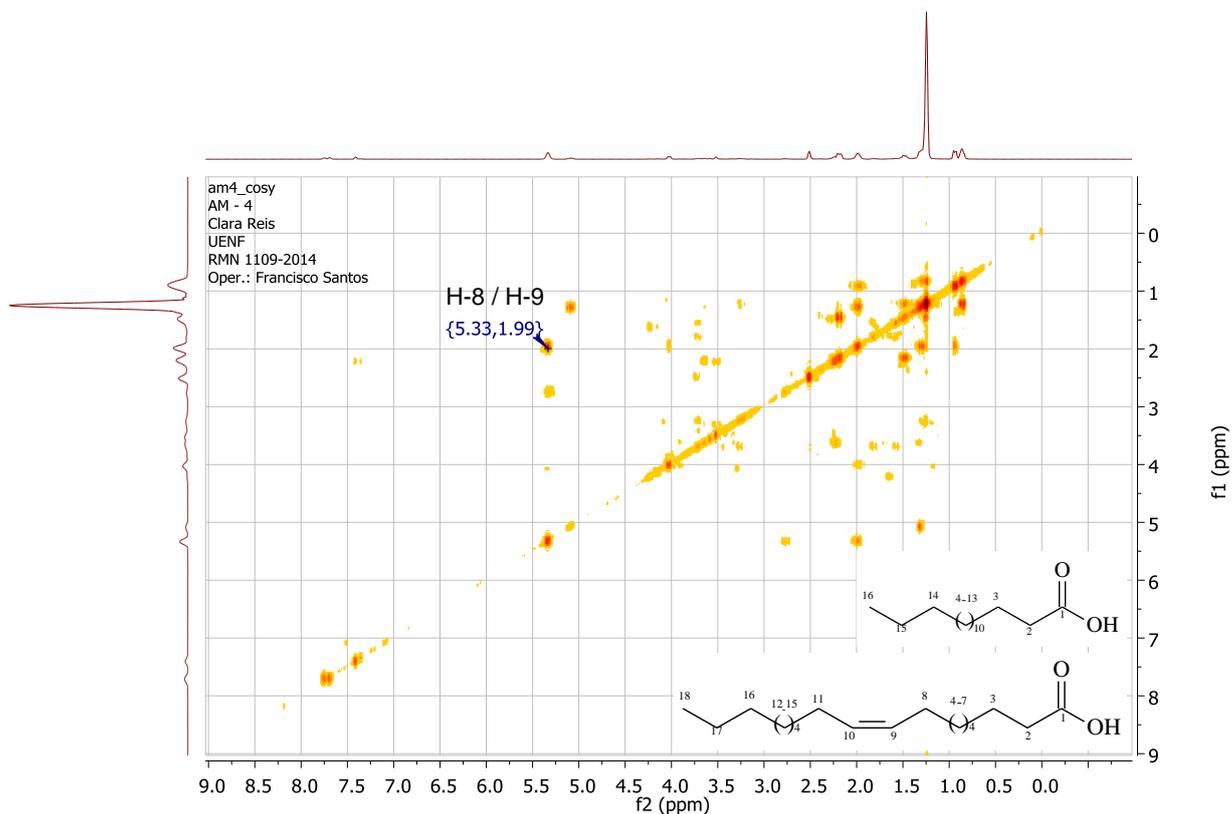


**Figura 50:** Estrutura química das moléculas identificadas: ácido oleico (A) e ácido palmítico (B).

### 5.5.3 Técnicas Bidimensionais

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

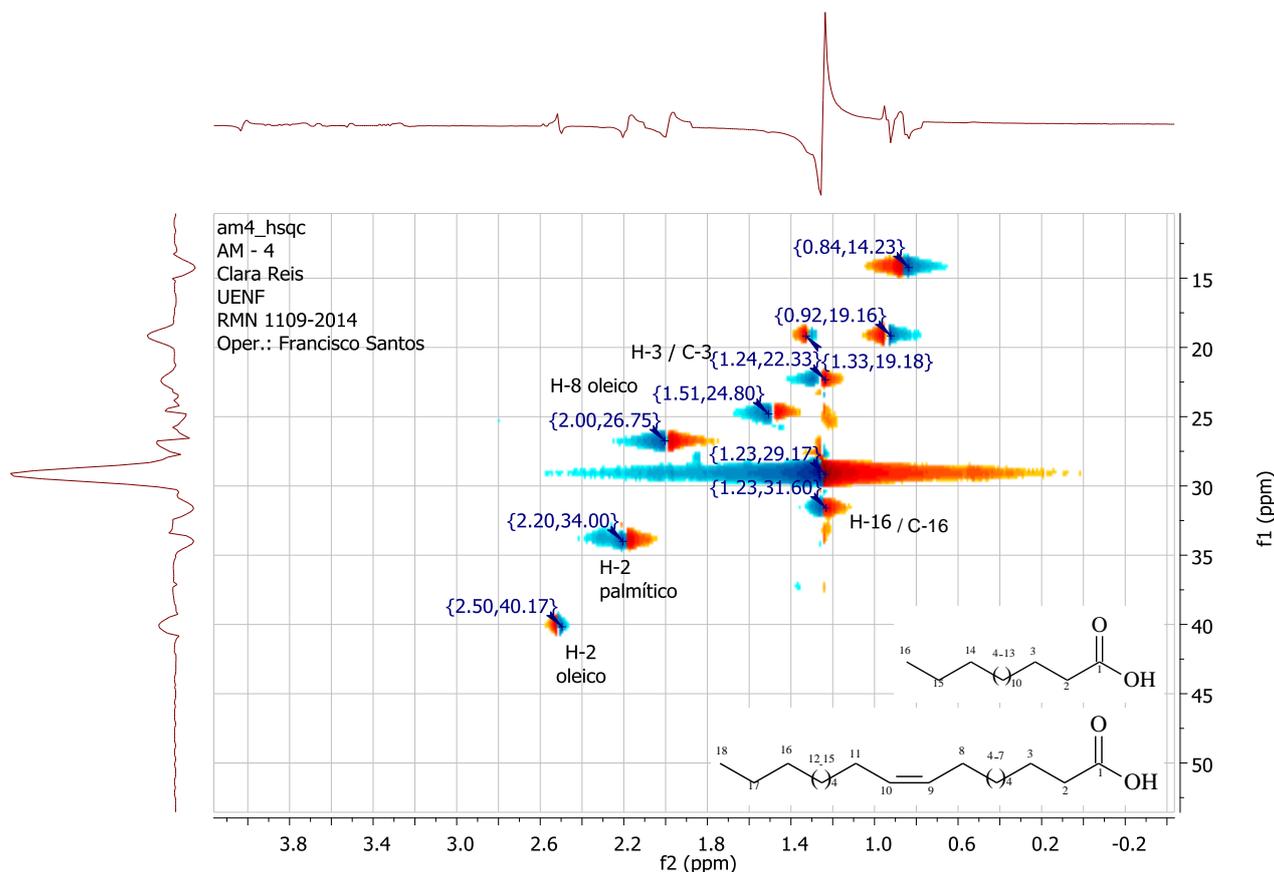
A partir da análise do COSY foi possível identificar a correlação entre os hidrogênios vizinhos H-8 e H-9, corroborando com os dados obtidos pelo espectro de  $^1\text{H}$ . É possível verificar pelo espectro somente essa correlação, visto que apenas estes dois hidrogênios estão acoplado (Figura 51).



**Figura 51:** Espectro de RMN 2D- COSY para AM-3 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

### 5.5.3.2 HSQC

Com base nos dados do espectro de HSQC (Figuras 52) foi possível estabelecer a correlação direta entre os núcleos de  $^1\text{H}$  com os núcleos de  $^{13}\text{C}$  a eles diretamente ligados. A partir da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar a correlação entre os sinais de H-2 e H-3 com os carbonos C-2 e C3, bem como dos sinais H-8 e 16 com os carbonos C-8 e C-16, considerando-se, obviamente, os respectivos sinais observados nos espectros de  $^1\text{H}$  e APT.



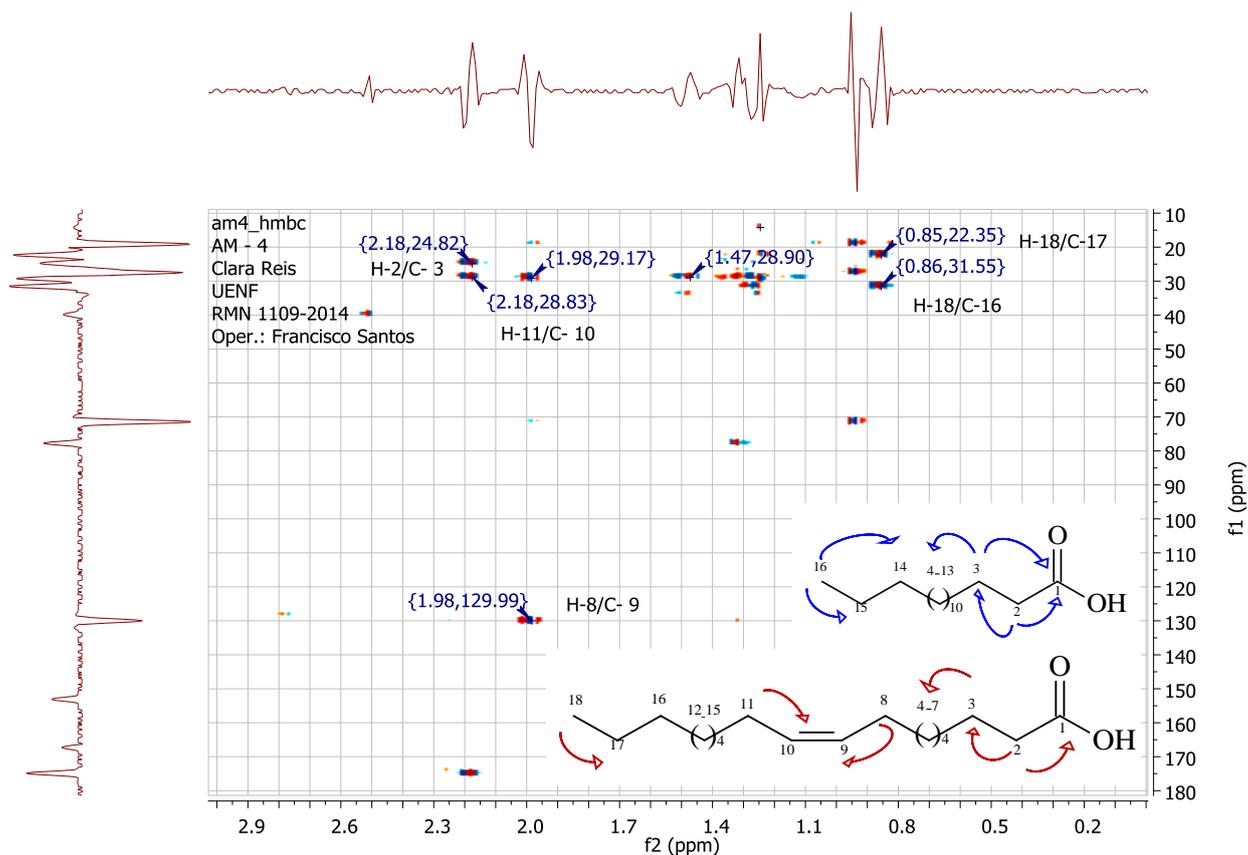
**Figura 52:** Espectro de RMN-2D HSQC para AM-3 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

### 5.5.3.3 HMBC

Por meio da análise das correlações a longa distância  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Figura 53) 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.

Pelo espectro de HMBC é possível correlacionar os sinais de H-2 com o C-3 e os sinais de H-8 com os carbonos C-9. É possível também observar a correlação do H-11 e H-18 com os C-10 e C-16, respectivamente. Essas correlações levam em consideração os sinais observados nos espectros de  $^1\text{H}$  e APT.

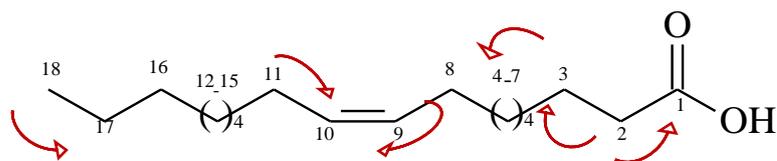
Assim, partindo da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar a correlação entre os sinais de  $^1\text{H}$  com  $^{13}\text{C}$  conforme Tabela 15.



**Figura 53:** Espectro de RMN-2D HMBC para AM-3 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

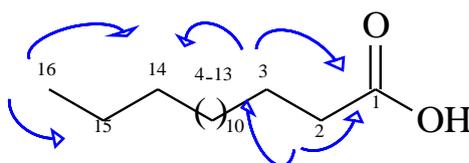
Assim, a Tabela 15 apresenta um resumo dos dados obtidos para a substância AM-3 (ácido oleico e palmítico) a partir das análises realizadas pela técnica de RMN em experimentos mono e bidimensionais, bem como uma comparação com dados encontrados na literatura.

**Tabela 15:** Sinais de carbono de AM-3 (ácido oleico e ácido palmítico) e suas correlações.



C	HSQC		HMBC		Literatura
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$^2J_{\text{H-C}}$	$^3J_{\text{H-C}}$	
1	-	174,9			
2	2,16 (2H; t; $J = 7,4$ Hz)	34,1	C-1; C-3		
3	1,46 (2H; m)	24,9	C-4	C-1	24,6
4-7	1,20-130 (8H; m)	28,9-29,5			29,5
8	1,96 (2H; m)	27,0	C-9		28,0
9	5,31(1H; t; $J = 4,7$ Hz)	130,1			130,4
10	5,31(1H; t; $J = 4,7$ Hz)	130,1			130,4
11	1,96 (2H; m)	27,0	C-10		28,0
12-15	1,20-130 (8H; m)	28,9-29,5			29,5
16	1,22 (2H; m)	31,7		C-18	32,8
17	1,29 (2H; m)	22,5			20,7
18	0,84 (3H; m)	14,38	C-17	C-16	

\* Lage, 2011; Egydio, 2009; dos Santos, 2008; Argondizo et al., 2007; Ritter, 2005; Correia, 2002.



C	HSQC		HMBC		Literatura
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$^2J_{\text{H-C}}$	$^3J_{\text{H-C}}$	
1	-	174,9			
2	2,16 (2H; t; $J = 7,4$ Hz)	34,0	C-1; C-3		
3	1,46 (2H; m)	24,9	C-4	C-1	24,6
4-13	1,20-130 (8H; m)	28,9-29,5			29,5
14	1,22 (2H; m)	31,7		C-16	32,8
15	1,29 (2H; m)	22,5			20,7
16	0,84 (3H; t; $J = 7,1$ Hz)	14,38	C-15	C-14	

\* Lage, 2011; Egydio, 2009; dos Santos, 2008; Argondizo et al., 2007; Ritter, 2005; Correia, 2002.

Os lipídeos são importantes substâncias de reserva nas plantas encontradas com a função de reserva energética para o embrião durante a germinação. Estão armazenados no protoplasma das células em inclusões denominadas oleossomos, que surgem do retículo endoplasmático (Egydio, 2009).

Quimicamente são, na maioria, misturas de triglicerídeos, ou seja, são formados por um triol, o glicerol, esterificado por ácidos graxos, os quais são ácidos carboxílicos alifáticos de comprimento variável. A imensa maioria de ácidos graxos vegetais está incluída em dois grupos: ácidos graxos saturados e seus homólogos insaturados. Em ambos os grupos, 16 ou 18 átomos de carbono são mais comuns, tais como os ácidos palmítico, oleico, linoleico e esteárico. Ácidos graxos saturados com menos de 12 átomos de carbono e ácidos insaturados com cadeias curtas ( $\leq C16$ ) ou de 20 carbonos ou mais são raros em plantas (Egydio, 2009).

Algumas espécies de *Annona* estudadas têm mostrado esta característica na composição dos triglicerídeos obtidos da polpa e das sementes (Wellé *et al.*, 2004), inclusive na espécie *Annona crassiflora*, o ácido oleico e palmítico já foram identificados na polpa. Já em *A. reticulata* e *A. squamosa* os ácidos oleico e palmítico foram identificados nas sementes (Joy & Sobhana, 2006).

De acordo com Solís-Fuentes *et al.* (2010) e Cerón *et al.* (2012), nas sementes de *Annona muricata* L. também já foram identificados tanto o ácido oleico quanto o ácido palmítico, sendo o ácido oleico encontrado de forma majoritária e em menores teores o ácido palmítico, dados estes que corroboram com os encontrados nesse trabalho. Estes ácidos graxos também já foram identificados nas folhas de *A. muricata* L. (Dorigoni, 2006). Todavia, não foi encontrada na literatura relato da identificação de ácidos graxos na polpa dos frutos de *A. muricata* L.

Vale a pena ressaltar que os ácidos graxos insaturados, particularmente o oleico, são mais susceptíveis aos processos oxidativos, pois podem ser oxidados por ação direta do oxigênio “singlet” formando peróxidos e hidroperóxidos. Logo, a ação de substâncias antioxidantes é importante para conservação do alimento e para prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Dorigoni, 2006).

Antioxidantes sintéticos são normalmente utilizados nas indústrias de óleos e derivados lipídicos. Todavia, estes compostos podem apresentar alguns

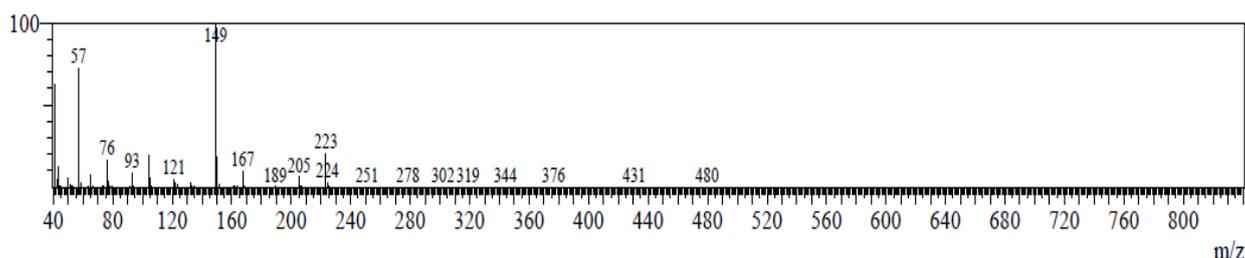
inconvenientes, tais como efeitos adversos em animais, como por exemplo hemorragia massiva nas cavidades pleurais e peritonais ou extensa proliferação das células do pulmão, com mudanças bioquímicas, atuando como agente promotor no desenvolvimento de adenoma. Devido a estes inconvenientes, há a preocupação de se obter substâncias naturais que tenham a mesma função (Dorigoni, 2006).

Dos ácidos graxos monoinsaturados, o ácido oleico, é o mais abundante e representa cerca de 40% das gorduras alimentares e, como não é sintetizado pelo organismo, é essencial na dieta. O consumo deste ácido graxo pode diminuir o LDL e o colesterol sérico e ainda não afetar os níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade) (Molkentin, 2000). Além disso, o ácido oleico não promove oxidação lipídica e nem diminui o HDL, sendo recomendado em dietas, pois exerce funções de proteção contra aterogênese (Sposito et al., 2007).

Já entre os ácidos graxos saturados se sobressai o ácido palmítico, o qual eleva a concentração plasmática de colesterol e de LDL, quando comparado à gordura poli-insaturada (Lottenberg, 2009). Logo, verifica-se a importância desses ácidos graxos na dieta.

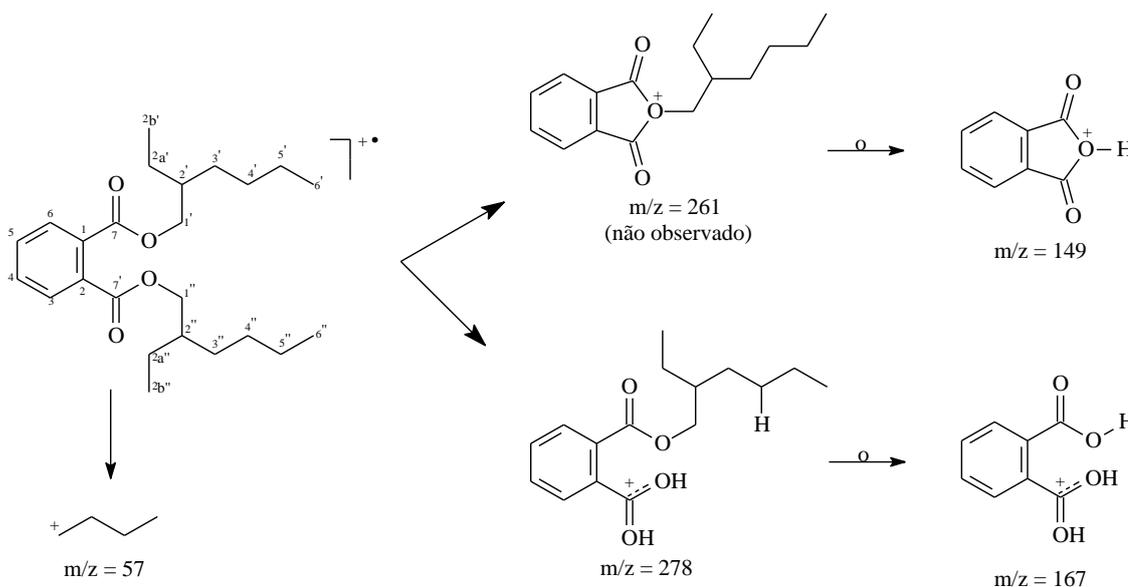
## 5. 6 Elucidação Estrutural de AM-4

Por sua vez, a substância AM-4 foi identificada na FB, subfração 100% metanólica. Verifica-se no espectro da substância AM-4 obtido por Espectroscopia de Massas (Figura 54) que o pico base é  $m/z$  149, o qual é pico base característico de todos os ftalatos. O íon  $m/z$  57 é característico de alcanos lineares (perda de  $C_2H_5$ , fragmentação alílica), o íon  $m/z$  76 indica a perda da ramificação e formação do íon benzílico (Côcco, 2008).



**Figura 54:** Espectro da substância AM-4 avaliado por CG-MS, faixa de aquisição de massa: 40-400u.

Conforme mostra a Figura 55, a fragmentação do íon  $m/z$  167 produziu, principalmente, um íon resultante das perdas de uma molécula de água ( $m/z$  149), enquanto que o íon  $m/z$  205 resulta da fragmentação dos anéis e o íon  $m/z$  223 corresponde a íons protonados de dietilftalato (Noronha, 2001).



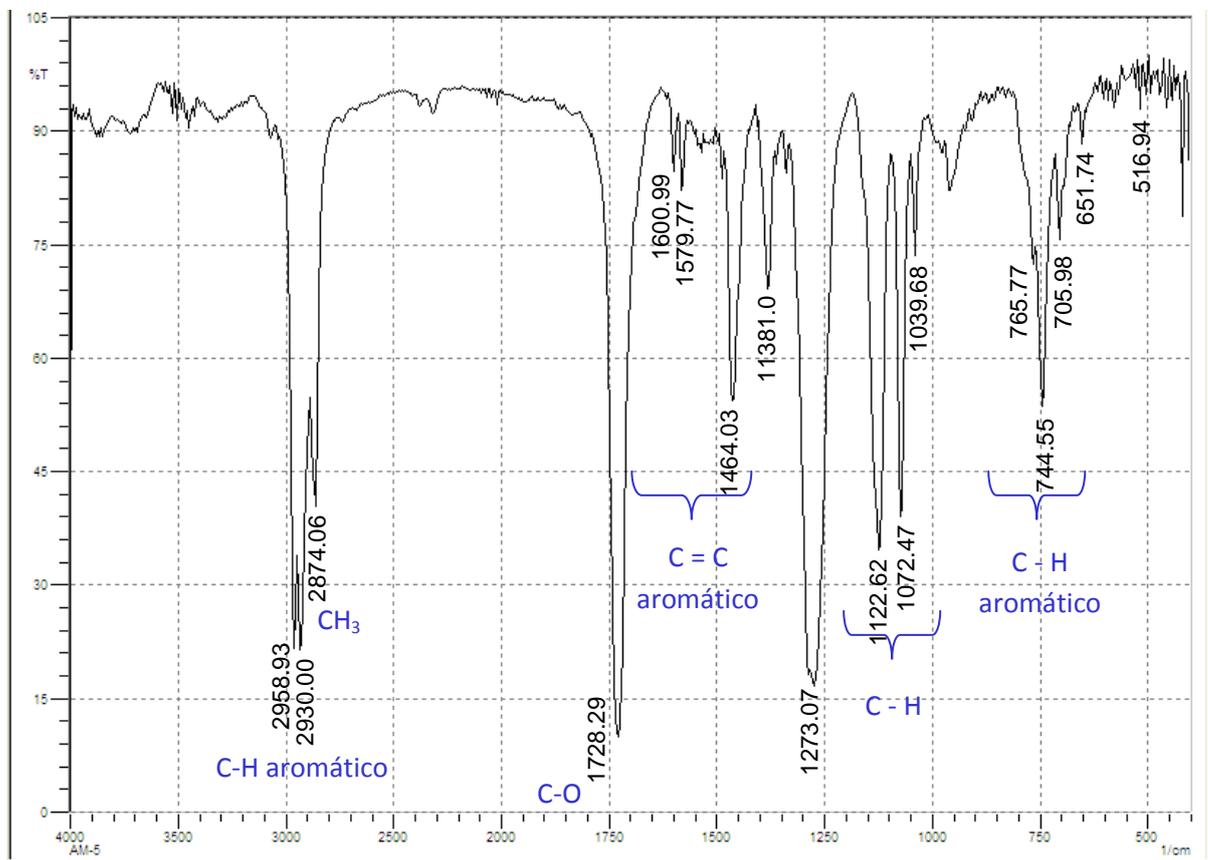
**Figura 55:** Proposta de rota de fragmentação para dietil-ftalato.

### 5.6.1 Infravermelho

No espectro da substância AM-4 (Figura 56) observa-se uma banda de absorção de aproximadamente  $1728,29 \text{ cm}^{-1}$ . Segundo Silverstein e Webster (1998), a absorção na região entre  $1850\text{-}1540 \text{ cm}^{-1}$  é indicativa do estiramento da carbonila alusivo à 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  $2500 \text{ cm}^{-1}$ ) (McMurry, 2005).

Os sinais em  $2958,93 \text{ cm}^{-1}$  e  $2930,00 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2874,06 \text{ cm}^{-1}$  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  $1464,03 \text{ cm}^{-1}$  e os picos de baixa intensidade  $1579,77 \text{ cm}^{-1}$  e  $1600,99 \text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento da ligação C = C (Silverstein e Webster, 1998).

O espectro de IV também apresenta vários picos na região entre  $705,98\text{ cm}^{-1}$  e  $765,77\text{ cm}^{-1}$ , os quais correspondem a C-H aromático fora do plano. 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.



**Figura 56:** Espectro de Infravermelho da substância AM-4.

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

### 5.6.2 Técnicas Monodimensionais

A substância AM-4 foi submetida à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

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

Primeiramente, analisou-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância AM-4 obtida em DMSO- $d_6$  (500 MHz) (Figura 57). Este espectro apresentou sinais ( $\delta_{\text{H}}$ ) correspondentes aos grupos metilênicos, metila e aromático.

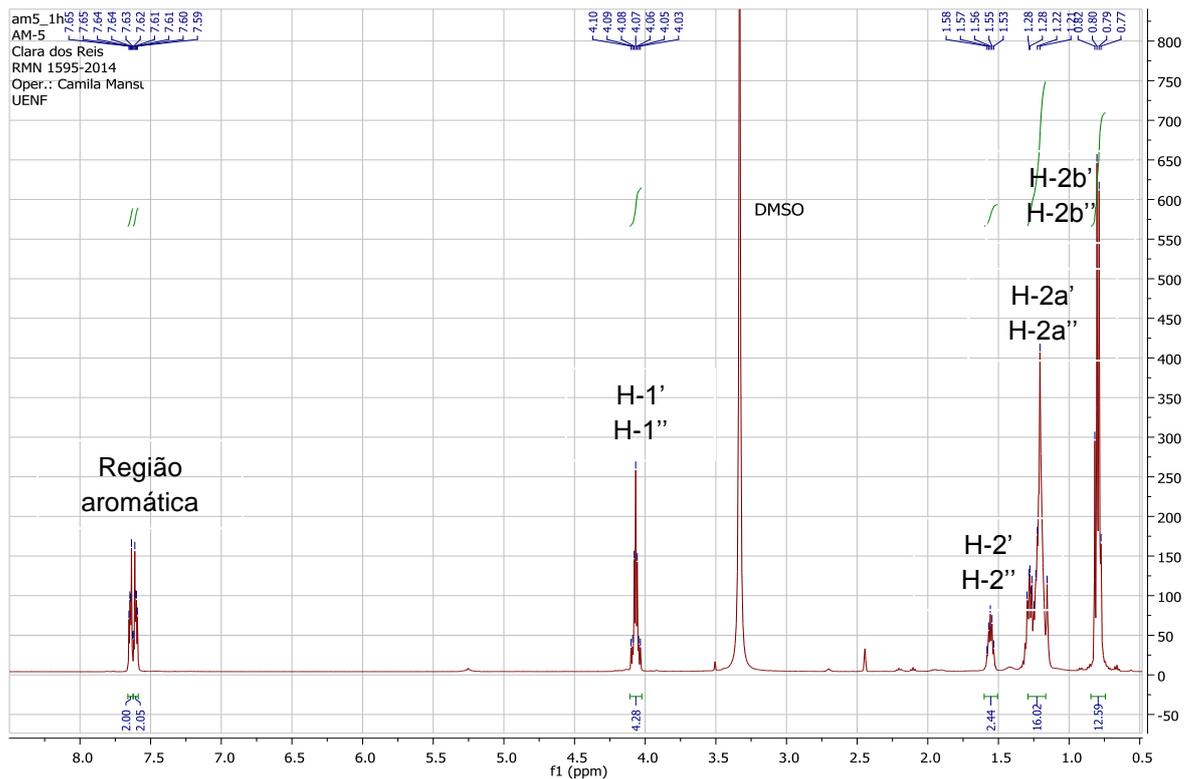
Na região do espectro correspondente aos núcleos aromáticos (6,00 - 8,00 ppm), pode-se observar a presença de dois sinais, sendo correspondentes a região do anel (7,64 e 7,61 ppm)(Mabry et al., 1970). Os sinais para os hidrogênios em 7,64 ppm correspondem aos sinais de H-3 e H-6, bem como o sinal em 7,61 se refere aos hidrogênios H-4 e H-5 aromáticos.

A Figura 58 mostra a expansão da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos, no qual se observa um duplo tripleto (dt) e um multipletto (m, 1H) na região do anel, sendo o sinais em 7,64 ppm (H-3, H- 6) com constante de acoplamento  $J = 7,1; 3,6$  Hz, 1H, indicando acoplamento em *orto* entre esses hidrogênios.

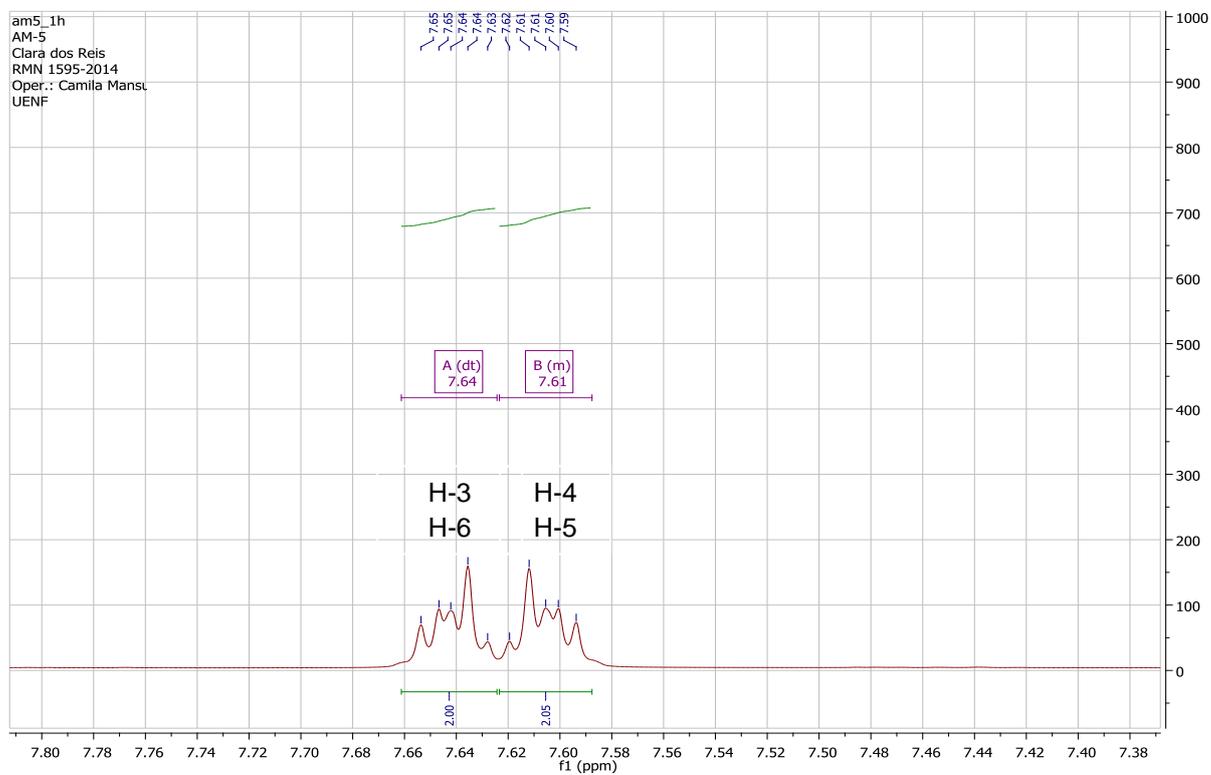
Na ampliação da região do sinal de 4,07 ppm (H-1' e H-1'') observa-se um multipletto (2H), sendo a região do espectro entre 4,0 e 4,5 ppm correspondente ao grupo éster aromático (Figua 58). A região entre 3,0 e 4,5 ppm também está associada a prótons em C  $sp^3$  diretamente ligados a átomo eletronegativo (mcMurry, 2005).

Na região do espectro correspondente ao deslocamento químico entre 0,7 e 2,4 ppm, referente a hidrogênios de grupos metílicos e metilênicos, alguns sinais foram observados e se pode destacar para essa porção alifática da molécula a presença de um duplo tripleto em 1,56 ppm, com  $J = 12,0; 5,9$  Hz, 1H, o qual corresponde aos hidrogênios H-2' e H-2'', um multipletto no sinal em torno de 1,21 ppm (8H), o qual corresponde aos hidrogênios H-2a' e H-2a'' e um quadupletto em 0,80 ppm com  $J = 7,2$ Hz, 6H, o qual corresponde aos hidrogênios H-2b' e H-2b'' (Argondizo et al., 2007).

Os sinais de  $^1\text{H}$  encontrados (Tabela 16) foram comparados com os dados na literatura, porém não permitiram identificar a estrutura (Argondizo et al., 2007; Araújo & Chaves, 2005; Correia, 2002).



**Figura 57:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AM-4 (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



**Figura 58:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AM-4 (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ), com a expansão da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos.

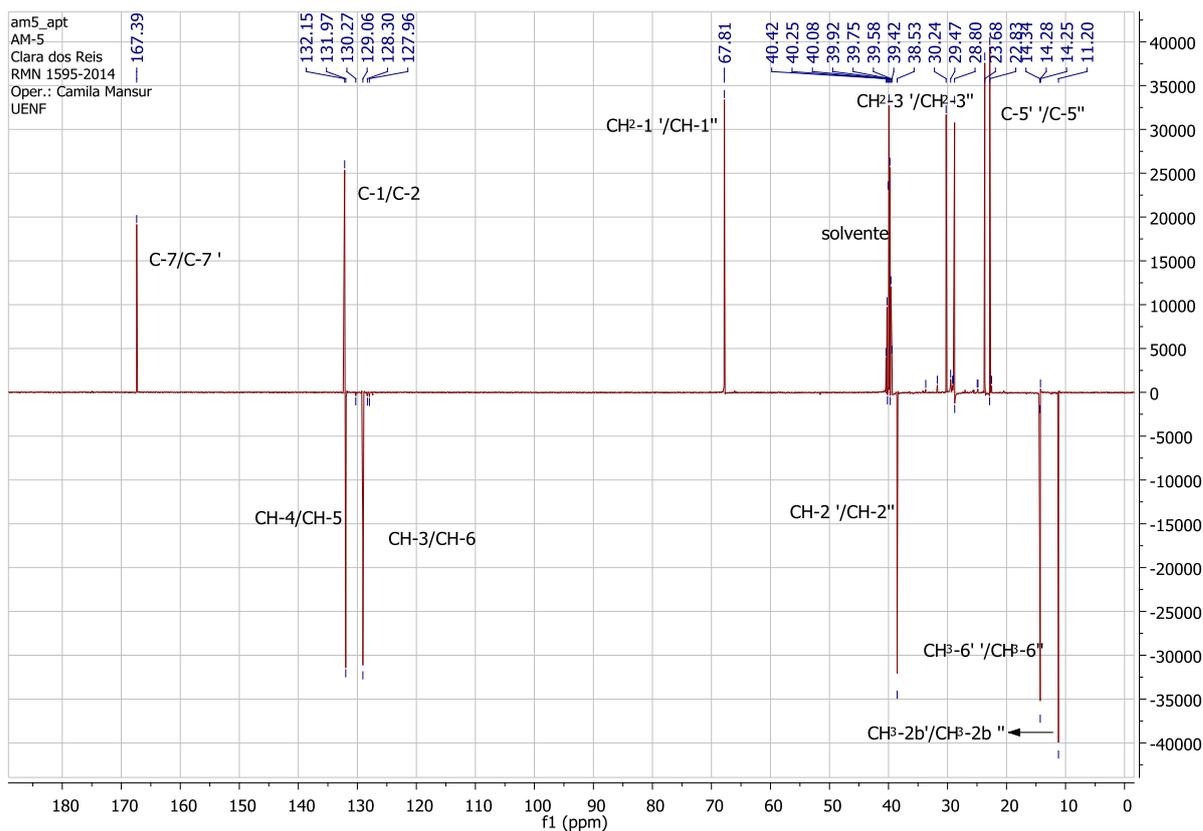
**Tabela 16:** Sinais de  $^1\text{H}$  listados para a substância AM-4.

$\delta_{\text{H}}$ AM-4 (DMSO- $d_6$ )
H-3 e H-6 (7,64; dt; $J = 7,1; 3,6$ Hz, 1H)
H-4 e H-5 (7,61; m; 1H)
H-1'e H-1'' (4,07; m; 2H)
H-2'e H-2'' (1,56; dt, $J = 12,0, 5,9$ Hz, 1H)
H-2a'e H-2a'' (1,21; m, 4H)
H-3'e H-3'' (1,28; m, 4H)
H-2b'e H-2b'' (0,80; q, $J = 7,2$ Hz, 6H)

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

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  forneceu 13 sinais, o qual corrobora com o espectro obtido pela técnica de APT (Figura 59). O sinal em 132,1 corresponde aos carbonos C-1 e C-2, o sinal 130,2 corresponde aos carbonos C-4 e C-5, e o sinal em 128,3 corresponde aos carbonos C-3 e C-6, sendo estes sinais referentes a carbonos de compostos aromáticos, sugerindo a existência de um grupo aromático substituído (Sikinai, 2012; Marchese, 2009; Argondizo et al. 2007).

Este espectro apresenta apenas 12 carbonos, o que confirma ser esta uma molécula que possui duas partes idênticas, ocorrendo simetria, como imagem espelhada.



**Figura 59:** Espectro de RMN APT de AM-4 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

Observa-se um sinal mais protegido do espectro em 11,2 e outro em 14,2, o que indica a presença de um grupamento metil em C-2b' e C-2b'', bem como em C-6' e C-6'', respectivamente. O sinal 14,2 ppm indica um metil simples terminal e é atribuído ao C-6' e C-6''. Da mesma forma, o sinal 11,2 ppm indica um metil simples terminal e é atribuído ao C-2b' e C-2b''.

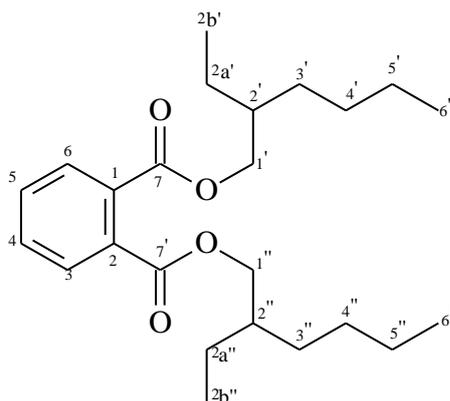
A ocorrência de um grupo éster foi indicada pelo sinal mais desprotegido do espectro listado em 167,3 ppm, atribuído ao carbono carbonílico e que corresponde ao C-7 e C-7' (McMurry, 2005; Argondizo et al., 2007).

Os sinais de 67,8 ppm, 30,2 ppm e 23,6 ppm foram atribuídos aos carbonos C-1' e C-1'', C-3' e C-3'' e C-5' e C-5'', respectivamente. Os carbonos 2' e 2'' apresentam seu sinal em 38,5 ppm (Argondizo et al., 2007).

Por sua vez, o carbono 1 do anel encontra-se ligado ao éster e o carbono 4' e 4'' aparece na região de 22,8 ppm. A Tabela 17 mostra os sinais encontrados para AM-4, bem como compara os sinais de  $^{13}\text{C}$  do espectro obtido com os sinais encontrados na literatura (Marchese, 2009; Argondizo et al. 2007; Araújo e Chaves,

2005; Correia, 2002), além de apresentar as correlações verificadas pelas análises bidimensionais.

Portanto, os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  sugerem se tratar de uma molécula simétrica, dietil-ftalato ( $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ ), como mostra a Figura 60. Entretanto, para confirmar a elucidação dessa molécula identificada na fração butanólica, foram empregadas técnicas bidimensionais.

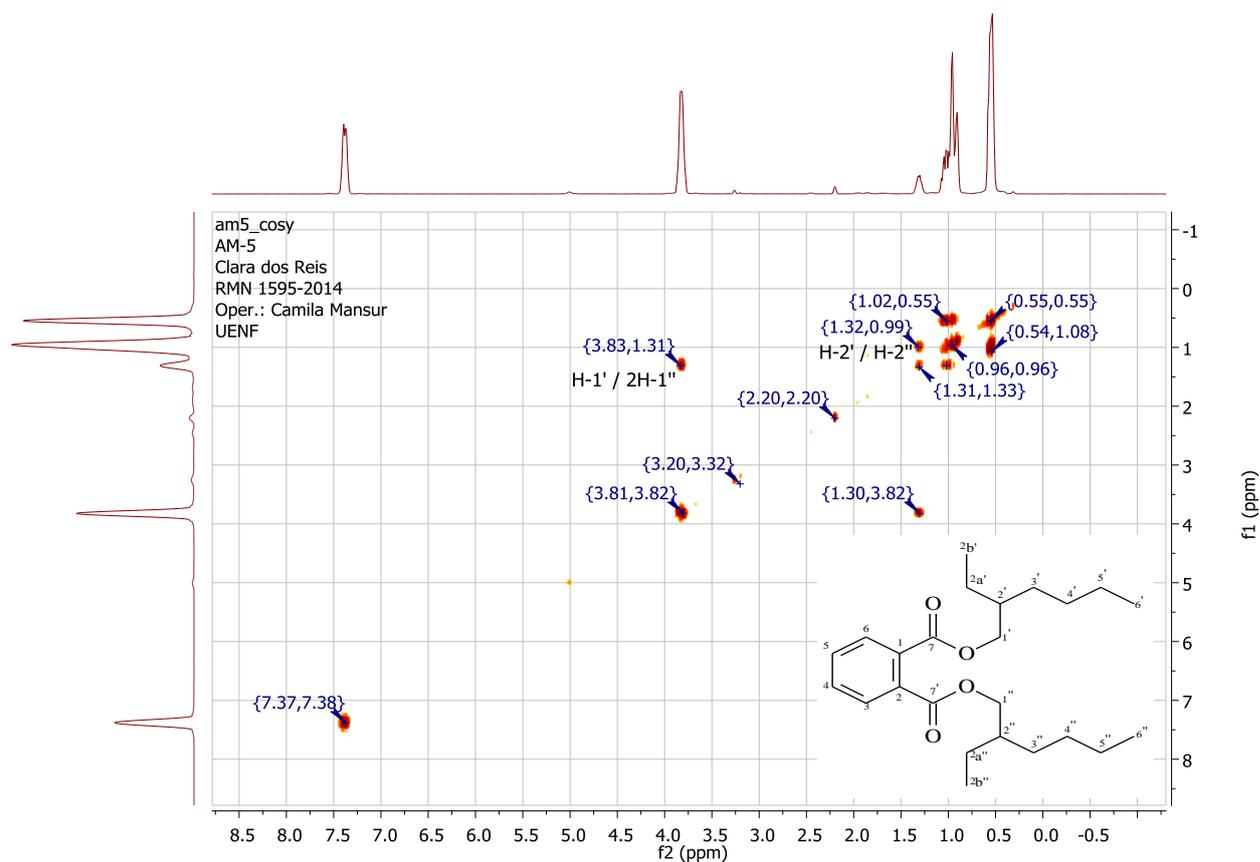


**Figura 60:** Estrutura química da molécula dietil-ftalato identificada na fração butanólica.

### 5.6.3 Técnicas Bidimensionais

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

A partir da análise do COSY foi possível identificar a correlação entre os hidrogênios vizinhos. É possível verificar pelo espectro a correlação entre o H-1' e H-1'' e a correlação entre H-2' e H-2''. A Figura 61 mostra o espectro de COSY  $^1\text{H}$  - $^1\text{H}$  com essas correlações.



**Figura 61:** Espectro de RMN 2D- COSY para AM-4 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

### 5.6.3.2 HSQC

Com base nos dados do espectro de HSQC 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 identificada possuem hidrogênio a eles ligado.

Assim, pelo espectro de HSQC é possível correlacionar os sinais de H-6' e H-6'' com os carbonos C-6' e C6'', além de se observar também a correlação entre os sinais de H-2b' e H-2b'' com os carbonos C-2b' e C2b'' ou seja, a correlação dos hidrogênios e carbonos ligados diretamente a eles.

Essas correlações e deslocamentos podem ser observadas nas Figuras 62 e 63, a qual mostra em expansão o espectro de HMQC para AM-4.

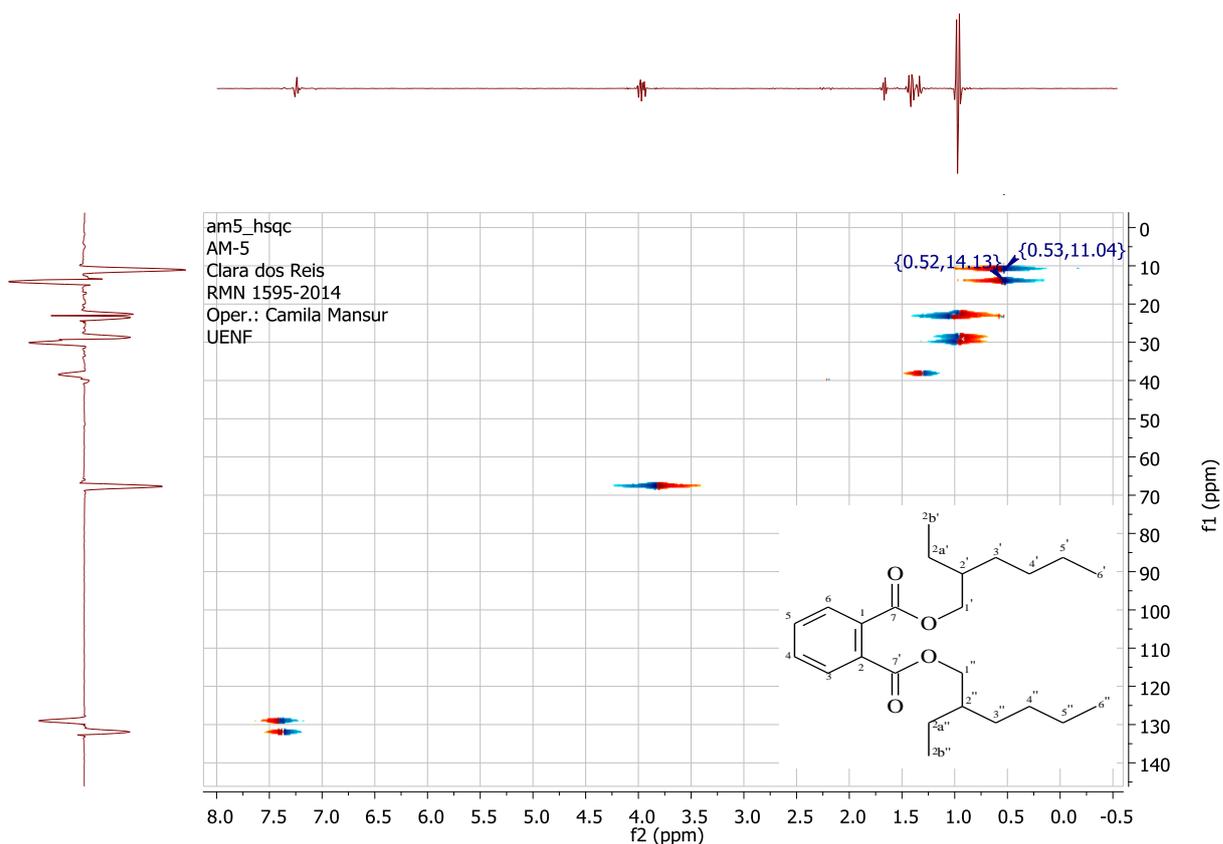


Figura 62: Espectro de RMN-2D HSQC para AM-4 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

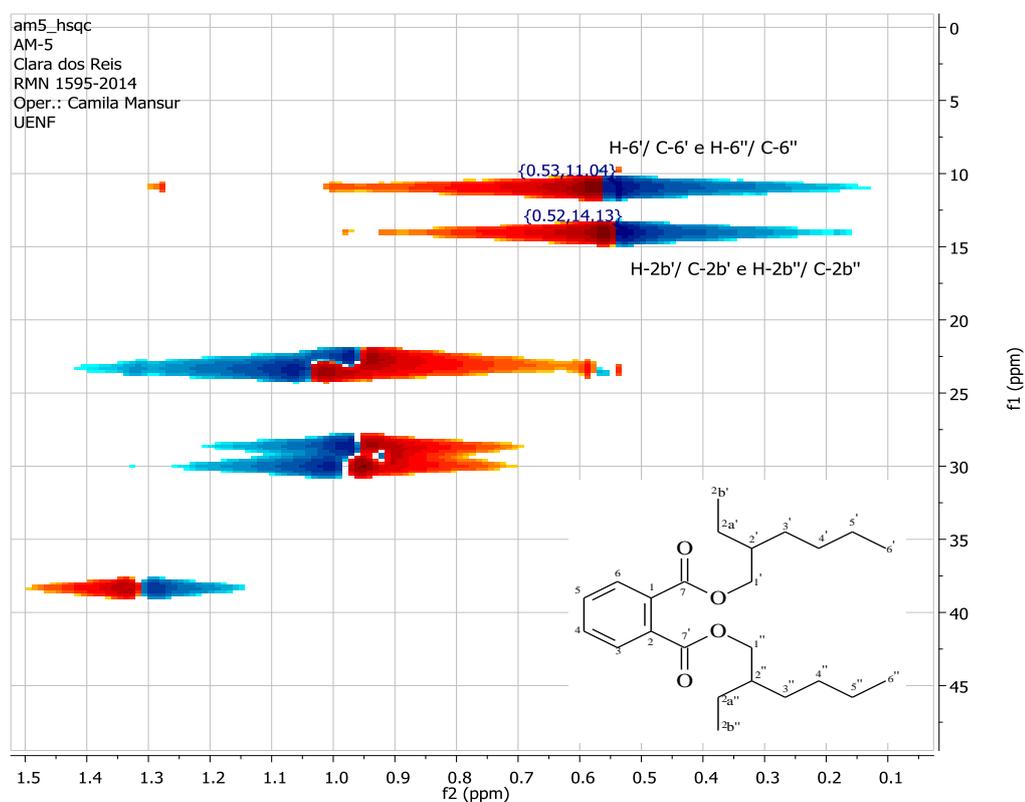


Figura 63: Expansão do espectro de RMN -2D HSQC para AM-4 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

### 5.6.3.3 HMBC

Por meio da análise das correlações a longa distância  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Figura 64) 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. A partir da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar a correlação entre os sinais de H-2' e H-2'' com os carbonos C-1' e C-1'', bem como a correlação entre os sinais de H-2a' e H-2a'' com os carbonos C-1a' e C-1a'' e a correlação entre H-2b' e H-2b'' com os carbonos C-2b' e C-2b''.

Foi possível verificar também os H-5' e H-5'' em correlação com os carbonos C-6' e C-6'', bem como os H-6' e H-6'' com os carbonos C-4' e C-4''. Os sinais de H-6' e H-6'' também se correlacionam com os carbonos C-5' e C-5''. Além disso, o H-1' se relaciona com o C-3', C-2a' e C-2', bem como o H-1' se relaciona com o C-3'', C-2a'' e C-2''.

Logo, 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 17.

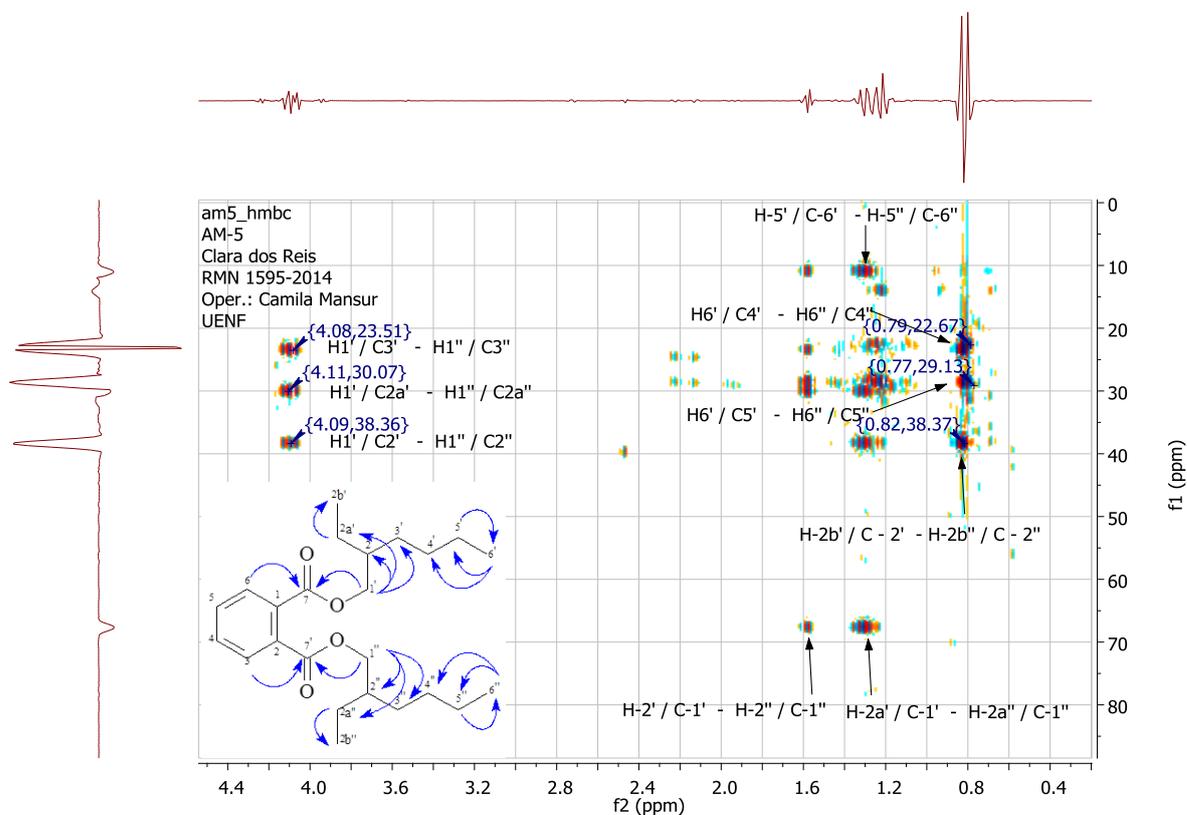


Figura 64: Espectro de RMN-2D HMBC para AM-4 (500 MHz; DMSO- $d_6$ ).

Assim, a Tabela 17 apresenta um resumo dos dados obtidos para a substância AM-4 (dietil-ftalato) a partir das análises realizadas pela técnica de RMN em experimentos mono e bidimensionais, bem como uma comparação com dados encontrados na literatura.

**Tabela 17:** Sinais de carbono de AM-5 e suas correlações.

C	HSQC		HMBC		Literatura*
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$^2J_{\text{H-C}}$	$^3J_{\text{H-C}}$	$\delta^{13}\text{C}$
1 e 2	-	132,1			132,0
3 e 6	7,64 (2H; m)	128,3		C-7 ; C-7'	128,1
4 e 5	7,61 (2H; m)	130,2			130,4
1' e 1''	4,07 (4H; m)	67,8	C-2'; C-2''	C-7; C-7'; C2a'; C2a''; C-3'; C3''	67,6
2' e 2''	1,56 (2H; m)	38,5	C1'; C1''		38,7
2a' e 2a''	1,21 (4H; m)	28,8	C2b'; 2b''	C1'; C1''	29,5
2b' e 2b''	0,80 (6H; m)	11,2		C-2'; C-2''	11,7
3' e 3''	1,28 (4H; m)	30,2			29,6
4' e 4''	1,21 (4H; m)	22,8			25,8
5' e 5''	1,21 (4H; m)	23,6	C6'; C6''		24,6
6' e 6''	0,79 (6H; m)	14,2	C-5'; C-5''	C-4'; C-4''	14,1
7 e 7'	-	167,4			167,6

\* Radonić et al., 2011; Rakkestad et al., 2010; Marchese, 2009; Argondizo et al., 2007; Raya, 2005; Ritter, 2005; Correia, 2002.

A correlação entre o H-1' e C-7 e H-1'' e C-7' é constatada pelo HMBC, bem como a correlação entre o  $\delta_{\text{H}}$  0,80 ppm com  $\delta_{\text{C}}$  38,5 ppm confirma que o sinal de 0,80 ppm foi corretamente atribuído à metila 2b'.

A partir de buscas na literatura foi possível verificar a existência do dietil-ftalato, o qual está geralmente associado aos plastificantes, bem como é usado como aditivo em tintas, adesivos, corantes, etc. O dietilftalato pertence à classe dos ftalatos, os quais são ésteres produzidos e utilizados pela indústria química, dentre outras aplicações, para impor flexibilidade a cloretos de polivinila (PVC). Devido ao grande uso dos ftalatos, eles se tornaram muito presentes no meio ambiente e pessoas estão constantemente expostas a eles (Rakkestad et al., 2010). Nos últimos

anos, devido ao amplo uso dos ftalatos, grande atenção tem sido dada ao seu potencial tóxico, visto que esse composto tem potencial de acumulação em plantas, além de ser tóxico para organismos do solo (Schneider & Mühlen, 2011).

Interesantemente, ftalatos nas suas mais diversas formas têm sido isolados de extratos de plantas e algas (Radonić et al., 2011; Srinivasan et al., 2008; Aziz-Ur-Rehman et al., 2004; Cakir et al., 2003). Não há registros quanto ao isolamento de algum ftalato no gênero *Annona*. O papel dessas moléculas na planta ainda é desconhecido, porém especula-se que a presença delas seja através de sua absorção do meio ambiente, seja da atmosfera, do solo ou da irrigação (Mavar-Manga et al., 2008). Contudo, não se podem descartar contaminações durante o processo de purificação, que podem ocorrer por meio da utilização de solventes, recipientes e sacos plásticos para estocagem da amostra, uma vez que ftalatos estão presentes na constituição de todos esses objetos (Drake et al., 2009). Porém, vale ressaltar que estas amostras foram identificadas com solvente grau UV/HPLC (TEDIA) e acondicionadas durante todo o processo em frascos de vidro.

## 5.7 Atividades Antineoplásicas

O experimento para avaliação do efeito citotóxico dos compostos foi realizado através do microensaio colorimétrico utilizando 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 (Barbosa, 2009; Bernas et al., 2002; Mosmann, 1983).

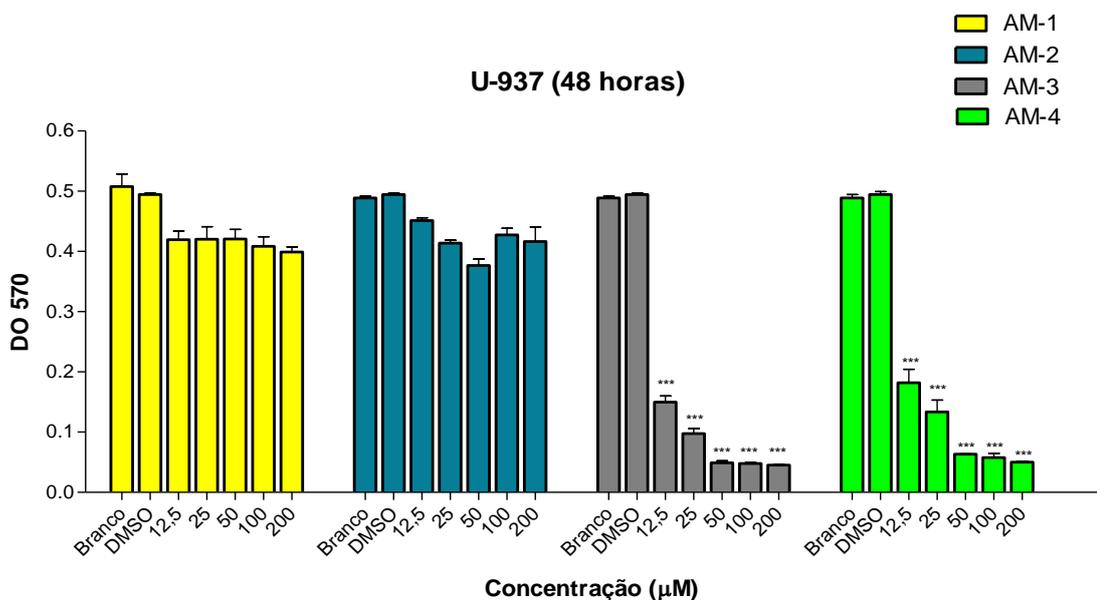
Como *screening* inicial, a viabilidade das linhagens U937 e THP-1 foi avaliada frente ao extrato aquoso (GS), sobrenadante (GSS) e frações (FH, FAcEt e FB), pois como se trata de um estudo bioguiado era necessária essa perspectiva para se conduzir os processos de fracionamentos e purificações.

Para ambos os tipos celulares analisados observou-se que houve morte celular. Nas células U937 o melhor resultado foi obtido com a fração FH, como evidencia sua  $EC_{50}$  ( $41,96 \pm 1,66$ ) e para a célula THP-1, o melhor resultado obtido também foi para a fração FH, a qual também obteve o menor  $EC_{50}$  ( $257,3 \pm 1,59$ ), sendo esta a concentração necessária para matar 50% das células. Todavia, os

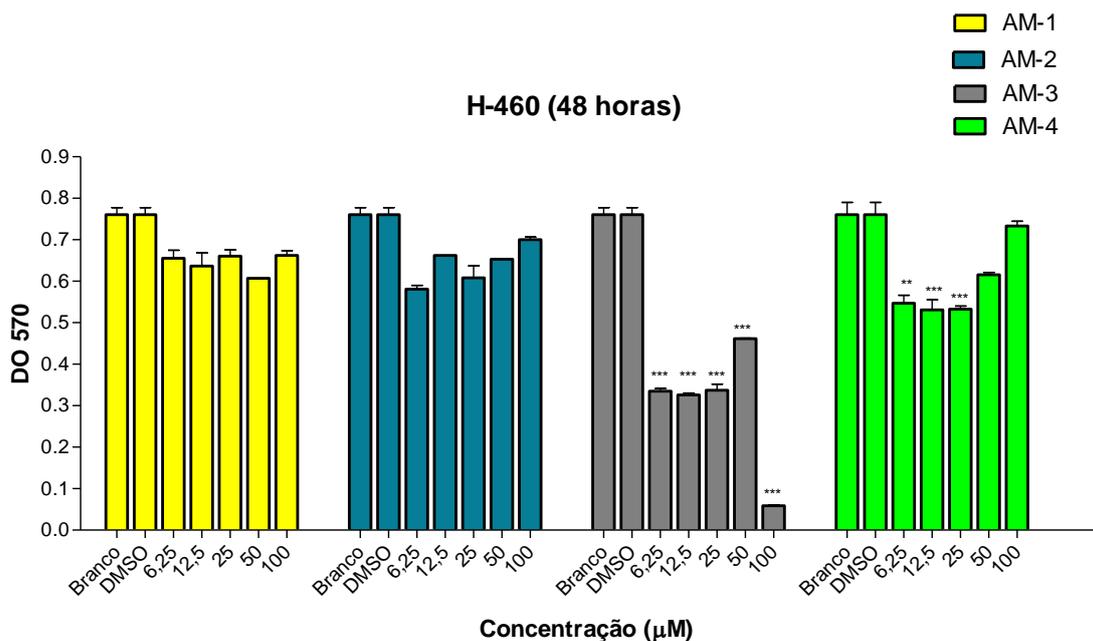
percentuais de morte celular não foram significativos nas concentrações analisadas (12,5; 25; 50; 100; 200 e 400  $\mu\text{g}$ ), havendo mínima diferença de variação no índice de morte celular entre as concentrações.

Como não havia massa suficiente para a purificação das substâncias da FH, foram selecionadas as FAcEt e FB para a continuação dos processos cromatográficos que conduzissem ao isolamento de substâncias.

Mediante à identificação das substâncias AM-1, AM-2, AM-3 e AM-4 advindas das FAcEt e FB, estas foram avaliadas quanto à sua atividade antineoplásica, tanto nas células U-937 (visto que se sobressaiu em relação às células de linhagem THP-1) quanto em células H-460 (Figura 65 e 66).



**Figura 65:** Avaliação da viabilidade celular da linhagem leucêmica U937, pelo ensaio de MTT ( $n=3$ ), após 48 horas de incubação com as substâncias AM-1, AM-2, AM-3 e AM-4. O branco significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ , valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (branco).



**Figura 66:** Avaliação da viabilidade celular da linhagem carcinoma de pulmão H-460, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias AM-1, AM-2, AM-3 e AM-4. O branco significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (branco).

Das 4 substâncias identificadas, apenas duas (AM-3 e AM-4) possuem atividade biológica antitumoral provocando a morte celular nas linhagens testadas. Foi feito um *screening* (dados não mostrados) e esta atividade foi observada também nas frações que originaram AM-3 e AM-4, sendo que durante o processo de purificação houve a intensificação do efeito biológico de morte celular, observado pelos valores de EC<sub>50</sub>.

Observa-se que AM-3 reduziu a viabilidade celular de maneira concentração dependente, sendo esta redução mais efetiva para as células humanas de linfoma histiocítico (U-937) do que para as células de carcinoma de pulmão (H-460). Não obstante, foi verificada sua ação na diminuição na viabilidade celular para ambos os tipos celulares: U-937 (EC<sub>50</sub> 15,19 ± 1,39 µM). A substância AM-4 também foi capaz de inibir o crescimento da linhagem U-937 de maneira concentração dependente (EC<sub>50</sub> 9,20 ± 1,11 µM), como mostra a Tabela 18.

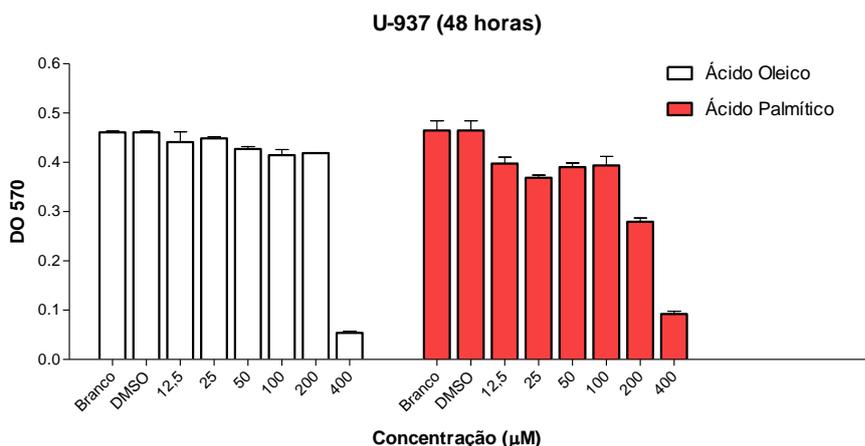
**Tabela 18:** Valores de  $EC_{50}$  para a atividade antineoplásica de AM-1, AM-2, AM-3 e AM-4 frente às células tumorais de linhagem H-460 e U-937.

<b>Compostos</b>	<b>H-460 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>U-937 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
AM-1	>100	>200
AM-2	>100	>200
AM-3	-	7,67 $\pm$ 1,12
AM-4	>100	9,20 $\pm$ 1,11
Doxorrubicina (controle positivo)	>100	2,25 $\pm$ 1,03
Doxorrubicina (controle positivo)	>100	2,25 $\pm$ 1,03

Sendo a substância AM-3 identificada como uma mistura de ácido oleico e ácido palmítico, foi investigado se a sua atividade antitumoral advinha do ácido palmítico ou oleico empregando-se padrões para cada um destes ácidos graxos, devido à massa insuficiente de AM-3 para esta averiguação.

Analisando-se células U-937, que foi a que apresentou maior percentual de morte celular, verificou-se que tanto o ácido oleico quanto o ácido palmítico provocam morte celular (Figura 67), sendo o ácido palmítico o que mais inibiu a viabilidade celular ( $EC_{50} = 222,2 \pm 1,11\mu\text{M}$ ). Todavia, essa redução da viabilidade celular observada não ocorre na mesma intensidade com que foi observada em AM-3 ( $EC_{50} = 7,67 \pm 1,12$ ).

É plausível que estas moléculas possam estar atuando em sinergismo e devido a este fato sua atividade antineoplásica seja mais significativa em AM-3 do que a que foi verificada empregando-se os padrões isoladamente.



**Figura 67:** Avaliação da viabilidade celular da linhagem leucêmica U-937, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com os padrões ácido oleico e palmítico. O branco significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (branco).

O ácido palmítico (16:0) pode ser alongado para ácido esteárico (18:0). Este ácido graxo com 18 átomos de carbono é muito importante para a síntese de ácidos graxos insaturados pois é pela introdução de uma dupla ligação entre os átomos de carbonos 9 e 10 catalisada pela enzima  $\Delta$ -9 desaturase que o ácido esteárico é convertido em ácido oleico (Moreira et al., 2002).

Nozaki (2012) afirma que os ácidos graxos essenciais devem ser consumidos em quantidades adequadas na alimentação e sua utilização traz benefícios à saúde de indivíduos, tais como, prevenção de doenças como câncer, doenças imunológicas e cardiovasculares, além do fato de que os ácidos graxos essenciais também apresentam sinergismo com fármacos antitumorais.

Estudos vêm sendo conduzidos no intuito de tentar compreender o mecanismo pelo qual, as moléculas conhecidas como ácidos graxos poli-insaturados conseguem inibir a proliferação de células tumorais de gliomas (neuroglioma) - tumor do sistema nervoso central desenvolvido a partir das células gliais - e outros cânceres cerebrais. O maior entendimento desse processo poderá levar à identificação de alvos para a produção de novos fármacos antitumorais (Larsson et al., 2004).

Uma das funções mais importantes dos ácidos graxos poli-insaturados está relacionada à sua conversão enzimática em eicosanoides que modulam respostas tanto inflamatórias quanto imunológicas, agregação de plaquetas, crescimento celular e diferenciação celular. A produção de eicosanoides a partir dos ácidos graxos poli-insaturados depende da ação de cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX). Em suma, o suposto mecanismo principal por meio do qual os ácidos graxos poli-insaturados reduzem o risco de câncer leva à supressão da biossíntese pró-proliferativa de eicosanoides derivados de ácido araquidônico (Larsson et al., 2004).

Em pesquisa recente realizada por Taborda et al. (2013) evidencia-se que a inserção de uma cadeia graxa contendo as cadeias palmítica e oleica por modificação estrutural em um determinado composto exhibe excelente diminuição da viabilidade celular de células de glioma.

Os relatos quanto a atividade tumoral de ácido graxo para *Annona* se restringem a uma classe de compostos derivada de ácidos graxos alifáticos de cadeia longa exclusiva da família Annonaceae, a qual têm sido extensamente estudada, chamada acetogeninas, as quais possuem atividade antineoplásica já registradas na literatura, inclusive para a espécie *Annona muricata* L. (Lima et al., 2012; Souza, 2009; Liaw et al., 2005; Ferelli et al., 2005).

Embora de origens e causas ainda não muito esclarecidas, as neoplasias surgem devido a mutações genéticas, espontâneas ou induzidas por agentes patogênicos, como metais, radiações, radicais livres do oxigênio, inflamações crônicas e xenobióticos (cigarro, álcool, pesticidas, etc), dentre outros, os quais promovem desordens no ciclo celular ocasionando excesso nas taxas de proliferação e deficiência nas taxas de morte celular, o que culmina com a formação de agrupamentos de clones de células neoplásicas, os tumores. O principal grupo de agentes indutores da carcinogênese é representado pelas espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, outros radicais livres e produtos da peroxidação lipídica que provocam várias injúrias celulares e nucleares. Estudos têm comprovado que há uma forte associação entre o consumo de frutas e verduras e o risco de diversos tipos de cânceres e outras causas de morbi-mortalidade. Assim, o homem há várias décadas vem identificando compostos presentes em alimentos para testá-los como possíveis agentes anticarcinogênicos (Ferrari & Torres, 2002).

Contudo, na verdade, não são os compostos isolados e ingeridos sob a forma de suplementos que podem diminuir o risco de câncer, mas sim uma dieta rica em

substâncias anticarcinogênicas, incluindo novos compostos recentemente isolados, que ainda se encontram em estudo pelo homem. Os alimentos contendo agentes para a quimioprevenção do câncer constituem um dos principais grupos de alimentos com propriedades funcionais (Ferrari & Torres, 2002).

O efeito funcional de um alimento abrange não somente aqueles que, além do enfoque nutricional, exercem ações promotoras para o bom funcionamento do organismo, mas qualquer alimento ou ingredientes alimentares benéficos para o funcionamento orgânico. A literatura referencia alguns critérios 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 (Perin & Zanardo, 2013; Padilha & Pinheiro, 2004).

Dentre os principais alimentos funcionais encontram-se os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (n-3). Neste contexto, entre as prioridades desta área de pesquisa emergem a prevenção do câncer e a utilização de alimentos funcionais como compostos quimiopreventivos e antioxidantes (Padilha & Pinheiro, 2004).

Na abordagem ao câncer de mama merecem destaque os ácidos graxos poli-insaturado ômega 3 (n-3) e linoleico conjugado, as fibras, algumas vitaminas e minerais, e os fitoquímicos. Evidências científicas sugerem o papel promotor da gordura dietética no desenvolvimento do câncer de mama, por exemplo, correlacionando o consumo excessivo de gordura com o aumento dos índices desta neoplasia, especialmente na pós-menopausa, onde há maior correlação entre o teor de gordura da dieta e os níveis séricos de estradiol. A maioria dos estudos sugere que a associação entre câncer e gordura é mais dependente do tipo de gordura consumida do que da ingestão total desta, visto que os ácidos graxos ômega 6, por exemplo, estimulam o processo carcinogênico, enquanto que os ácidos graxos ômega 3 inibem a neoplasia (Padilha & Pinheiro, 2004).

Por outro lado, nos últimos anos, devido ao amplo uso dos ftalatos, grande atenção tem sido dada ao seu potencial tóxico. De fato, as plantas podem absorver ftalatos do ambiente e integrá-los em seu metabolismo. A população, por sua vez, acaba por consumir a espécie com tal contaminação, o que pode trazer malefícios e benefícios.

De acordo com Tsukahara et al. (2005) e Xu & He (2010), o acréscimo de radicais ftálicos potencializa a atividade apresentada por determinadas moléculas extraídas de produtos naturais. Em concordância, Silva (2007) afirma que várias modificações moleculares têm sido propostas para aumentar a potência de um composto original antineoplásico por meio de simples substituições ou adição de grupamentos ftalatos.

Interessantemente os ftalatos nas suas mais diversas formas têm sido isolados e identificados de fontes naturais como vegetais (Radonić et al., 2011; Srinivasan et al., 2008; Aziz-Ur-Rehman et al., 2004; Cakir et al., 2003) e micro-organismos (Santos, 2012; Nguyen et al., 2007; Ruan et al., 2006). Além disso, óleos essenciais que apresentam entre os componentes majoritários éster ácido ftalato (95.6%) também foram descritos (Srinivasan et al., 2009). Amade et al. (1993) isolaram uma linhagem de *Penicillium olsonii* associados a organismos marinhos e também isolaram de seu extrato dietilftalato e avaliaram seu potencial no fator de agregação de células e no uso de estudos de fosforilação oxidativa mitocondrial.

O papel dessas moléculas na planta ainda é desconhecido, porém especula-se que a presença delas seja através de sua absorção do meio ambiente, seja da atmosfera, do solo ou da irrigação (Mavar-Manga et al., 2008). Entretanto, não se podem descartar a hipótese de contaminações durante o processo de purificação, a qual pode ser resultante do uso de solventes, recipientes e sacos plásticos para estocagem da amostra, uma vez que ftalatos estão presentes na constituição de todos esses objetos (Santos, 2012).

Apesar dos efeitos tóxicos induzidos pelos ftalatos, tais moléculas quando extraídas de plantas apresentaram ação de interesse farmacológico, como atividade antiviral e bactericida (Rameshthangam & Ramasamy, 2007), atividade microbicida (Rizwan et al., 2012; Zellagui et al., 2012), e inibição de melanogênese em células B16F10 (Nguyen et al., 2007). Além disso, a atividade anti-inflamatória induzida por ftalatos isolados de plantas também têm sido demonstrada (Li et al., 2012; Mavar-Manga et al., 2008; Shimizu & Tomoo, 1994).

Pelo seu grande uso, os ftalatos têm sido muito pesquisados pelo seu impacto ambiental, já que se encontram disseminados em todos os ecossistemas do mundo (Loureiro, 2002). A possibilidade de impactos adversos em seres humanos e outros seres vivos, causando interferência no funcionamento normal do sistema endócrino

também vem recebendo especial atenção nos últimos anos (Rocha & Barbosa, 2014; Ferreira & Morita, 2010).

Os ftalatos de elevada massa molecular são considerados teratogênicos e causam danos ao fígado, rins e órgãos reprodutivos, bem como disfunções endócrinas. De fato, os ftalatos agem de forma distinta em diferentes órgãos interferindo no metabolismo de lipídios (Bell, 1982). Os efeitos diferem também conforme a idade do indivíduo, sendo neonatos os mais sensíveis (Vetrano et al., 2010). Além disso, essas moléculas prejudicam o desenvolvimento embrionário em seus estágios iniciais (Grossman et al., 2012), com o avanço da gestação, os ftalatos atravessam a placenta e prejudicam o desenvolvimento das gônadas diminuindo a produção de testosterona (Xi et al., 2011). Outros efeitos têm sido descritos como a participação dessas moléculas em processos de tumorigênese (Wang et al., 2012), obesidade (Hao et al., 2012) e asma (Guo et al., 2012).

Os principais mecanismos pelos quais os ftalatos exercem seu efeito tóxico são através da promoção de estresse oxidativo e indução de respostas inflamatórias que variam conforme o tecido ou órgão afetado.

A população em geral é exposta aos ftalatos através dos alimentos, da água e do ar, sendo as principais vias de contaminação a ingestão e a inalação. As perdas de ftalatos para o meio ambiente podem ocorrer durante a manufatura, a distribuição, o uso e a disposição final dos plastificantes e de produtos plastificados. Devido à utilização global dos plásticos, os ftalatos têm sido detectados em diversos meios: ar, água e solo (Ferreira & Morita, 2010).

Apesar de serem considerados um problema para o ambiente, devido às grandes quantidades despejadas e sua moderada persistência, não existe legislação nacional ou estrangeira, que restrinja o uso especificamente dos ftalatos. Sua absorção pelo solo e potencial assimilação por plantas é de especial interesse, já que tem sido observados efeitos hepatóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Ferreira, 2009; Loureiro, 2002).

As fontes de contaminação de ftalatos para o ambiente são as emissões atmosféricas, efluentes aquosos e despejos sólidos de plantas industriais. O processamento, distribuição e uso de produtos que os contenham também são fontes potenciais de poluição. Os compostos são despejados no sistema de efluentes de indústrias, alcançando as águas superficiais via esgoto ou descargas diretas na água. São comumente encontrados em rios e fontes d'água, podendo ser

assimilado pelas plantas durante a nutrição e o metabolismo vegetal. Além disso, a liberação dos ftalatos para o meio ambiente pode ocorrer durante sua síntese, produção ou na utilização dos produtos em que os ftalatos são aplicados (Guo & Kannan, 2013; Loureiro, 2002).

Segundo Ferreira (2006), a maior parte dos cânceres humanos resulta da exposição à carcinogênicos ambientais. Há várias publicações que confirmam a presença de ftalatos em biota, incluindo plantas, peixes, ratos e vacas, que confirmam a assimilação de compostos disponíveis meios pelos organismos vivos; bem como em amostras biológicas humanas. No entanto, ftalatos são rapidamente metabolizados para os seus álcoois correspondentes e, em seguida, monoésteres de oxidação e conjugação, outros metabolitos são excretados através da urina (Ochoa, 2012).

Em alguns estudos eco – toxicológicos foi evidenciado que monoésteres podem ser tóxicos para os mamíferos e a sua presença, juntamente com outros produtos de degradação, tais como o ácido ftálico, devem ser considerados quando se avalia os riscos ambientais de ftalatos (Ochoa, 2012).

No geral, 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 antitumorais (Barqawi et al., 2004).

Quispe et al. (2007) avaliaram o extrato etanólico de folhas de *A. muricata* e detectaram efeito citotóxico sobre as linhagens H-460. Oberlies et al. (1995) através de estudos *in vitro* avaliaram a citotoxicidade das Annonaceae, 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 inferir que há fundamento na utilização popular da *A. muricata* para o tratamento de neoplasias e que esta utilização deve ser concomitante aos tratamentos tradicionais (quimioterapia e radioterapia). Ao mesmo tempo, estes resultados relacionados à citotoxicidade, ainda que preliminares, revelam que se deve ter cautela no emprego de plantas medicinais de forma indiscriminada e mais estudos de aprofundamento são necessário para a averiguação e o isolamento de todas as substâncias presentes nos frutos de *A. muricata* L. que possam corroborar para a definição deste alimento como funcional.

## 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 por diferentes métodos, bem como a capacidade de provocar a morte em células tumorais de diferentes linhagens, o que em tese pode justificar seu uso popular como antitumoral e um possível alimento funcional. Para a obtenção do extrato aquoso, a polpa foi separada das cascas e das sementes. Os fracionamentos cromatográficos foram utilizados com o intuito de se identificar as substâncias presentes e avançar o conhecimento do perfil químico. Após a purificação, as amostras foram enviadas ao RMN para sua elucidação estrutural. As principais conclusões do estudo podem ser assim resumidas:

### 6.1 Avaliação do Perfil Químico

O extrato aquoso, as frações e as subfrações quando avaliados por CLAE apresentaram, nos cromatogramas referentes às frações de acetato de etila e butanólica, a indicação da presença de compostos aromáticos. Após a realização das técnicas cromatográficas de separação de substâncias, foram identificadas as amostras AM-1, AM-2, AM-3, AM-4 e AM-5, elucidadas estruturalmente como:  $\alpha$ -D-glicopirranose e  $\beta$ -D-glicopirranose (AM-1 e AM-2), ácido palmítico e ácido oleico (AM-3) e dietil-ftalato (AM-4).

## 6.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

O extrato aquoso, o sobrenadante e os padrões foram avaliados quanto sua atividade antioxidante pelo método DPPH e pelo método FRAP. O extrato aquoso (GS) e o sobrenadante (GSS) apresentaram capacidade antioxidante bem expressivas, destacando-se GSS como a amostra que se apresentou como o melhor antioxidante nas duas metodologias ( $EC_{50}$  18,41  $\pm$  4,3 $\mu$ g/mL – DPPH e 256,2  $\pm$  10,9  $\mu$ M de Trolox/mg – FRAP), evidenciando que o processo de purificação foi eficiente visto que também concentrou as substâncias antioxidantes.

## 6.3 Análise dos Parâmetros Físico-Químicos

Identificou-se como carboidratos presentes na polpa dos frutos a glicose (2,047 g/100g) e a frutose (2,892 g/100g) e o teor estimado de vitamina C com base na curva padrão foi de 2,17mg/100g de amostra. O percentual de umidade foi de 85,1%, valor este semelhante aos demais valores encontrados na literatura. O teor de proteína bruta “*in natura*” foi de 0,91 g/100g e o valor estimado de fibras foi de 1,7 g/100g, sendo estes valores semelhantes aos dados apresentados na Tabela Taco (2011). Os sólidos solúveis= 13,2 °Brix. Foram detectados os minerais: B (7,8 mg/Kg), Ca (1,2 g/Kg), Cu (4,9 mg/Kg), Fe (19,9 mg/Kg), K (1,2 mg/Kg), Mg (1,2 g/Kg), Mn (5,2 mg/Kg), P (1,2 g/Kg), Zn (4,5 mg/Kg) e Ca (1,2 g/Kg). Destaca-se o elevado teor de Boro, o qual é um dado sobremaneira interessante, visto que se relaciona com a atividade antineoplásica, bem como com a prevenção de doenças relacionadas à fixação do cálcio como osteoporose e artrite.

## 6.4 Avaliação da Atividade Antineoplásica

Como *screening* inicial, a viabilidade das linhagens U937 e THP-1 foi avaliada frente ao extrato aquoso (GS), sobrenadante (GSS) e frações (FH, FAcEt e FB). Nas células U937 e THP-1 o melhor resultado foi obtido com a fração FH ( $EC_{50}$  41,96 $\pm$ 1,66 e 257,3  $\pm$  1,59. respectivamente). Como não havia massa suficiente para a purificação das substâncias da FH, foram selecionadas as FAcEt e FB para a continuação dos processos cromatográficos. Das 4 substâncias identificadas, apenas duas (AM-3 e AM-4) provocaram a morte celular nas linhagens testadas,

sendo esta atividade também observada nas frações que originaram AM-3 e AM-4. A AM-3 reduziu a viabilidade celular de maneira concentração dependente, sendo esta redução mais efetiva para as células humanas de linfoma histiocítico (U-937) do que para as células de carcinoma de pulmão (H-460). Sendo a substância AM-3 identificada como uma mistura de ácido oleico e ácido palmítico, verificou-se por meio do uso de padrões que tanto o ácido oleico quanto o ácido palmítico provocam morte celular na linhagem testada, sendo o ácido palmítico o que mais inibiu a viabilidade celular ( $EC_{50} = 222,2 \pm 1,11\mu\text{M}$ ). Todavia, essa redução da viabilidade celular observada não ocorre na mesma intensidade com que foi observada em AM-3 ( $EC_{50} = 7,67 \pm 1,12$ ), sendo plausível que estas moléculas possam estar atuando em sinergismo e devido a este fato sua atividade antineoplásica seja mais significativa em AM-3 do que a que foi verificada empregando-se os padrões isoladamente. A substância AM-4 também foi capaz de inibir o crescimento da linhagem U-937 de maneira concentração dependente ( $EC_{50} 9,20 \pm 1,11 \mu\text{M}$ ).

Diante dos resultados obtidos e do levantamento bibliográfico pode-se inferir que há fundamento na utilização popular da *A. muricata* para o tratamento de neoplasias e que esta utilização deve ser concomitante aos tratamentos tradicionais (quimioterapia e radioterapia). Ao mesmo tempo, estes resultados relacionados à citotoxicidade, ainda que preliminares, revelam que se deve ter cautela no emprego de plantas medicinais de forma indiscriminada e mais estudos de aprofundamento são necessários para a averiguação e o isolamento de todas as substâncias presentes nos frutos de *A. muricata* L. que possam corroborar para a definição deste alimento como funcional.

## 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 (19): 1808-1812.

ADAMS, G.G., IMRAN, S., WANG, S., MOHAMMAD, A., KOK, M.S., GRAY, D.A., CHANNELL, G.A., HARDING, S.E. (2012) Extraction, isolation and characterisation of oil bodies from pumpkin seeds for therapeutic use. *Food Chemistry*.134:1919–1925.

ADEWOLE, S. O. & OJEWOLE, J. A. O. (2009) Protective effects of *annona muricata* linn. (*annonaceae*) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr. J. Trad.*, 6 (1): 30-41.

ADRIAENSSENS, E.; VANHECKE, E.; SAULE, P.; MOUGEL, A.; PAGE, A.; ROMON, R.; NURCOMBE, V.; LE BOURHIS, X.; HONDERMARCK, H. (2008) Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.*, 68 (2): 346-351.

AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S., TATTINI, M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196: 67–76.

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. (1999) Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.*, 62 (3): 504-540.

ALBERT, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2002) *Molecular biology of the cell*. 4. ed. Garland Science.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2010) *Biologia Molecular da Célula*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 55 p.

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.

ALMEIDA, M. M. B.; DE PAULA, R. C. M.; SILVA JÚNIOR, J. B. A.; SOUSA, P. H. M.; LOPES, M. F. G.; LEMOS, T. L. G. (2009) Estudo da composição de açúcares em frutas tropicais do Nordeste Brasileiro. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Sociedade Brasileira de Química, Ceará.

ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; FONSECA, M. L.; MAGALHÃES, C. E. C; LOPES, M. F. G.; LEMOS, T. L. G. (2009) Avaliação de macro e microminerais em frutas tropicais cultivadas no nordeste brasileiro. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 29(3): 581-586, jul.-set.

ALMEIDA, V.L., LEITÃO, A., REINA, L.C.B., MONTANARI, C.A., DONNICI, C.L., LOPES, M.T.P. (2005) Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*. 28 (1).

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.

AMADE, P.; MALLEA, M.; BOUAICHA, N. (1993) Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory. *The Journal of Antibiotics*, Tokyo, 47: 201-207.

AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S. M. A.; PADOVANI, R. M. (2001) DRI: síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. *Rev. Nutr.*, Campinas, 14(1): 71-78, jan./abr.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION - ADA (2008) Position of the American dietetic: health implication of dietary fiber. *Journal of the American Dietetic Association*, Chicago, 108 (10): 1716-1731, Oct.

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.

ANNUNZIATA, A., VECCHIOB, R. (2013) Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. *Food Quality and Preference*. 28(1):348-355.

ANÔNIMO (2013) Conselho Regional de Química (CRQ). Conceitos fundamentais de Cromatografia líquida de Alto Desempenho (HPLC). Minicursos 2010. São José do Rio Preto, 29 de maio. Disponível em: <[www.crq4.org.br](http://www.crq4.org.br)>. Acesso em dezembro de 2013.

ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. (2004) Dietary antioxidants as inhibitors of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Rev. Nutr.*, Campinas, 17(1):89-96, jan./mar.

ARAÚJO, C. S. (2013) Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do

Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina, PE, 198f.

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.

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.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC (1997) Official methods of analysis. Arlington: Patrícia Cuniff (Ed.), p.37-10, 42-2, 44-3, 45- 16.  
Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1995) Official methods of analysis of the Association of Official Analysis Chemists. Arlington. 957 páginas.

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.

AZEVEDO, R. (2004) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Produtos Agropecuários\Frutas\Tropicais.

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

AZIZ-UR-REHMAN, A.-U.-R.; MALIK, A.; RIAZ, N. *et al.* (2004) Lipoxygenase inhibitory constituents from *Periploca aphylla*. *Journal of natural products*, 67 (9): 1450-4, set.

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.

BAGNYUKOVA, T., SEREBRIISKII, I.G., ZHOU, Y., HOPPER-BORGE, E.A., GOLEMIS, E.A., ASTSATUROV, I. (2010) Chemotherapy and signaling How can targeted therapies supercharge cytotoxic agents? *Cancer Biology & Therapy* 10:9, 839-853.

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.

BELL, F. P. (1982) Effects of phthalate esters on lipid metabolism in various tissues, cells and organelles in mammals. *Environmental health perspectives*, 45 (44): 41-50, nov.

BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P (2007) Biossíntese e Degradação de Lipídios, Carboidratos e Proteínas em Oleaginosas. Embrapa, documentos, Campina Grande, PB, 178, 62p.

BENNETT, S.; BREIT, S.N. (1994) Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *J. Leukoc. Biol.*, 56 (3): 236- 240.

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.

BERNARDES, N.R.; GLORIA, L. L.; REIS, C. N.; PESSANHA, F. F.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. B. (2011) Quantification of the levels of tannins and total phenols and evaluation of the antioxidant activity of fruits of pepper tree. *Vértices*, Campos dos Goytacazes/RJ, 13 (3): 117-128, set./dez.

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.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. (1999) Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr., Campinas*, 12 (2): 123-130, maio/ago.

BIESEK, S.; ALVES, L.A.; GUERRA, I. (2010) *Estratégias de Nutrição e Suplementação no Esporte*. 2ª edição. Barueri, SP: Manole.

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, F. V. (2013) Atividade antineoplásica de complexos de ferro e cobre: síntese, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo*. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

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.

BRASIL, T. R. (2013) Ação *in vitro* da atividade antineoplásica de diterpenos isolados do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

BRASIL. Instrução Normativa nº 1, de 07 de janeiro de 2000, do *Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA)*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1: 5.

BRASIL. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001, da *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1: 45-53.

CAKIR, A.; MAVI, A.; YILDIRIM, A. *et al.*(2003) Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology*, 87 (1): 73-83, jul.

CAKMAK, I.; RÖMHELD, V. (1997) Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. In: DELL, B.; ROWN, P.H.; BELL, R.W. (eds.). *Boron in soil and plants: review*. Symposium, Chiang Mai, reprinted Plant and Soil, 193 (1-2): 71-83.

CALDAS, Z. T. C. C.; ARAÚJO, F. M. M. C.; MACHADO, A. V.; ALMEIDA, A. K. L.; ALVES, F. M. S. (2010) Investigação de qualidade das polpas de frutas congeladas comercializadas nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. *Revista Verde de Agroecologia e desenvolvimento sustentável* (Mossoró-RN-Brasil) 5 (4): 156-163 outubro/dezembro.

CAMPOS, D. A. (2008) Efeito gastroprotetor da 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetil-[2",3":7,8]-cromenoflavona isolada de *Lonchocarpus araripensis* Benthham 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 Flavonoides sobre a inflamação aguda induzidas por PLA2 de serpentes crotálicas. Tese - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Experimental do Litoral Paulista, Unidade São Vicente.

CANCIAM, C. A. (2014) Influência do teor de sólidos totais na estimativa do coeficiente de dilatação volumétrica do suco de graviola. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, Três Corações, 12 (2): 37-45, ago./dez.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. (2010) Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, 32 (4): 1196-1205, dezembro.

CARDOZO, C. J. M. (2009) Caracterización fisiológica, físico-química, reológica, nutracéutica, estructural y sensorial de La guanábana (*Annona muricata* L. cv. ELITA). Tese de Doutorado em Ciências da Universidad Nacional de Colombia, 274p.

CARDOZO, C. J. M.; LOZANO, V. V.; BETANCUR, D. P. Y.; VELÁSQUEZ, H. J. C.; VALENZUELA, J. R. C. (2012) Physiological and Physico-Chemical Characterization of the Soursop Fruit (*Annona muricata* L. cv. Elita). *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín* 65(1):-6477-6486.

CARGILL, S. A. (2012) Dossiê dos carboidratos. *Food Ingredients Brasil*, 20: 1-7.

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.

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.

CECCHI, M. (2000) Fundamentos teóricos e práticos em alimentos. Campinas: Unicamp.

CERÓN, A. F.; OSORIO, O. M.; HURTADO, A. H. B. (2012) Identification of fatty acids contained in oils extracted from three different fruit seeds. *Acta Agronómica*. 61 (2): 117-123.

CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. (1996) *Cancer chemotherapy and biotherapy*, 2a. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia.

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

CHAVES, M.S.B *et al.* (2007) Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, Teresinha, 30 (2): 351-355.

CHEN, S.; ANDREASSON, E. (2001) Update on glucosinolate metabolism and transport". *Plant Physiol. Biochem.*, 39: 743-58.

CHEN, Y. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. (1996) Isoquinoline Alkaloids and Lignans from *Rollinia mucosa*. *J. Nat. Prod.*, 59: 904-906.

CHITARRA, M. (2000) *Processamento mínimo de frutos e hortaliças*. Lavras: UFLA/FAEPE, 119p.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. (1990) Armazenamento, pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL/FAEPE. 293 p.

CLAVIN, M., GORZALCZANY, S., MACHO, A., MUÑOZ, E., FERRARO, G., ACEVEDO, C., MARTINO, V. (2007). Antiinflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 585-589.

CÔCCO, L. C. (2008) Previsão de propriedades físico-químicas e composição química da gasolina a partir de espectros no infravermelho. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, 244 f.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. (2006) *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 452p.

COOPER, G. M. (2001) A célula – uma abordagem molecular. 2ed., Artmed: Porto Alegre.

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-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C. A. (2010) contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudo no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virtual Quim.*, 2 (1): 47-58.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. (2000) Patologia Estrutural e Funcional. 6 ed. Guanabara: Rio de Janeiro. 1251.

COVARRUBIAS, L., HERNÁNDEZ-GARCÍA, D., SCHNABEL, D., SALAS-VIDAL, E., CASTRO-OBREGÓN, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology*, 320:1-11.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. (2009) *Nat. Prod. Rep.* 26: 1001.

CRUZ, L. S. (2011) Caracterização física e química da casca, polpa e semente de atemoia 'gefner'. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Lavras: UFLA, 62 p.

CUI, K., LUO, X., XU, K., MURTHY, M.R.V. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28: 771-799.

DANI, C.; AGINONI, J. C.; CALLONI, C.; SALVADOR, M.; SPADA, P. D. S. (2010) Viabilidade celular de cultura de linfócitos tratados com *Annona muricata* L. *Ciência em Movimento*. Ano XII, nº 24.

DAWOOD, S.; BROGLIO, K.; ESTEVA, F. J.; IBRAHIM, N. K.; KAU, S. W.; ISLAM, R.; ALDAPE, K. D.; YU, T. K.; HORTOBAGYI, G. N. ; GONZALEZ-ANGULO, A. M. (2008) Defining prognosis for women with breast cancer and CNS metastases by HER2 status. *Ann. Oncol.*, 19 (7).

DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. (2009) Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova*, 32 (3): 689-702.

DEMIDENKO, Z.N.; MCCUBREY, J.A. (2011) Recent progress in targeting câncer. *Aging*, 3 (12).

DEVLIN, T. M. (2007) Manual de Bioquímica Química com Correlações Clínicas. Editora Blücher : São Paulo.

DORIGONI, C. (2006) Processo de Extração Supercrítica Para Obtenção e Análise do Princípio Ativo Da Graviola (*Annona Muricata*). Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, 77p.

DOROSHOW, J.H. (1983) Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Research*, Baltimore, 43 (2): 460-472.

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.

DRAKE, A. J.; DRIESCHE, S. VAN DEN; SCOTT, H. M. *et al.* (2009) Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. *Endocrinology*, 150 (11): 5055-64, nov.

DRÖGE, W. (2002) Free readicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82: 47-95.

DUARTE-ALMEIDA JM, SANTOS RJ, GENOVESE MI, LAJOLO FM. (2006) Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de seqüestro de radicais DPPH•. *Ciênc Tecnol Aliment*; 26 (2): 446-52.

DUKE, A.T., DUCCELLIER, J.L. (1993). *CRC Handbook of Alternative Cash Crops. Annonaceae CRC Press Inc.*, FL, USA, pp. 33-46.

DUTRA de OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. In: DUTRA de OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. (1998) *Macrominerais. Ciências Nutricionais*. São Paulo: Sarvier. 133-39.

EGYDIO, A. P. M. (2009) *Análises das variações fitoquímicas, estrutura genética e importância econômica de Annona crassiflora Mart., no cerrado*. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 68p.

ELHADI M. YAHIA , CANDELARIO MONDRAGON-JACOBO (2011). Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). *Food Research International* 44, 2311–2318.

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.

FABER, M. O. (2011) *Isomerização Enzimática de Glicose a Frutose em Biorreator de Leito Fixo Alimentado Continuamente*. Dissertação (Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. (2001) The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environmental Health Perspectives*, 101.

FAHY, E., COTTER, D., SUD, M., SUBRAMANIAM, S. (2011) Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta*.

FALCÃO, M. A.; LIERAS, E.; LEITE, A. M. C. (1982) Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade da graviola (*Annona muricata* L.) na região de Manaus. *Acta Amazônica* 12(1): 27-32.

FALCATO, A. R. Q. (2014) Suplementos Alimentares: Consumo Nacional Estimado de Vitaminas e Minerais em 2012. Dissertação de Mestrado – Universidade de Lisboa, 105p.

FANG, X. P.; RIESER, M. J.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X. MCLAUGHLIN, J. L. (1993) Annonaceous acetogenins: An updated review. *Phytochem. Anal.*, 4 (1): 27–48.

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

FARBER, M. O. (2011). Isomerização Enzimática de Glicose a Frutose em Biorreator de Leito Fixo Alimentado Continuamente. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 73p.

FARIAS, J. F.; ARAÚJO NETO, S. E.; ÁLVARES, V. S.; FERRAZ, P. A.; FURTADO, D. T.; SOUZA, M. L. (2011) Maturação e determinação do ponto de colheita de frutos de envira-caju. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, 33 (3): 730-736, Setembro.

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.

FERNANDES, J., RUMJANEK, V.M., CASTILHO, R.O., KAPLAN, M.A., GATTASS, C.R. (2005) Alternativas contra o câncer. Ácido extraído de planta medicinal popular demonstra capacidade antitumoral.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E A. F. S. (2002) Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48(3): 375-382

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.

FERREIRA, I. D. (2009) Biorremediação de solo tropical contaminado com resíduos da produção de plastificantes. Tese (doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 388p.

FERREIRA, I. D.; MORITA, D. M. (2010) Biodegradação de alcoóis, ftalatos e adipatos em um solo tropical contaminado. *Quim. Nova*, 33 (8): 1686-1691.

FERREIRA, P. M. P. (2006) Determinação de potencial antitumoral de diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* Swarts. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 116 p.

FIORINI, L. S. (2008) A importância dos minerais para a saúde humana. In: Dossiê: Os minerais na alimentação. *Food ingredients Brasil*, 4: 48-65.

FLORES, F. F.; MARIA, D. A. (2011) Terapia De Captura De Nêutrons Pelo Boro (Bnct) no Tratamento do Câncer. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer, Goiânia, 7 (12): 1- 8.

FRAGA, C.G.; ARIAS, R.F.; LLESUY, S.F.; KOCH, O.R.; BOVERIS, A. (1987) Effect of vitamin E and selenium-deficiency on rat liver chemiluminescence. *Biochem. J.*, 242 (2): 383–386.

FRANCO, G. (2004) Tabela de composição química dos alimentos. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 307 p.

FREITAS, A. L. G. E. (2012) Caracterização da produção e do mercado da graviola (*Annona muricata* L.) no estado da Bahia. Vitória da Conquista-BA. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

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*.

FRIDOVICH, I., (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 1203-1209.

GARCIA, B. H.; KRAUSS, L. A.; SARTOR, C. F. P.; FELIPE, D. F. (2011) Estudo da Atividade Antioxidante dos Extratos de Própolis e *Pereskia Aculeata*. Anais Eletrônico VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar CESUMAR – Centro Universitário de Maringá - Editora CESUMAR, Maringá – Paraná – Brasil.

GARCIA-DIEZ, F. et al. (1996) Pectin feeding influences fecal bile acid excretion, hepatic bile and cholesterol synthesis and serum cholesterol in rats. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, 126 (7): 1766-1771, July.

GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M (2002). Principles of Biochemistry with a Human Focus. USA: Brooks/Cole, Thomson Learning.

GEORGE, V. C.; KUMAR, D. N.; RAJKUMAR, V.; SURESH, P. K.; KUMAR, A. (2012) Quantitative Assessment of the Relative Antineoplastic Potential of the n-butanol Leaf Extract of *Annona muricata* Linn. In Normal and Immortalized Human Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13: 699-704.

GHAZARIAN, H., IDONI, B., OPPENHEIMER, S.B. (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*. 113:236-247.

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.

GRACY, R.W.; TALENT, J.M.; KONG, Y.; CONRAD, C.C. (1999) Reactive oxygen species the unavoidable environmental insult. *Mutat. Res.*, 428 (1-2): 17–22.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. (2007) Morte Celular por Apoptose. *Rev. Bras. Cancerol.*, 3 (3): 335-343.

GROSSMAN, D.; KALO, D.; GENDELMAN, M.; ROTH, Z. (2012) Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Cell biology and toxicology*, 28 (6): 383-96, dez.

GU, Z. M.; ZHOU, D.; LEWIS, N. J.; WU, J.; SHI, G.; MCLAUGHLIN, J. L. (1997) Isolation of New Bioactive Annonaceous Acetogenins from *Rollinia mucosa* Guided by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.*, 5 (10): 1911-1916.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. (2005) Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev. Bras. Cancerol.*, 51 (3): 227-234.

GUO, J.; HAN, B.; QIN, L. *et al.* (2012) Pulmonary toxicity and adjuvant effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate in ovalbumin-immunized BALB/c mice. *PloS one*, 7 (6), jan.

GUO, Y.; KANNAN, K. (2013) A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environmental Science & Technology*. 47:14442-14449.

HALLIWELL, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine*, 91: 14-22.

HALLIWELL, B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, New York, 52 (8): 253-265.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O.I.(1995) The characterization on antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, 33 (7): 601-617.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edition ed. Clarendon, Oxford.

HAMMOND, B.G., JEZ, J.M. (2011) Impact of food processing on the safety assessment for proteins introduced into biotechnology-derived soybean and corn crops. *Food and Chemical Toxicology*. 49:711-721.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. (2000) The Hallmarks of Cancer Review. *Cell*, 100: 57–70.

HAO, C.; CHENG, X.; XIA, H.; MA, X. (2012) The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Bioscience reports*, 32 (6): 619-29.

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

HERCBERG, S., GALAN, P., PREZIOSI, P., ROUSSEL, A.M., ARNAUD, J., RICHARD, M.J., MALVY, D., PAULDAUPHIN, A., BRIANCON, S., FAVIER, A. (1998) Background and rationale behind the SU.VI. MAX study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases and cancers. *International Journal for Vitamins and Nutrition Research*, Bern, 68 (1): 3-20.

HIRSCHBRUCH, M.D.; CASTILHO S. (1999) Osteoporose. *In*: HIRSCHBRUCH, M. D.; CASTILHO, S. *Nutrição e bem estar para a terceira idade*. São Paulo: Editora CMS. 93-101.

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.

HOLMGREN, A., JOHANSSON, C., BERNDT, C., LÖNN, M.E., HUDEMANN, C., LILLIG, C.H. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions*, 33: 1375-1377.

HUSAIN, S.R., CILLARD, J., CILLARD, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26: 2489-2491.

IBRAF (2011) Informes Setoriais: *Fruticultura*. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br>. Acesso em 15 de maio de 2011.

IBRAHIM, B., SOWEMIMO, A., VAN ROOYEN, A., VAN DE VENTER, M., (2012). Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrata* (Linn.) Blume (Amaranthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 141: 282-289.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; VILHENA, K. S. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; DALLACORT, R. (2010) Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes e araticum (*Annona crassiflora*). *Planta Daninha*, 28 (4): 735-741.

INSTITUTE OF MEDICINE - IOM (2004). Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. Available online. 2004 <<http://www.nap.edu/catalog/10925.html>>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2002) Pesquisa de orçamentos familiares. Acesso em 2002 ago 16]. Disponível em: URL: <http://www.ibge.gov.br/>  
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – INCA (2014). Estatísticas do câncer. Vigilância do câncer e de fatores de risco. Acesso em 23 de novembro de 2014. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/INCA>>.

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.

JOHNSON, J. P. (1991) Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.*, 10 (1): 11-22.

JOY, B.; SOBHANA, D. (2006) Chemical characterization and pharmacological screening some *Annona* seed oils. *Asian Journal of Chemistry*, 18 (2): 1125-1128.

JUNIOR, W. E. F. (2008) Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções. *Química Nova na Escola*, 29, agosto: 1-7.

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.

KELMER, G. A. R. (2012) Caracterização química elementar e proteica da polpa da graviola. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 91p.

KIM, G. S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F. E.; MCLAUGHLIN, J. L. SASTRODIHARDJO, S. (1997) Two New Mono-TetrahydrofuranRing 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.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. (2003) Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res.*, 544: 305-31.

KUO, R. Y.; CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; TENG, C. M.; YEN, H. F.; WU, Y. C. (2001) Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry*, 57: 421–425.

KUSKOSKI EM, ASUERO AG, MORALES MT, FETT R. (2006) Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciênc Rural*, 36 (4): 1283-7.

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

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25(4): 726-732, out.-dez.

KVIECINSKI, M. R. (2007) Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 134p.

LAGE, G. A. (2011) Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *annona crassiflora* Mart. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 108 f.

LARSSON, S. C.; KUMLIN, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; WOLK, A (2004) Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 79: 935-945.

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

LEHNINGER , A.; NELSON, D.I.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 2. ed. São Paulo: Savier, 2002.

LETERME, P.; BULDGEN, A.; ESTRADA, F.; LONDOÑO, A. M. (2006) Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. *Food Chemistry*, 95 (4): 644-652.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; CHEN, S. L.; WU, C. C.; LEE, K. H.; WU, Y. C. (2005) Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *Bioorg. Med. Chem.*, 13: 4767–4776.

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.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A. D. (2009) Mark's Basic Medical Biochemistry: a clinical approach. USA: Lippincott Williams & Wilkins.

LIMA, A. (2008) Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, camb.). Tese. [Doutorado em Bromatologia] - Universidade de São Paulo.

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, L.A.R.S.; LOPES, M.T.P. ; CUNHA, M.M. ; PIMENTA, L.P.S. ; BOAVENTURA, M.A.D. (2012) Avaliação da atividade citotóxica das sementes de *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae). *Rev. Bras. Pl. Med.*, 14 (4,): 629-634.

LIMA, M. A. C.; ALVES, R. E.; FILGUEIRA, H. A. C.; ENÉAS-FILHO, J. (2005) Comportamento respiratório e qualidade pós-colheita de graviola (*Annona muricata* L.) “morada” sob temperatura ambiente. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 1, p. 49-52, abril 2005.

LIMA, M. A. C.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, A. C. (2002) Avaliação da Qualidade e da Suscetibilidade ao Escurecimento Oxidativo de Graviola (*Annona muricata* L.). *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 46:23-26. Fruit/Frutales – October.

LIMA, M. C.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. (2006) Mudanças relacionadas ao amaciamento da graviola durante a maturação pós-colheita. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 41 (12): 1707-1713.

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.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. (2010) Biology-driven cancer drug development: back to the future. *BMC Biology*, 8:38.

LOTTENBERG, A. M. P. (2009) Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 53(5): 595-607.

LOUREIRO, I.R. (2002) A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara. Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, PUC, 1, 143 f.

LUNA, A. F.; FREITAS, T. M. B.; ALVES, I. C.; PINTO, C. E. M.; LUZ, E. W. M. (2010) Atividade fitoquímica e antioxidante da folha *Annona muricata* L. frente ao

radical ABTS. *Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina - Zona Sul.*

LUNA, A. F.; FREITAS, T. M. B.; ALVES, I. C.; SILVA, J. N.; LUZ, E. W. M. (2009) Potencial antioxidante da polpa industrializada e in natura da *Annona muricata* L. IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica. Belém-PA.

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.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. (2009) Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell.*, 136 (5): 823–837.

LYNCH, H. T.; SILVA, E.; SNYDER, C.; LYNCH, J. F. (2008) Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. *Breast J.*, 14 (1): 3-13.

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

MACHADO, A. E. D., (2000) *Química. Nova*, 23: 237.

MAIHARA, V. A. et al. (2006) Avaliação nutricional de dietas de trabalhadores em relação a proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras alimentares e vitaminas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 26 (3): 672-677, jul./set.

MANACH C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (5): 727-747.

MANHÃES, L.R.T. (2007) Caracterização da polpa de buriti (*Mauritia Flexuosa*, Mart.): um potente alimento funcional. Dissertação de Mestrado – Seropédica – RJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 78 páginas.

MANSILLA, S., LIOVERA, L., PORTUGAL, J. (2012) Chemotherapeutic Targeting of Cell Death Pathways. *Anticancer Agents Med Chem*.

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.

MÁRQUES, L. R. (2001) *A fibra terapêutica*. 2. ed. São Paulo: CRF, 175 p.

MARSCHNER, H. (2012) Mineral nutrition of higher plants. Academic, 889p.

MASSARI, L. P.; KASTELAN, M.; GRUBER, F. (2007) Epidermal malignant tumors: pathogenesis, influence of UV light and apoptosis. *Coll. Antropol.*, 31 (1): 83-85.

MATA, M. E. R. M.; DUARTE, M. E. M.; ALSEMO, G. C. S.; RODRIGUES, E.; GUEDES, M. A.; CAVALCANTI, A. S. R.; OLIVEIRA, C. A. A. (2005) Obtenção de graviola em pó pelo processo de liofilização. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, 7 (2): 165-172.

MATOS, C. B. (2007) Caracterização física, química, físico-química de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng.) Schum.) com diferentes formatos. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 53p.

MAVAR-MANGA, H.; HADDAD, M.; PIETERS, L. *et al.* (2008) Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. *Journal of ethnopharmacology*, 115 (1): 25-9, 4 jan.

MC DOUGAL, G. J. et al. (1996) Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *Journal of the Science Food and Agriculture*, London, 70 (2): 133-150, Feb.

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

MEDEIROS, P. V. Q.; MENDONÇA, V.; MARACAJÁ, P. B.; AROUCHA, E. M. M.; PEREIRA, R. G. (2009) Physical-chemical characterization of atemóia fruit in different maturation stages. *Revista Caatinga*. Mossoró, Brasil, 22 (2): 87-90, abril/junho de 2009. Universidade Federal Rural do semi-árido-UFERSA.

MELO FILHO, A. B.; VASCONCELOS, M. A. S. (2011). Química de Alimentos. Rede E-tec Brasil, Recife: UFRPE, 78 p.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; ARAÚJO, C. R. (2008) Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. *Alim. Nutr.*, Araraquara, 19 (1): 67-72, jan./mar.

MESQUITA, F. R.; LIMA, M. O.; ARAÚJO, J. M.; RIBEIRO, O. A. S.; CRAVEIRO, R. L. (2014) Composição centesimal de frutos típicos da região do vale do Juruá-amazônia ocidental. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 10 (19): 2849-2857.

MOITINHO, B. L. R.; SANTOS, R. F.; SILVA, C. M. R. (2010) Caracterização de polpas de frutas tropicais e elaboração do néctar. Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS, Feira de Santana-BA, 18 a 22 de outubro.

MOLKENTIN J. (2000) Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substance in bovine milk lipids. *Brit J Nutr.* 84(1):47-53.

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

MORAES, M. O. B. (2013) Caracterização química e determinação da atividade antioxidante em massa da graviola (*Annona muricata* L.). Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB - Itapetinga-BA – 61 páginas.

MOREIRA, N.X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. (2002) Ácidos graxos: uma revisão. *Nutrire; J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, 24: 105-123, dez.

MORITA, H.; LIZUKA, T.; CHOO, C. Y.; CHAN, K. L.; TAKEYA, K.; KOBAYASHI, J. (2006) Vasorelaxant activity of cyclic peptide, cyclosquamosin B, from *Annona squamosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 4609–4611.

MORTON, J. F. (1987) Fruits of warm climates. Miami: Creative Resource Systems, 505 p.

MOSCA, J. L.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; OLIVEIRA, J. F.. (1997) Determination of harvest index for soursop (*Annona muricata* L.). In: CONGRESO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, 1977, Chapingo, México. Memorias... Chapingo: Universidad Outoma de Chapingo, 315-322.

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

MOURA, A. C. S., VILEGAS, W., SANTOS, L. C. (2011) Identificação de Alguns Constituintes Químicos de *Indigofera Hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-LES-em (TOF) e Avaliação da Atividade Antirradicalar. *Quim. Nova*, 34:7, S1-S8.

MULLER, S. D. (2006) Determinação de alcalóides e flavonoides através de clae e uv de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá-doce. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade do Vale do Itajaí - Itajaí – SC, 91 páginas.

MURAD, A.M.; KATZ, A. (2000) Oncologia Bases Clínicas do Tratamento; Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*. 1054: 95-111

NASCIMENTO, M. C. S. (2008) Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

NEWMAN, D.J.; CRAGG G.M. (2012) Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 311-335.

NG, K.L., CIOU, J.S., HUANG, C.H. (2010) Prediction of protein functions based on function–function correlation relations. *Computers in Biology and Medicine*. 40:300-305.

NGUYEN, D.T.; NYUGEN, D.H.; LYUN, H.L.; LEE, H.B.; SHIN, J.H.; KIM, E.K. (2007) Inhibition of melanogenesis by diocyl phthalate isolated from *Nigella glandulifera* Freyn. *Journal of Microbial Biotechnology*, 17: 1585-1590.

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.

NORONHA, J. P. C. (2001) Metabolitos Secundários Do Fruto De *Arbutus Unedo* L. (Medronho, Dissertação (Mestrado), Universidade Nova Lisboa, Lisboa, 301p.

NOZAKI, V. T. (2012) Potencial nutricional da Amêndoa e da polpa da Guarirova, *Syagrus Oleracea* (Mart.) Becc. Tese - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 100p.

NYGREN, P. (2001) For the SBU-group. What is cancer chemotherapy? *Acta Oncologica*. 40, 166–174.

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.

OCHOA, K. E. P. (2012) Análisis de screening de ftalatos y sus productos de degradación en aguas. Dissertação (mestrado) - Universitat de València, 36p.

ODIN, A.P. (1997) Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutation Research*, Amsterdam, 386 (1): 39-67.

OKADA, H.; MAK, T. W. (2004) Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer.*, 4: 592-603.

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. M.; BASTOS, D. H. M. (2011) Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim. Nova*, 34 (6): 1051-1056

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.

PADH, H. (1994) Functional Foods edited By Israel Goldberg. *Chapman&Hill*.

PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R. L. (2004) O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 50 (3): 251-260.

PAN, L., HEEBYUNG, C., KINGHORN, A.D. (2009) The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochem Lett*, p. 1–8.

PAULL, R. E.; J. DEPUTY, N.; CHEN, J. (1983). Changes in organic acids, sugars, and headspace volatiles during fruit ripening of soursop. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108(6):931-934.

PELZER, L.E., GUARDIA, T., JUAREZ, A.O., GUERREIRO, E. (1998). Acute and chronic antiinflammatory effects of plants flavonoids. *Il Farmaco*, 53: 421-424.

PENNATHUR, S., HEINECKE, J.W. (2007). Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9: 955-969.

PEREIRA Jr, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. (2008) *Séries em Biotecnologia: Tecnologia de bioprocessos*. 1. ed. Rio de Janeiro, 62 p.

PEREIRA, J. T. K.; OLIVEIRA, K. A. M.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C.; PINTO, C. L. O.; FONTES, E. A. F. (2006) Avaliação da qualidade físico-química, microbiológica e microscópica de polpas de frutas congeladas comercializadas na cidade de viçosa-MG. *Alim. Nutr.*, Araraquara 17 (4): 437-442, out./dez.

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.

PETERS, J.B. (ed.) (2005). Wisconsin Procedures for Soil Testing, Plant Analysis and Feed & Forage Analysis: Plant Analysis. Department of Soil Science, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin-Extension, Madison,WI. Disponível em: [http://uwlabs.soils.wisc.edu/files/procedures/plant\\_icp.pdf](http://uwlabs.soils.wisc.edu/files/procedures/plant_icp.pdf). Acesso em 10 de março de 2013.

PIETTA, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63 (7): 1.035-1.042.

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

PINHEIRO D.M., PORTO, K.R.A., MENEZES, M.E.S. (2005) *A Química dos Alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais*. 1ª edição, Maceió: UFAL.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. (2002) Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, 25 (1): 45-61.

PRIOR, R. L.; CAO, G. (1999) In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med*, 27 (11/12): 1173-81.

PROSKY, L. (2001) What is dietary fibre? New look at the definition. In: -----, *Advanced dietary fibre technology*. London: Blackwell Science, 63- 76.

QUAST, D.G. (1990) Açúcar e saúde. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24 (1/2): 39-47.

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.

RADONIĆ, A.; BLAŽEVIĆ, I.; MASTELIĆ, J. *et al.* (2011) Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Cardaria draba* (L.) Desv. volatiles. *Chemistry & biodiversity*, 8 (6): 1170-81, jun.

RAKKESTAD, K. E.; HOLME, J. A; PAULSEN, R. E.; SCHWARZE, P. E.; BECHER, R. (2010) Mono(2-ethylhexyl) phthalate induces both pro- and anti-inflammatory

responses in rat alveolar macrophages through crosstalk between p38, the lipoygenase pathway and PPARalpha. *Inhalation toxicology*, 22 (2): 140-50, fev.

RANDLE, P. J.; GARLAND, P. B.; HALES, C. N.; NEWSHOLME, E.A. (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* *l.* 13:785-9.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. (2004) In: Farmacologia. Elsevier: Rio de Janeiro.

RAVISHANKAR, K., KIRANMAYI, G.V.N., APPA REDDY, G.V., SOWJANYA, V.V.L., SAINADH, V.B., DURGA, V.G.L., PRASAD, V.S., SWAMINAIDU, P.V., PRASAD, T. (2012) Preliminary phytochemical screening and in-vitro antibacterial activity of *Cucurbita maxima* seed extract. *International journal of research in pharmacy and chemistry*. 2:86-91.

RAY, P.D., HUANG, B.-W., TSUJI, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24: 981-990.

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

REBOUÇAS, L. M. C.; CARACIOLO, M. S. B.; SANT'ANA, A. E. G. (1999) Composição química da glândula abdominal da fêmea da mariposa *Castnia licus* (Drury)(Lepidoptera: Castiniidae): possíveis ferormônios e precursores. *Química Nova*, 22 (5): 645-648.

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.

REIS, C.N. (2011) *Annona muricata* L.: análise química e biológica dos frutos de gravioleira. Dissertação de Mestrado – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 149 páginas.

RESTREPO, J.; VINASCO, L. E. (2010) Evaluación Fisicoquímica De La Fracción Lipídica De Las Semillas De Guanábana (*Annona muricata*) Y La Chirimoya (*Annona cherimolia*). *Revista de Ciencias*, 117-124.

REZEX. *Colunas de HPLC para análise de açúcares, carboidratos, oligossacarídeos e ácidos orgânicos*. Disponível em: <http://www.allcrom.com.br/produtos/produtos-hplc/colunas-phenomenex/rezex.html>. Acesso em: 16 agosto de 2011.

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.

RICHTER, C.; PARK, J.W.; AMES, B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85 (17): 6465–6467.

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.

RIOS, M. E. F. Estudo da atividade citotóxica e do potencial do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L. (AMSA) em modelos experimentais in vitro e in vivo. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 121f.

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.

ROBBINS; C. (2005) *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 7 ed., Elsevier – Campus.

ROBERFROID, M. (2002) Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34 (2): 105-110.

ROCHA, A. B., LOPES, R. M., SCHWARTS, G. (2001) Natural products anticancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1 (4): 364-369.

ROCHA, B. A.; BARBOSA, F. (2014) Contaminantes emergentes (1º capítulo): Bisfenol A e análogos. *Nanocell News*.

RODRIGUES, L. L.; SOUSA, M. M. D.; SILVA, J. N.; MARQUES, M. J.; BRITO, P.; LIMA, A. (2012) caracterização físico-química e detecção de metabólitos secundários do cará moela (*Dioscorea bulbifera*). Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação – VII CONNEPI, Tocantins.

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 (1): 53-60, jan.-mar.

ROLLAND, F., BAENA-GONZALEZ, E. E SHEEN, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Rev. Plant Biology*, 57, 675-709.

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

RUAN, H.L.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.H.; PI, H.F.; WU, J.Z. (2006) Studies on constituents from roots of *Euphorbia hylonoma*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, Beijing, 31: 742-744.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. (2006) Metodologia Científica:

Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Comunicado técnico EMPRAPA*, Fortaleza, CE, Dezembro.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. (1990) Annonaceous acetogenins: a review. *J. Nat. Prod.*, 53 (2): 237-278.

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.

SACRAMENTO, C. K.; FARIA, J. C.; CRUZ, F. L.; BARRETO, W. S.; GASPAR, J. W.; LEITE, J. B. V. (2003) Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.). *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, 25 (2): 329-331, Agosto.

SALGADO, S. M.; GUERRA, N. B.; MELO FILHO, A. B. (1999) Polpa de fruta congelada: efeito do processamento sobre o conteúdo de fibra alimentar. *Rev. Nutr.*, Campinas, 12(3): 303-308, set./dez.

SALMONM, S.E. (1998) *Farmacología Básica & Clínica*, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 629-655.

SALVADOR, I. (2011) Atividade antioxidante e teor de resveratrol em cacaus, chocolates, achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 91p.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F.(1998) A procedure to measure the antiradical efficient of poly phenols. *J Sci Food Agric*, 76: 270-6.

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

SANTOS, M. S. S. A. (1982) Caracterização física, química e tecnológica do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e seus produtos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 75p.

SANTOS, S. N. (2012) Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Combretum leprosum* do bioma Caatinga. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 182 p.

SANTOS, G. C. (2008) Avaliação do efeito protetor do urucum e da bixina sobre a genotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina em células de linhagem pc12. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 136p.

SÃO JOSÉ, A. R. (2003) *Cultivo e mercado da graviola*. 10ª semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria 01 a 04 de setembro de 2003–Centro de Convenções Fortaleza – Ceará – Brasil. FRUTAL'2003 Cooperativismo e Agronegócio.

SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. (1997) *Anonáceas, produção e mercado (Pinha, Graviola, Atemóia e Cherimólia)*. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB. Departamento de fitotecnia e zootecnia. Vitória da Conquista – Bahia - Brasil. 32p.

SARAIVA, S. A. (2008) Caracterização de Matérias-Primas e Produtos Derivados de Origem Graxa por Espectrometria de Massas. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, 76p.

SCHNEIDER, A.; MÜHLEN, C. V. (2011) caracterização cromatográfica de compostos orgânicos presentes nos resíduos sólidos provenientes de indústria de reciclagem de papel e sua aplicação na produção de briquetes de carvão vegetal. *Quim. Nova*, 34 (9): 1556-1561.

SIEBER, O. M.; HEINIMANN, K., TOMLINSON, I. P. M. (2003) Genomic instability – the engine of tumorigenesis. *Nature Rev.*, 3: 701-708.

SILVA, A. T. C. R. (2010) Estudo da Cristalização da Frutose em Diferentes Meios. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos.

SILVA, F. S. (2007) Investigação da atividade antineoplásica de Substâncias puras isoladas de plantas do semiárido Brasileiro e derivados sintéticos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, 79p.

SILVA, M. P. S. (2014) Macronutrientes e boro em capsicum annum var. Annum: crescimento, composição mineral, sintomas de deficiência nutricional e produção de capsaicinoides. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 104f.

SILVA, M. T. M.; OLIVEIRA, J. S.; JALES, K. A. (2009) Avaliação da qualidade físico-química de polpas de fruta congeladas comercializadas no interior do Ceará.

SILVEIRA, L. R.; PINHEIRO, C. H. J.; ZOPPI, C. C.; HIRABARA, S. M.; VITZEL, K. F.; BASSIT, R. A.; LEANDRO, C. G.; BARBOSA, M. R.; SAMPAIO, I. H.; MELO, I. H. P.; FIAMONCINI, J.; CARNEIRO, E. M.; CURI, R. (2011) Regulação do metabolismo de glicose e ácido graxo no músculo esquelético durante exercício físico. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, 55 (5): 303:313.

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

SIQUEIRA, D. S.; PEREIRA, A. S.; AQUINO NETO, F. R.; CABRAL, J. A.; FERREIRA, C. A. C.; SIMONEIT, B. R. T.; ELIAS, V. O. (2003) Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da Amazônia. *Quím. Nova*, 26 (5): Sept./Oct, 633-640.

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

SMOLIN, L. A.; GROSVENOR, M. B. (2007) Nutrition: science and applications with bloklet package. Orlando: John Wiley & Sons Inc, 1.ed, p 864.

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 Zociências*, 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, J. J. (2013) Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Dissertação de Mestrado - Fundação Universidade Federal do Pampa – Uruguiana - RS, 82 páginas.

SOLÍS-FUENTES, J. A. ; Amador-Hernández, C.; Hernández-Medel, M. R.; Durán-de-Bazúa, M. C. (2010) Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de “almendra” de guanábana (*Annona muricata*, L). *Grasas Y Aceites*, 61 (1): 58-66.

SONI, V. K.; YADAV, D. K.; BANO, N.; DIXIT, P.; PATHAK, M.; MAUTYA, R.; SAHAI, M.; JAIN, S. K.; MISRA-BHATTACHARYA, S. (2012) N-methyl-6, 7-dimethoxyisoquinolone in *Annona squamosa* twigs is the major immune modifier to elicit polarized Th1 immune response in BALB/c mice. *Fitoterapia*, 83: 110–116.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. (2008) Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Semin. Cancer. Biol.*, 18 (5): 372-377.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. (2011) Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Braz. J. Food Technol.*, Campinas, 14 (3): 202-210, jul./set.

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* Ruldophi e toxicidade em camundongos. Dissertação - Mestrado em Ciências Veterinárias - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza – Ceará, 95 páginas.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. (2013) Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects Rubiaceae species in Brazil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18 (1): 140-156.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. D. S. (2012) Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food Chemistry*, p. 381–386.

SPADA, P. D. S.; BORTOLINI, G. V.; PRÁ, D.; SANTOS, C. E. I.; DIAS, J. F.; HENRIQUES, J. A.; SALVADOR, M. (2010) Macro and microminerals: are frozen fruits a good source? *An Acad Bras Cienc.* 82 (4): 861-867.

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.

SPOSITO, A. C.; CARAMELI, B.; FONSECA, F. A.; BERTOLAMI, M.; AFIUNE, A.; SOUZA AD, et al. (2007) IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* 88(1):2-19.

SRINIVASAN, G. V.; RANJITH, C.; VIJAYAN, K. K. (2008) Identification of chemical compounds from the leaves of *Leea indica*. *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 58 (2): 207-14, jun.

SRINIVASAN, G.V.; SHARANAPPA, P.; LEELA, N.K.; SADASHIVA, C.T.; VIJAYAN, K.K. (2009) Chemical composition and Antimicrobial activity of *Leea indica* (Burm. F) Merr flowers. *Natural Product Radiance*, New Delhi, 8: 5.

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.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. (2012) Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, 14 (4): 263-9.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS - TBCA-Usp (2008) da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental FCF/USP.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DOS ALIMENTOS – TACO (2011). Campinas - SP: NEPA-UNICAMP, 4ª edição.

TABORDA, P. S.; MARINHO, T. G.; FIGUEIRÓ, F.; BATASTINI, A.; RUSSOWSKY, D.; PIOVESAN, L.A.; D'OCA, M. G. M. (2013) Estudo da atividade antitumoral de novos compostos de Biginelli derivados de ácidos graxos. 12ª Mostra de Produção Universitária, Rio Grande do Sul, outubro.

TAIZ, L., ZEIGER, E. (2013) Fisiologia vegetal. 5.ed. ARTMED. 916p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2006) Plant physiology. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.

TEMPLE, N.J. (2000). Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*, 20: 449–459.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K; CISNEROSZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for

estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669-675.

THE HISTORY OF CANCER. American Cancer Society Inc. New York. Acesso em 22 de novembro de 2012. Disponível em:<[http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI\\_2\\_6x\\_the\\_history\\_of\\_cancer\\_72.asp](http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_6x_the_history_of_cancer_72.asp)>.

THIEX, N. J.; MANSON, H.; ANDERSON, S.; PERSSON, J. A. (2002) Determination of Crude Protein in Animal Feed, Forage, Grain, and Oilseeds by Using Block Digestion with a Copper Catalyst and Steam Distillation into Boric Acid: Collaborative Study. *Journal of AOAC international*, 85 (2): 309-317.

TOILLON, R. A.; MAGNE, N.; LAIOS, I.; CASTADOT, P.; KINNAERT, E.; VAN HOUTTE, P.; DESMEDT, C.; LECLERCQ, G.; LACROIX, M. (2007) Estrogens decrease gamma-ray-induced senescence and maintain cell cycle progression in breast cancer cells independently of p53. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 67 (4): 1187-1200.

TORRAS-CLAVERIA, L., JÁUREGUI, O., CODINA, C., TIBURCIO, A.S., BASTIDA, J., VILADOMAT, F. (2012). Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. *Plant Science*, 182: 71-78.

TROWELL, H; BURKITT, D. (1986) Physiological role of dietary fiber: a ten-year review. *Bol Asoc Med*, Dec;78(12): 541-4.

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.

VASUDEVAN, D.M., SREEKUMARI, S., VAIDYANATHAN, K. (2011). Textbook of Biochemistry for Medicinal Students. Jaypee Brothers Medicinal Publishers (P) Ltd, Saint Louis (USA).

VEGA, M. R. G. (2006) Constituintes químicos de *Eupatorium macrocephalum* Less e *Annona dioica*: uma contribuição ao estudo de plantas medicinais no Paraguai. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química orgânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

VEGLIA, F.; VINEIS, P.; OVERVAD, K.; BOEING, H.; BERGMANN, M.; TRICHOPOULOU, A.; TRICHOPOULOS, D.; PALLI, D.; KROGH, V.; TUMINO, R.; LINSEISEN, J.; STEINDORF, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; TJONNELAND, A.; GONZALEZ, C. A.; MARTINEZ, C.; DORRONSORO, M.; BARRICARTE, A.; CIRERA, L.; QUIROS, J. R.; DAY, N. E.; SARACCI, R. ; RIBOLI, E. (2007) Occupational exposures, environmental tobacco smoke, and lung cancer. *Epidemiology*, 18 (6): 769-775.

VENTURA, T. L. B. (2011) Atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana de espécies vegetais ocorrentes no Brasil com ênfase em *Cecropia pachystachya* e *Vochysia divergens*. Tese de Mestrado – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 117 páginas.

VETRANO, A. M.; LASKIN, D. L.; ARCHER, F. *et al.*(2010) Inflammatory effects of phthalates in neonatal neutrophils. *Pediatric research*, 68 (2): 134-9, ago.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10: 789-799.

WALKER, T. E.; LONDON, 'A R. E.; WHALEY, LA T. W.; BARKER, LA R.; MATWIYOFF, LB E N. A. (1976) Carbon- 1 <sup>3</sup> Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of [ 1 - <sup>3</sup>C] Enriched Monosaccharides. Signal Assignments and Orientational Dependence of Geminal and Vicinal Carbon-Carbon and Carbon-Hydrogen Spin-Spin Coupling Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 98:19 / September 15.

WANG, J.; LIAO, Y.; FAN, J. *et al.*(2012) Apigenin inhibits the expression of IL-6, IL-8, and ICAM-1 in DEHP-stimulated human umbilical vein endothelial cells and in vivo. *Inflammation*, 35 (4): 1466-76, ago.

WATANABE, R., NAKAMURA, H., MASUTANI, H., YODOI, J. (2010). Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol Ther*, 127: 261-270.

WEIJL, N.I., CLETON, F.J., OSANTO, S. (1997) Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treatment Reviews*, London, 23 (4): 209-240.

WEINBERG, R. A. (2008) *A Biologia do Câncer*. 1a ed. Editora Artmed.

WÉLÉ, A., NDOYE, I. & BADIANE M. (2004) Fatty acid and essential oil compositions of the seed oil of five *Annona* species. *Nigerian Journal Natural Products and Medicine* 8: 62-65.

WÉLÉ, A.; MAYER, C.; DERMIGNY, Q.; ZHANG, Y.; BLOND, A.; BODO, B. (2008) Sequence and three-dimensional structure of cycloreticulins A and B, new cyclooctapeptides from the seeds of *Annona reticulata*. *Tetrahedron*, 64: 154-162.

WENDT, J.; RADETZKI, S.; VON HAEFEN, C.; HEMMATI, P. G.; GUNER, D.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; DORKEN, B. ; DANIEL, P. T. (2006) Induction of p21CIP/WAF-1 and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene*, 25 (7): 972-980.

WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C. (2004). Flavonoids: Antioxidant or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, 36: 838-849.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO (2002). Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev. Panam. Salud Publica*, 12 (5): 366-370.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO (2012). Cancer. Acesso em 4 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>

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, anomuricin c and muricatocin c, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 58 (6): 909-915.

WU, T. S.; JONG, T. T.; TIEN, H. J.; KUOH, C. S.; FURUKAWA, H.; LEE, K. H. (1987) Annoquinone- A, an antimicrobial and cytotoxic principle from *Annona MONTANA*. *PHYTOCHEMISTRY* , 26 (6): 1623-1625.

XI, W.; WAN, H. T.; ZHAO, Y. G. *et al.* (2011) Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di(2-ethylhexyl)-phthalate on gonadal development of male mice. *Environmental science and pollution research international*, 19 (7):25-27, ago.

YAHIA, E. M. (2010). The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. *Phytochemicals: Chemistry, nutritional and stability* (pp. 3–51). Wiley-Blackwell Chapter 1.

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

ZHI, J.; MOORE, R.; KANITRA, L. (2003) The effect of short-term (21-day) orlistat treatment on the physiologic balance of six selected macrominerals and microminerals in obese adolescents. *J Am Coll Nutr*, 22: 357–362.

ZULETA, A.; SAMBUCETTI, M. E. *Fructanos: características estructurales y metodología analítica*. In: LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. (eds). *Carbohidratos en Alimentos Regionales Iberoamericanos*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2006. 648 p.