

**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

ROSEANE SOARES RAMOS BENITES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE
CONSTITUINTES DE *Annona cacans*, *A.*
coriacea e *A. sylvatica*.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

**DOURADOS/MS
OUTUBRO/2013**

ROSEANE SOARES RAMOS BENITES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE
CONSTITUINTES DE *Annona cacans*, *A.
coriacea* e *A. sylvatica*.**

**ORIENTADORA: Dra. ELIANA JANET SANJINEZ ARGANDONA
CO-ORIENTADORA: Dra. ANELISE SAMARA NAZARI FORMAGIO**

**Dissertação de mestrado submetida ao
programa de pós-graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos
necessários para a obtenção do título de
mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental na
área de concentração Tecnologia Ambiental.**

DOURADOS/MS

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD

634.41 Benites, Roseane Soares Ramos.
B467a Atividade antioxidante e teor de constituintes de *Annona
cacans*,
A. coriacea e *A. sylvatica* / Roseane Soares Ramos Benites –
Dourados-MS: UFGD, 2013.
106 f.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandoña.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia
Ambiental) Universidade Federal da Grande
Dourados.

1. Annona (Araticum). 2. Annonaceae. I. Título.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Atividade Antioxidante e teor de constituintes de *Annona cacans*, *A. coriacea* e *A. sylvatica*”**”, de autoria de **Roseane Soares Ramos Benites**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Profa. Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandoña
(Orientadora - UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio
(Coorientadora – UFGD)

Prof. Dr. Jonas da Silva Mota
Membro Examinador (UEMS)

Profa. Dra. Cristina Tostes Filgueiras
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 28 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me concedeu a vida e me deu forças para seguir em frente em todos os momentos.

Aos meus pais, Ivanilde e Rivaldo, pela educação e exemplo passados ao longo de toda a minha vida. Sem vocês eu não estaria aqui.

Ao meu marido Roberto Benites, grande incentivador e responsável por esta etapa na minha vida.

Ao meu amado filho Murilo, do qual tive que abdicar várias horas de convívio. Com certeza o fiz pensando em seu futuro.

À Professora Doutora Eliana Janet Sanjinez Argandona pela orientação, incentivo e generosidade durante a nossa convivência.

À Professora Doutora Anelise Samara Nazari Formagio pela co-orientação, paciência e por estar sempre disposta a ajudar na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias por toda ajuda prestada e pela convivência acolhedora.

Ao Grupo de Estudos em Produtos e Processos Agroindustriais do Cerrado – GEPPAC pelo apoio e aprendizado repassado.

À Universidade Federal da Grande Dourados e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela estrutura necessária à realização deste trabalho.

A todos os outros que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Atividade Antioxidante

AAT – Ácido Ascórbico Total

ABTS – Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico

BHT – Butil-hidroxitolueno

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior

CL – Cromatografia líquida

DNPH – 2,4 – dinitrofenilhidrazina

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

FT – Flavonóides Totais

FUNDECT – Fundação de Apoio ao desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul.

IC₅₀ – Concentração inibitória para reduzir 50%.

PDA – Detector de arranjos de diodos

PFT – Polifenóis Totais

TC – Taninos Condensados

TROLOX – 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo 1) - Atividade antioxidante dos extratos de <i>A. cacans</i> pelos métodos do DPPH, branqueamento do β -caroteno, e ensaio do ABTS.....	27
Tabela 2 (Artigo 1) -Tempo de retenção dos padrões e concentração em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ do extrato hidrometanólico da semente de <i>A. cacans</i> através da análise de CL.....	28
Tabela 1 (Artigo 2) - Espécies selecionadas para a avaliação da atividade antioxidante.....	62
Tabela 2 (Artigo 2) - Atividade antioxidante dos quatro extratos de frutos de <i>Annona</i> pelos métodos do DPPH•, branqueamento do β -caroteno e ensaio do ABTS•.....	63
Tabela 3 (Artigo 2) - Teor de constituintes nos quatro extratos de frutos de <i>Annona</i> avaliados.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Teores de constituintes nos extratos hidrometanólicos de <i>A. cacans</i>	29
Figura 2 - Cromatograma do extrato das sementes de <i>A. cacans</i>	30

Resumo

O potencial antioxidante de extratos de *Annona cacans* (polpa, semente e folhas), *A. coriacea* e *A. sylvatica* (polpa e sementes) (Annonaceae) foram investigados, bem como os fenólicos totais, flavonóides, taninos condensados e ácido ascórbico total. A composição química foi investigada, para o extrato mais ativo, através do método analítico de cromatografia líquida (CL). Para determinação da atividade antioxidante foram usados os métodos: sequestro do radical livre 1,1- difenil -2- picrilhidrazil (DPPH), branqueamento do β -caroteno e do cátion ABTS. As folhas, polpa e as sementes foram extraídas com metanol/água (8:2). O extrato das sementes de *A. cacans* apresentou maior atividade antioxidante na eliminação de radicais livres (IC_{50} 25,6 ug / ml), no método do branqueamento do β -caroteno (AA % de 89,67 ug / ml) e no ensaio de ABTS (200,96 μ M trolox / g de amostra). Os extratos das sementes de *A. cacans* apresentaram através da análise de CL, ácidos fenólicos e flavonóides (luteolina e canferol). Também demonstraram um alto teor de compostos fenólicos e taninos condensados (TC). Na análise comparativa entre os extratos de *A. coriacea* e *A. sylvatica*, verificou-se que o extrato hidrometanólico das sementes de *A. coriacea* obteve moderado efeito antioxidante, com 31.53% no sequestro de radicais livres pelo ensaio do DPPH•, 51.59% pelo teste do branqueamento do β -caroteno e pelo ensaio do ABTS• com 159.50 μ M trolox/g de extrato. Foi observado que o extrato hidrometanólico das sementes de *A. coriacea* obteve alto teor de fenóis totais (147.08 \pm 4.20 mg of GAE/ g de extrato) e flavonóides totais (131.18 \pm 2.31 mg of QE/ g de extrato). A atividade antioxidante dos extratos pode estar relacionada com o teor dos constituintes presentes. Estes resultados também mostram que *A. cacans* pode ser considerada uma fonte valiosa de produtos antioxidantes quando comparada com os antioxidantes padrões.

Abstract

The antioxidant potential of extracts of the *Annona cacans* (pulp, seeds and leaves), *A. coriacea* and *A. sylvatica* (pulp and seeds) (Annonaceae) were investigated, as well as the total phenolics, flavonoids, condensed tannins and ascorbic acid total. The chemical composition was investigated, for the most active extract, using an analytical liquid chromatography (LC) method. Was used to determine the antioxidant activity the method of the 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH), β -Carotene bleaching, and ABTS radical cations. The antioxidant activity of the seed extracts of *A. cacans* was the most active in free radical scavenging (IC_{50} of 25.6 μ g/ml), β -carotene bleaching (AA% of 89.67 μ g/ml), and the ABTS assay system (200.96 μ M trolox/g sample). The seed extracts of *A. cacans* showed phenolic acid and flavonoids (luteolin and kaempferol) by LC; and also showed a high content of phenolic and condensed tannins. On comparative analysis between the extracts of *A. coriacea* and *A. sylvatica*, it was found that the seed extracts of *A. coriacea* demonstrated a moderate antioxidant effect and a free radical scavenging activity of 31.53%, by the DPPH test, 51.59% by the β -carotene bleaching test and 159.50 μ M trolox/g of extract in the ABTS assay. We found that the hydromethanolic seed extract of *A. coriacea* had high total phenol (147.08 ± 4.20 mg of GAE/g of extract) and flavonoid (131.18 ± 2.31 mg of QE/g of extract) content. The antioxidant activity of the extracts was related to the contents of constituents present. These results indicate that *A. cacans* can be considered as a valuable source of antioxidant products when compared with the standard antioxidants.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	08
2. Conclusão.....	10
3. Próximas etapas.....	11
4. Referências.....	12
Anexos	13
Anexo A – Artigo 1: Atividade antioxidante <i>in vitro</i> e análise fitoquímica dos extratos das folhas, sementes e polpa de <i>Annona cacans</i>	14
Anexo B – Article 1: <i>In vitro</i> antioxidant activity and phytochemical analysis of the extracts of <i>Annona cacans</i> leaves, seeds, and pulp.....	31
Anexo C – Artigo 2: Teor de constituintes fitoquímicos e atividade antioxidante dos extratos da semente e polpa de duas espécies de <i>Annona</i> : <i>A. coriacea</i> e <i>A. sylvatica</i>	48
Anexo D – Article 2: Quantification of the phytochemical constituents and antioxidant activity in the seed and pulp extracts of two <i>Annona</i> species: <i>Annona coriacea</i> and <i>Annona sylvatica</i>	65
Anexo E - Normas da Revista para Artigo 1 - The Journal of Food Composition and Analysis.....	87
Anexo F – Normas da Revista para Artigo 2 - Brazilian Journal of Biology.....	103

1. Introdução

Dentre as várias potencialidades das plantas medicinais, a capacidade antioxidante tem recebido grande destaque uma vez que inibe a produção de radicais livres no organismo (Krishnaiah et al., 2007). O excesso desses radicais leva ao “stress” oxidativo, responsável pelo desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas, Alzheimer, e no processo de envelhecimento (Ames et al., 1995; Lang et al., 1998). Estas doenças podem ser prevenidas ou curadas pela ingestão regular de agentes antioxidantes naturais (Atoui et al., 2005). Estudos clínicos têm mostrado que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são potencialmente ativos para reduzir a incidência de doenças crônicas e degenerativas (Shahidi, 1996).

O gênero *Annona* (Annonaceae), possui frutos popularmente conhecidos como “araticum” ou “marolo”, são muito utilizados na alimentação local por sua polpa doce e aromática, são consumidos ao natural e na forma de doces, geleias e outros (Roesler et. al., 2007). Destaca-se por apresentar propriedades farmacológicas, como antitumoral, antimalarial, anti-helmíntica, antimicrobiana, parasiticida, inseticida e antisséptica (Alali, 1999). A ação farmacológica é atribuída principalmente aos alcalóides, acetogeninas, amidas e flavonóides, principais constituintes bioativos encontrados em anonáceas (Chen, et al., 2001; Bermejo et al., 2005).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, porém algumas são consideradas mais apropriadas que outras, dependendo da natureza dos compostos presentes na constituição de cada amostra. Deste modo, existem métodos para amostras ricas em compostos hidrofílicos e lipofílicos (Duarte-Almeida et al., 2006; Sucupira et al., 2012). Os métodos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* são FRAP (capacidade de redução de metal), ABTS (capacidade de remoção de radical orgânico), DPPH (peroxidação do radical DPPH•), ORAC (remoção de um radical peroxil) e o método de branqueamento de β -caroteno (quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos) (Sucupira et al., 2012).

Diversos autores preconizam a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio utilizado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (Huang et al., 2005).

Em função dos aspectos discutidos e a fim de buscar a valorização das plantas do cerrado, viu-se a necessidade de estudar o gênero *Annona* visando avaliar o potencial antioxidante e os constituintes presentes em *Annona cacans*, *A. coriacea* e *A. sylvatica*.

2. Conclusão

Na análise de *Annona cacans* observou-se que o extrato das sementes apresentou maior atividade antioxidante na eliminação de radicais livres (IC_{50} 25,6 ug / ml), no método do branqueamento do β -caroteno (AA % de 89,67 ug / ml) e no ensaio de ABTS (200,96 μ M trolox / g de amostra). Os extratos das sementes de *A. cacans* também demonstraram um alto teor de compostos fenólicos (644.40 mg de ácido gálico/g de extrato) e de taninos condensados (411.09 mg de catequina/g de extrato). Ainda, através da análise de CL, apresentaram ácidos fenólicos e flavonóides (luteolina e canferol).

Na análise comparativa de *A. coriacea* e *A. sylvatica* verificou-se que o extrato das sementes de *A. coriacea* apresentou um efeito antioxidante moderado e exibiu atividade sequestradora de radicais livres de 31,53% pelo teste do DPPH, 51,59% pelo teste de branqueamento do β -caroteno e de 159,50 μ M trolox/g de extrato no ensaio do ABTS. Ainda apresentou o maior teor de fenólicos totais ($147,08 \pm 4,20$ mg extrato EAG/g) e maior teor de flavonoides totais ($131,18 \pm 2,31$ mg EQ/g extrato). Com relação ao o teor de taninos condensados e o teor de ácido ascórbico total observou-se que os resultados encontrados em todos os extratos não foram significativos. Mostrando que o efeito antioxidante pode ser atribuído ao teor de fenóis e flavonóides presentes.

3. Próximas Etapas

A partir dos resultados obtidos observa-se a necessidade de uma análise mais criteriosa do extrato a fim de identificar as moléculas biologicamente ativas presente no extrato dentre eles taninos para *A. cacans*, seguido pelo teste de toxicidade das espécies avaliadas, novas avaliações antioxidantes com outras concentrações e ainda avaliação *in vivo*.

4. Referências

- Alali, F.Q. Liu, X. and McLaughlin, J.L. (1999). Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, 62(3), 504-540.
- Ames, B. N.; Gold, L. S.; Wilet, W. C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 5258-5265.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, 27–36.
- Bermejo, A., Figadere, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E., Cortes, D. (2005). Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Product Reports*, 22, 269-303.
- Chen, C.Y., Chang, F.R., Pan, W.B., Wu, Y.C. (2001). Four alkaloids from *Annona cherimoya*. *Phytochemistry*, 56, 753-757.
- Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2006). Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 446-452.
- Huang, D.; Ou, B. and Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6), 1841-1856.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. and Bono, A. (2007) Phytochemical antioxidants for health and medicine – A move towards nature. *Biotechnology and Molecular Biology*, 1 (4), 97-104.
- Lang, A. E.; Lozano, A. M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *New England Journal of Medicine*, 339 (16), 111-114.
- Roesler, R, Catharino, R. R., Malta, L. G., Eberlin, M. N., Pastore, G. (2007). Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 104, 1048–1054.
- Shahidi, F. (1996). Natural Antioxidants: An Overview “in” Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications. *AOCS Press*: Champaign, Illinois, 1-11.
- Sucupira, N.R., Da Silva, A.B., Pereira, G. Da Costa, J.N. (2012). Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 14(4), 263-269.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO 1

Atividade antioxidante *in vitro* e análise fitoquímica dos extratos das folhas, sementes e polpa de *Annona cacans*.

Roseane Soares Ramos Benites ^a, Anelise Samara Nazari Formagio ^{b*}, Eliana Janet Sanjinez Argandoña ^a, Maria do Carmo Vieira ^b.

^a Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brasil.

^b Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brasil.

^c Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brasil.

* Autor para correspondência. Tel: +55 67 81283141; endereço de E-mail: aneliseformagio@ufgd.edu.br (A. Formagio).

Resumo

Vários estudos vêm sendo realizados, em diferentes partes do mundo, em busca de antioxidantes naturais de origem vegetal. Plantas que contêm alto teor de compostos fenólicos têm sido relatadas também com alta atividade antioxidante. O potencial antioxidante do extrato de *Annona cacans* (Annonaceae) foi investigado, bem como os fenólicos totais, flavonóides e taninos condensados. A composição química foi investigada através do método analítica de cromatografia líquida (CL). Para determinação da atividade antioxidante foram usados os métodos: sequestro do radical livre 1,1- difenil -2- picrilhidrazil (DPPH), branqueamento do β -caroteno e do cátion ABTS. Neste estudo, as folhas, polpa e as sementes foram extraídas com metanol/água (8:2). O extrato das sementes de *A. cacans* apresentou maior atividade antioxidante na eliminação de radicais livres (IC_{50} 25,6 μ g / ml), no método do branqueamento do β -caroteno (AA % de 89,67 μ g / ml) e no ensaio de ABTS (200,96 μ M trolox / g de amostra). Os extratos das sementes de *A. cacans* apresentaram através da análise de CL, ácidos fenólicos e flavonóides (luteolina e

canferol). Também demonstraram um alto teor de compostos fenólicos e taninos condensados (TC). Este é o primeiro relato sobre as propriedades antioxidantes, bem como os dados de CL desta espécie. A relação entre flavonóides, TC, ácidos fenólicos e a atividade antioxidante foi positiva e significativa. A atividade antioxidante pode ser atribuída aos elevados teores de fenólicos encontrados. Estes resultados indicam que *A. cacans* pode ser considerada uma fonte valiosa de produtos antioxidantes quando comparada com os antioxidantes padrões.

Palavras-chave

Annonaceae, Atividade antioxidante, Composição química.

1. Introdução

Antioxidantes são compostos que protegem as células contra os processos causados pelos radicais livres. Vários estudos têm demonstrado que as plantas são fontes antioxidantes naturais, principalmente devido à presença de flavonóides, bem como muitos outros polifenóis, que atuam na eliminação e na redução da formação de radicais livres. Estes compostos são altamente reativos como doadores de hidrogênio ou de elétrons, com o máximo de estabilidade, o que lhes permite manter o elétron desemparelhado, sem causar danos às estruturas celulares (Barreiros *et al.*, 2006; Soares, 2002; Miller, 1996; Pietta, 2000; Knekt *et al.*, 2002; Kaur and Kapoor, 2001; Blokhina *et al.*, 2003). Por isso, compostos, especialmente a partir de fontes naturais, são capazes de proteger contra as espécies reativas de oxigênio (ROS), podem ter aplicação potencial na prevenção e/ou cura de doenças, tais como câncer, diabetes, envelhecimento, aterosclerose, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, e outras doenças degenerativas em humanos (Bibhabasu *et al.*, 2008; Ani and Kamatham, 2011).

Annona cacans Mart., Annonaceae, conhecida popularmente como "araticum cagão", "araticum de paca", "anona cagona", ou "corticeiro" e "cortição" é originada de Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Na medicina tradicional é usada para a constipação (Silva e

Soares, 2002). Estudos fitoquímicos de *Annona* indicam a presença de acetogeninas em *Annona glabra*, *A. jahnii*, *A. spinescens*, *A. Spasmus*, *A. crassiflora*, *A. coriacea* e *A. cornifolia*. Esta classe de compostos é extremamente citotóxica para as células tumorais humanas (Alali et al., 1999; Santos et al., 2007; Neto et al., 2010).

O interesse no potencial antioxidante da *A. cacans* aumentou devido a presença de compostos fenólicos e flavanóides encontrados em outras espécies, tais como: *A. crassiflora*, *A. tomentosa*, *A. monticola*, *A. warmingiana*, *A. dioica*, *A. cherimola* e *A. squamosa* (Santos & Salatino, 2000; Formagio et al, 2013;. Loizzo et al, 2012;. Seetharaman, 1986) e porque não há relatos de estudos sobre essa espécie na literatura.

Tendo em vista a ausência de informação sobre a composição química e atividade biológica de *A. cacans*, bem como sobre as atividades atribuídas aos compostos fenólicos, este estudo teve como objetivo determinar a composição química e avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *A. cacans* usando métodos fotocolorimétricos. Também avaliou-se o nível de compostos fenólicos, taninos condensados e flavonóides. A composição química do extrato ativo foi caracterizada por meio de cromatografia líquida.

2. Materiais e métodos

2.1. Material vegetal e preparação do extrato

Os frutos e as folhas de *A. cacans* foram coletados em dezembro de 2011, no município de Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, em uma altitude média de 452 m; 23°17'6" S latitude, e 54°43'28" W longitude. As plantas foram identificadas pela Dra. Zefa Valdevina Pereira, professora da Universidade Federal da Grande Dourados e, um exemplar foi depositado no Herbário desta Universidade com nº DDMS 4885. Para a preparação dos extratos a polpa, sementes e folhas foram secas em estufas, e extraídas separadamente por maceração com metanol/água (8:2), à temperatura ambiente, durante 20 dias, Os extratos foram filtrados, concentrado em rota-evaporador, a 50 °C e

posteriormente liofilizados. O rendimento dos extratos foi determinado a partir da massa de material antes da extração e da massa do extrato obtido após a remoção de metanol/água. O rendimento de extração foi calculado em porcentagem (Tabela 1).

2.2. Produtos químicos e reagentes

1,1-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) e butil hidroxitolueno (BHT) foram adquiridos de Sigma Chemical Co. (MO, EUA). 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) da Sigma-Aldrich (Índia). 2,2-azinobis ácido 3-etil-benzotiazolil-6-sulfônico (ABTS•), 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox), persulfato de potássio, Tween 40 e quercetina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Catequina da Sigma-Aldrich (China). Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio foram obtidos da Dinâmica (SP, Brasil). β -caroteno foi adquirido da Sigma-Aldrich (Alemanha). Ácido sulfúrico da FMAIA (SP, Brasil). Metanol de grau analítico, etanol, ácido clorídrico, ácido ascórbico, clorofórmio, ácido linoleico, ácido gálico, cloreto de alumínio, acetato de sódio e vanilina foram adquiridos da Vetec (RJ, Brasil). Acetonitrila-HPLC da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os padrões [ácido caféico (98%), ácido p-cumárico (98%), ácido ferulico (99%), ácido sinápico (98%), luteolina (98%), canferol (98%), e apigenina (95%)] foram adquiridos da Sigma–Aldrich.

2.3. Teor de polifenóis totais (PFT)

O conteúdo fenólico total de cada extrato hidrometanólico foi determinado usando o reagente Folin-Ciocalteu (Djeridane *et al.*, 2006). 100 μ L do extrato em metanol (1g/L) foi misturado com 1,0 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v). Após 3 min foi adicionado 1,5 mL de uma solução saturada de Na_2CO_3 (2%). Após 30 min, a absorbância foi medida a 765 nm utilizando um espectrofotômetro. O teor de fenólicos foi calculado usando uma curva padrão de ácido gálico preparado em solução de metanol a 80%, e os

resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. A solução de metanol foi utilizada como branco. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4. Teor de flavonóides totais (FT)

Para determinar o teor de flavonóides, 500 µL de cada extrato em metanol (1g/L) foram misturados com 1,50 mL de solução de etanol a 95%, 0,10 mL de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 10%, 0,10 mL de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 M) e 2,80 mL de água destilada. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante 40 min. A absorbância foi medida a 415 nm utilizando espectrofotômetro. O mesmo procedimento foi realizado para a análise do branco, utilizando-se metanol HPLC no lugar da amostra (Lin e Tang, 2007). Para calcular a concentração de flavonóides, foi preparada uma curva padrão com diferentes concentrações (2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 25,0, 50,0, 100,0 e 125,0 µg) utilizando como padrão a quercetina. Utilizou-se estes dados para gerar um modelo de regressão linear, e a equação de reta foi obtida e usada para o cálculo das amostras experimentais. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de extrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5. Taninos condensados (TC)

Para determinar a concentração de taninos condensados foi utilizada uma versão modificada do método desenvolvido por Maxson & Rooney (1972). 1 mL do extrato em metanol (1g/L) foi misturado com 5 mL de reagente de vanilina HCl (8% de HCl concentrado em metanol e 4% de vanilina em metanol). A absorbância foi lida a 500 nm após 20 min. A catequina foi usada como padrão. Os resultados foram expressos em miligramas de catequina por grama de extrato.

2.6. Atividade sequestradora de radicais livres no ensaio de DPPH•

A capacidade de seqüestrar radicais livres dos extratos foi determinada usando o método do radical livre 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) (Blois, 1958). Várias concentrações das amostras foram adicionadas a 2 mL de solução metanólica de DPPH (0,1 mM) preparada diariamente. A mistura foi agitada e deixou-se em repouso à temperatura ambiente, em local escuro. Após 30 min a absorbância foi medida a 515,5 nm versus o branco que continha todos os reagentes, exceto as amostras do teste. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Butil-hidroxitolueno (BHT) foi utilizado como controle positivo. O IC₅₀ (Tabela 1) correspondem as concentrações necessárias para inibir 50% do DPPH e foi calculado a partir do gráfico de I% (porcentagem de inibição) versus a concentração do extrato em microgramas por mililitros (µg/mL). A porcentagem de inibição do DPPH foi calculada usando a seguinte equação: %I = $(A_0 - A/A_0) \times 100$, onde A₀ é a absorbância de DPPH (controle), e A é a absorbância da amostra com DPPH.

2.7. Teste de branqueamento do β-caroteno

A solução β-caroteno foi preparada por dissolução de 2 mg de β-caroteno em 10 mL de clorofórmio. 1 mL de solução de β-caroteno-clorofórmio foi pipetada em um balão rotativo contendo 20 mg de ácido linoleico e 200 mg de Tween 40. Em seguida procedeu-se a rota-evaporação do clorofórmio a 45°C. Foi adicionada água destilada (50 ml) lentamente e agitou-se vigorosamente até formar uma emulsão. Alíquotas de 5 mL da emulsão foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,2 mL da amostra dos extratos. As amostras de controle foram preparadas com 0,2 mL de metanol no lugar do extrato (Jayaprakasha et al., 2001; Kaur & Kapoor 2002; Shahidi et al., 2001). Assim que a emulsão foi adicionada a cada tubo, a absorbância foi lida a 470 nm (tempo zero). Os tubos foram colocados então em banho-maria a 50°C e a oxidação da emulsão foi monitorada

em intervalos de 15 min efetuando-se a leitura da absorção em cada intervalo, até que a cor da solução de β -caroteno na amostra controle tivesse desaparecido (105 min). As análises foram realizadas em triplicata. A atividade antioxidante (AA) foi calculada como percentual de inibição relativa ao controle com a seguinte equação: $AA\% = [1 - (A_i - A) / (A_i - A't)] \times 100$, em que A_i é a absorbância amostra no tempo zero; A_t é a absorbância da amostra após a incubação (105 min) a 50°C; A_i é a absorbância do controle no tempo zero; $A't$ é a absorbância do controle após incubação (105 min) a 50°C.

2.8. Ensaio ABTS•

A atividade antioxidante foi calculada utilizando o método de eliminação de radicais azino-bis (ácido etil-benzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) descrito por Rufino e colaboradores (2007) com pequenas modificações. Inicialmente 7 mM de ABTS e 140 mM de persulfato de potássio foram misturados para formar o radical cátion (ABTS•+) e foram mantidos na ausência de luz, por 16 horas em temperatura ambiente. A solução então foi diluída em etanol até obter-se a absorbância de 0,70 (\pm 0,05) nm a 734 nm. Para análise da amostra, 3 mL da solução diluída de ABTS•+ foi adicionada a 30 μ l de cinco diferentes diluições dos extratos metanólicos e misturados cuidadosamente.

A mistura foi deixada descansar (6 min) no escuro em temperatura ambiente, e a absorbância foram lida a 734nm utilizando etanol como branco. A curva de calibração foi realizada utilizando soluções etanólicas de Trolox em diferentes concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 μ M. Os resultados foram expressos em μ Mol de trolox equivalente por grama de extrato.

2.9. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CL)

O extrato hidrometanólico da amostra foi analisado em um sistema analítico por cromatografia líquida (Varian 210), com um sistema ternário de solvente equipado com um autoamostrador, um detector de arranjo de diodos (PDA)

monitorado em $\lambda = 200-800$ nm. A coluna de LC foi uma C-18 (25 cm x 4.6 mm; tamanho da partícula 5 μm ; Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA) precedida de pré-coluna (2.5 cm x 3 mm) com mesmas características, usada para proteger a coluna analítica. Em cada análise a vazão e o volume injetado foram de 1.0 mL min^{-1} e 20 μL , respectivamente. Todas as análises cromatográficas foram

realizadas a temperatura de 22^oC. A eluição foi realizada utilizando ácido acético (6%) e acetato de sódio (2 mM) (solvente A) e acetonitrila (solvente B). O sistema de eluição foi: 0 min, 5%B, 45 min, 15%, 55 min, 30% B, 60 min, 100%B e 75 min, retornando ao estágio inicial.

Linearidade

A estimativa do conteúdo dos padrões [ácido caféico (98%), ácido p-cumarico (98%), ácido ferúlico (99%), ácido sinapico (98%), luteolina (98%) e canferol (98%)] na amostra foi realizada por calibração externa. Aliquotas de 20 μL de cada diluição foram analisadas por CL com cinco repetições. Para o padrão, foi obtido um cromatograma correspondente e construído um gráfico a partir das médias dos valores obtidos contra os padrões de concentração de 1-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Uma análise de regressão linear dos mínimos quadrados das áreas dos picos em função das concentrações foi realizada para determinar os coeficientes de correlação. Os mesmos parâmetros da análise da curva padrão foram usados para obter as concentrações das amostras.

2.11. A análise estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Basic Statistic. A diferença significativa entre os valores médios das amostras foi determinada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. Resultados e discussão

Os antioxidantes de origem natural são considerados a única alternativa em substituição aos antioxidantes sintéticos no combate à doenças associadas aos radicais livres. Um grande número de substâncias presentes naturalmente foi reconhecido por possuírem capacidade antioxidante e, vários métodos *in vitro* têm sido utilizados para avaliar a eliminação dos radicais livres e a atividade antioxidante.

O potencial antioxidante da *A. cacans* foi investigado usando diferentes métodos *in vitro*. Entre os extratos avaliados, o extrato das sementes de *A. cacans* demonstrou um efeito antioxidante significativo e exibiu a maior atividade na eliminação de radicais livres, com um valor de IC₅₀ de 25,6 µg/mL, comparável ao antioxidante comercial BHT (16,72 µg/mL) pelo ensaio de DPPH. As sementes também apresentaram elevada atividade antioxidante (89,67%) pelo teste do branqueamento do β-caroteno e 200.96 µmol/g de amostra no ensaio de ABTS (Tabela 1).

Os solventes polares, tais como metanol (MeOH), podem formar uma ligação de hidrogénio com o grupo difenilamino do DPPH, o que reduziria a desaparelhamento de elétrons no DPPH e, portanto, causar uma melhor reatividade.

A figura 1 mostra o teor total de fenólicos e flavonóides e taninos condensados (TC) dos extratos de *A. cacans*. O extrato das sementes exibiram o maior conteúdo de fenóis totais com 644.40 mg de ácido gálico/g de extrato e teor de taninos condensados de 411.09 mg de catequina/g de extrato. O extrato das folhas apresentaram teor de flavonoides de 250.66 mg de quercetina/g de extrato.

O extrato das sementes de *A. cacans* exibiu os maiores efeitos antioxidantes e dados de CL foram desenvolvidos para identificar seus principais componentes (Fig. 2). A identificação dos compostos com o auxílio do detector PDA na faixa espectral de 200-800nm não revelou interferências no tempo de retenção das amostras pelos métodos de eluição desenvolvidos. Padrões foram

facilmente identificados e quantificados com base em seus espectros de absorção na região UV e no tempo de retenção. Padrões encontrados no extrato foram identificados pela realização de experimentos da co-injeção, na qual alíquotas do extrato e padrões foram misturadas e diluídas para um volume conhecido e analisados através de CL.

A curva de calibração foi determinada por regressão linear usando CL. A linearidade dos padrões foi avaliada para faixa de 10 concentrações. Os erros de padrão médios para as áreas de pico de injeções replicadas ($n = 5$) foram menores que 2%, assim mostrando boa repetibilidade da curva de calibração. Os respectivos coeficientes de determinação (r^2) foram 0.9992 para, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinapico e $r^2 = 0.9994$ para luteína e canferol. O tempo de retenção dos padrões e conteúdos nas amostras é apresentado na Tabela 2. Os efeitos antioxidantes observados para o extrato são provavelmente devido a presença do kaempferol e luteolina, uma vez que a atividade antioxidante destes flavonóides tem sido relatada na literatura (Seyoum *et al.*, 2006). Os resultados obtidos também indicam que mesmo em níveis baixos (Fig. 1) são altamente ativos. A eficácia da ação antioxidante dos polifenóis é dependente da estrutura molecular dos compostos e diferenciados pelo número e posição da hidroxila presente na molécula, em que expressam propriedades redutoras (Rice-Evans *et al.*, 1997). Acredita-se que o que contribui marcadamente para a habilidade dos flavonóides é o número de hidroxilas fenólicas, a presença do sistema *ortodihidroilação* do anel B, uma ligação dupla C2- C3conjugada com a função 4-oxo no anel C ou de um grupo hidroxila no C-3 (Burda & Oleszek, 2001).

Assim, é possível que uma amostra possa apresentar um teor considerável de fenóis, e não apresentar uma elevada capacidade antioxidante. Este é o primeiro relato sobre as propriedades antioxidantes e dados de CL dos extratos de *A. cacans*.

Roesler et al. (2007), na investigação dos componentes químicos do extrato etanólico da polpa e das sementes de *A. crassiflora* por espectrometria de massa

com ionização (ESI-MS), relatou a presença de importantes componentes bioativos, conhecidos por apresentarem potencial antioxidante, como o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido quínico, ácido ascórbico, xanthoxilina, rutina, ácido cafeoil-tartárico e cafeoil-glicose. Em nosso estudo, também foram encontrados no extrato hidrometanólico das sementes de *A. cacans* o ácido caféico e ferúlico por CL. Diversos outros estudos relatam a atividade antioxidante de compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico e benzóico, fornecendo suporte em nossa pesquisa. (Morton et al., 2000; Hsieh et al., 2005; Gadow et al., 1997; Ramalho e Jorge, 2006),

Em conclusão, o presente estudo demonstra, dentre os extratos avaliados, o extrato das sementes de *A. cacans* apresentou promissora atividade antioxidante, a qual pode ser atribuída aos compostos evidenciados no extrato, fornecendo suporte ao uso natural dos frutos desta planta na remoção de radicais livres, confirmando a sua função terapêutica. Os resultados apresentados ressaltam a necessidade de uma análise mais criteriosa do extrato a fim de identificar as moléculas biologicamente ativas presente no extrato dentre eles taninos, seguido pelo teste de toxicidade.

4. Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

5. Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela UFGD, Fundect e Capes.

6. Referências

- Alali, F. Q., Liu, X. X., Mclaughlin, J. L. (1999). Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products*, 62, 504-540.
- Ani V, Kamatham AN. 2011. Antioxidant potential of bitter cumin (*Centratherum anthelminticum* (L.) Kuntze) seeds in vitro models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11, 40.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29, 113.

- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199- 1200.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91, 179–194.
- Bibhabasu H, Santanu B, Nripendranath M. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8, 63.
- Burda, S & Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 2774.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- Formagio A. S., Kassuya C. A., Neto F. F., Volobuff C. R., Iriguchi E. K., Vieira M. do C., Foglio M. A. (2013). The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 13-14.
- Gadow, V. A., Joubert, E., Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(3), 632-638.
- Hsieh, C. L., Yen, G. C., Chen, H. Y. J. (2005). Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(15), 6151-6155.
- Jayaprakasha G. K., Singh R. P., Sakariah K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73, 285-290.
- Kaur, C. & Kapoor, H. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703–725.
- Kaur, C., & Kapoor, H.C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 37, 153- 161.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560–568.
- Lin, J. Y., & Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101, 140.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., Menichini, Francesco, F. (2012). Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in

- relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25, 179–184.
- Maxson E. D., & Rooney L. W. (1972). Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chemistry*, 49, 719-729.
- Miller, A. L. (1996). Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alternative Medicine Review*, 1, 103–111.
- Morton, L. W. Abu-Amsha Caccetta R, Puddey I. B., Croft K. D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 27(3), 152-59.
- Neto, R. M. R.; Santos, J. S.; Silva, M. A.; Koppe, V. C. (2010). Potencialidades de uso de espécies arbustivas e arbóreas em diferentes fisionomias de cerrado, em Lucas do Rio Verde/MT. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 10(2).
- Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants (Review). *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.
- Ramalho, V. C. e Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), 755-760.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Science*, 2, 304- 309.
- Roesler, R, Catharino, R. R., Malta, L. G., Eberlin, M. N., Pastore, G. (2007). Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 104, 1048–1054.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. *Comunicado Técnico*, ISSN 1679-6535. Fortaleza, CE.
- Santos, D. Y. A. C. & Salatino, M. L. F. (2000). Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, 55, 567-573.
- Santos, L. A. R.; Pimenta, L. P. S.; Boaventura, M. A. D. (2007). Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A. St - Hil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 9(3),48-51,.
- Seetharaman, T. R. (1986). Flavonoids from the leaves of *Annona squamosa* and *Polyalthia longifolia*. *Fitoterapia*, 57,189-198.
- Seyoum A., Asres K., El-Fiky F. K. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058-2070.
- Shahidi F., Chavan U. D., Naczki M., Amarowicz R. (2001). Nutrient distribution and phenolic antioxidants in air-classified fractions of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 926-933.

Silva, L. A. e Soares, J. J. (2002). Levantamento fitossociológico em um fragmento de floresta estacional semidecídua, no município de São Carlos, SP. *Acta Botânica Brasilica*, 16(2): 205-216.

Soares, S.E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15(1):71-81.

Tabelas

Tabela 1: Atividade antioxidante dos extratos de *A. cacans* pelos métodos do DPPH, branqueamento do β -caroteno, e ensaio do ABTS.

Espécie	Extrato	Ensaio da atividade antioxidante		
		DPPH• (IC ₅₀ µg/mL)	Branqueamento do β -caroteno (AA %)	ABTS• (µM trolox/g amostra)
<i>A. cacans</i>	Folhas	68.33 ± 5.64	70.05 ± 8.10	86.56 ± 7.82
	Polpa	454.08 ± 17,29	51.51 ± 5,37	39.32 ± 5,98
	Semente	25.67 ± 2,46	89.67 ± 1.88	200.96 ± 10,33
BHT		16.72 ± 1,87	91.20 ± 4,54	-

Tabela 2: Tempo de retenção dos padrões e concentração em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ do extrato hidrometanólico da semente de *A. cacans* através da análise de CL.

Pico	Padrões	Tempo de retenção (min)	λ (nm)	Conteúdo na semente
1	Ácido cafeico	14.64	325	178
2	Ácido p-cumárico	25.48	315	159
3	Ácido ferúlico	31.28	325	266
4	Ácido sinápico	33.96	325	299
5	luteolina	60.08	350	263
6	canferol	68.08	250	478

Figuras

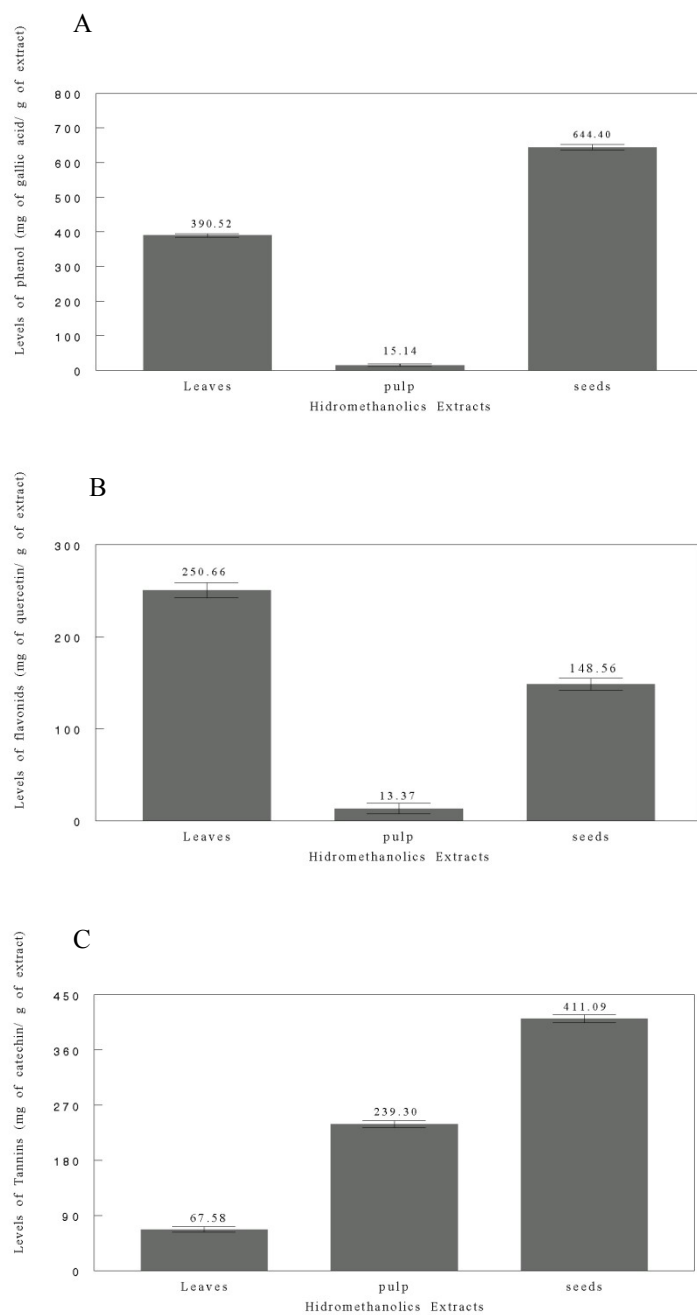


Figura 1: Teores de constituintes nos extratos hidrometanólicos de *A. cacans*

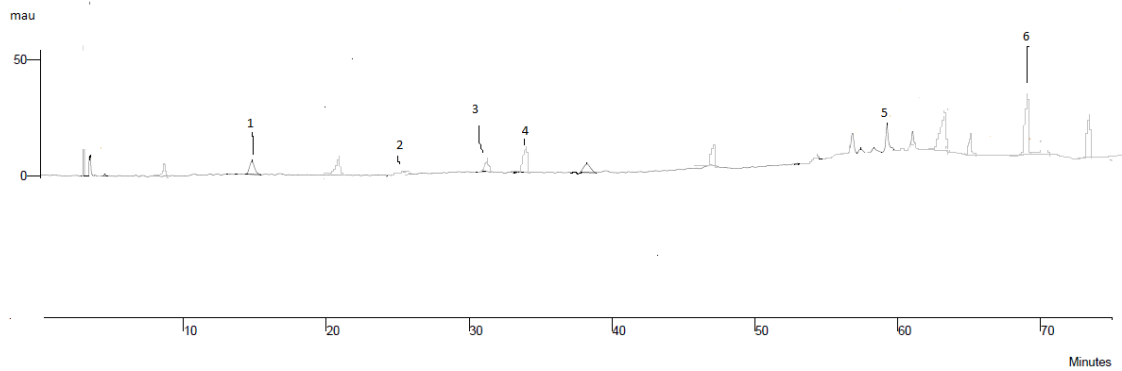


Figura 2: Cromatograma do extrato das sementes de *A. cacans*

Anexo B – Article 1

***In vitro* antioxidant activity and phytochemical analysis of the extracts of *Annona cacans* leaves, seeds, and pulp**

Roseane Soares Ramos Benites ^a, Anelise Samara Nazari Formagio ^{b*}, Eliana Janet Sanjinez Argandoña ^a, Maria do Carmo Vieira ^b.

^a *Faculty of Exact Sciences and Technology, University Federal of Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brazil.*

^b *Faculty of Agricultural Sciences, University Federal of Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brazil.*

^c *Faculty of Biological and Environmental Sciences, University Federal of Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brazil.*

*Corresponding author. Tel.: +55 67 81283141; E-mail address: aneliseformagio@ufgd.edu.br (A. Formagio).

Abstract

Several studies are being carried out worldwide, which are directed toward finding natural antioxidants of plant origin. Plants containing phenolic compounds have been reported to possess a strong antioxidant activity. The antioxidant potential of the extract of *Annona cacans* (Annonaceae) was investigated, as well as the total phenolics, flavonoids, and condensed tannins. The chemical composition was investigated using an analytical liquid chromatography (LC) method. Was used to determine the antioxidant activity the method of the 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH), β -Carotene bleaching, and ABTS radical cations. In this study, the leaves, pulp, and seeds were extracted using

methanol/water (8:2). The antioxidant activity of the seed extracts of *A. cacans* was the most active in free radical scavenging (IC₅₀ of 25.6 µg/ml), β-carotene bleaching (AA% of 89.67 µg/ml), and the ABTS assay system (200.96 µM trolox/g sample). The seed extracts of *A. cacans* showed phenolic acid and flavonoids (luteolin and kaempferol) by LC; and also showed a high content of phenolic and condensed tannin (CT). This is the first report on the antioxidant properties, as also on the LC data of the extracts of the species. The relationship between flavonoids, CT, and phenolic acids and the antioxidant activity was positive and significant. This antioxidant activity could be attributed to its high phenolic contents. These results indicate that *A. cacans* can be considered as a valuable source of antioxidant products when compared with the standard antioxidants.

Keywords

Annonaceae, Araticum, antioxidant activity, composition

1. Introduction

Antioxidants are compounds that protect cells against free mediated processes. Several studies have demonstrated that plants are natural antioxidant sources, due mainly to the presence of flavonoids, like many other polyphenols, which act in reducing free radical formation and also in scavenging. These compounds are highly reactive as hydrogen or electron donors, with maximum stability, which allows them to retain the unpaired electron without causing damage to the cell structures (Barreiros *et al.*, 2006; Soares, 2002; Miller, 1996; Pietta, 2000; Knekt *et al.*, 2002; Kaur and Kapoor, 2001; Blokhina *et al.*, 2003). Hence compounds, especially from natural sources capable of protecting against reactive oxygen species (ROS)-mediated damage, may have the potential application for the prevention and/or curing of diseases, such as cancer, diabetes, aging, atherosclerosis, cardiovascular diseases, inflammatory diseases, and other degenerative diseases in humans (Bibhabasu *et al.*, 2008; Ani and Kamatham, 2011).

Annona cacans Mart., Annonaceae, popularly known as “araticum cagão”, “araticum de paca”, “anona cagona”, or “corticeiro” e “cortição” is a source from Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, and São Paulo. In traditional medicine, it is used for constipation (Silva & Soares, 2002). Phytochemical studies on the fruit of *Annona* indicate the presence of acetogeninas in *Annona glabra*, *A. jahonii*, *A. spinescens*, *A. nutans*, *A. crassiflora*, *A. coriacea*, and *A. cornifolia*. This class of compounds is extremely cytotoxic to human tumor cells (Alali *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2007; Neto *et al.*, 2010).

Interest in the antioxidant potential of *A. cacans* was enhanced by the presence of phenolic and flavanoid substances present in other species, such as, *A. crassiflora*, *A. tomentosa*, *A. monticola*, *A. warmingiana*, *A. dioica*, *A. cherimola*, and *A. squamosa* (Santos & Salatino, 2000; Formagio *et al.*, 2013; Loizzo *et al.*, 2012; Seetharaman, 1986) and because there were no reports on these species in the literature of these studies.

In the absence of any information on the chemical composition and biological activity of *A. cacans*, as also on the activities assigned to phenolic compounds, the aim of this study was to determine the chemical composition and evaluate it through the antioxidant activities of the extracts of *A. cacans* by using fotocolorimétricos methods. The aim was also to determine the level of phenolic compounds, tannins, and flavonoids. The chemical composition of the active extract was characterized through the analytical chromatographic method.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material and extract preparation

The fruits and leaves of *A. cacans* were collected in December 2011, in Dourados, in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, at an average altitude of 452 m; 23°17'6" S latitude, and 54°43'28" W longitude. The plant was identified by Dra Zefa Valdevina Pereira, who is a Professor at the University Federal of the Grande Dourados, and was deposited at the Herbarium in this University with Voucher No. DDMS 4885. For preparing extracts, fruit pulp, air-dried and powdered seeds, and leaves were separately and successively extracted for 20 days by maceration with

methanol/water (8:2), at room temperature. The extract was filtered, concentrated under pressure in a Roto Evaporator at 50°C and lyophilized. The extraction yield of crude extracts was determined from the mass of the material prior to extraction and the mass of extract obtained after removal of methanol/water. The extraction yield was calculated in percentage after weighing.

2.2. Chemicals and reagents

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and butylated hydroxytoluene (BHT) were procured from the Sigma Chemical Co. (MO, USA). 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), potassium persulfate, Tween 40, and quercetin were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Catechin was from Sigma–Aldrich (China). Folin-Ciocalteu and sodium carbonate were from Dinamina (SP, Brazil). β -carotene was from Sigma–Aldrich (Germany). Sulfuric acid was from Fmaia (SP, Brazil). Analytical-grade methanol, ethanol, hydrochloric acid, chloroform, linoleic acid, gallic acid, aluminum chloride, sodium acetate, and vanillin were obtained from Vetec (RJ, Brazil). Spectroscopy-grade acetonitrile was purchased from Merck (Darmstadt). The stock mixture of standards comprised of an individual solution dissolved in acetonitrile, which was then used as an external standard. The standards [caffeic acid (98%), p-coumaric acid (98%), ferulic acid (99%), sinapic acid (98%), luteolin (98%), kaempferol (98%), and apigenin (95%)] were purchased from Sigma–Aldrich.

2.3. Determination of total phenol content

The total phenolic content in each extract was determined using the Folin-Ciocalteu reagent (Djeridane *et al.*, 2006). Specifically, 100 μ L of extracts in methanol (1 g/L) were mixed with 1.0 mL of distilled water and 0.5 mL of Folin-Ciocalteu's (1:10 v/v) reagent. After 3 min, 1.5 mL of a saturated solution of Na_2CO_3 (2%) was added. After 30 min, the absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer. The quantification was carried out using a standard curve of gallic acid prepared in 80% methanol and the results were expressed in milligrams

of gallic acid equivalent per gram of extract. The methanol solution was used as a blank. All of the assays were carried out in triplicate.

2.4. Determination of total flavonoids

To determine the level of flavonoids, 500 μL of each extract was mixed with 1.50 mL of 95% ethanol, 0.10 mL of 10% aluminum chloride ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0.10 mL of acetate sodium ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 M), and 2.80 mL of distilled water. The tubes were kept at room temperature for 40 min. The optical density was measured at 415 nm, using a spectrophotometer. The same procedure was used for analysis of the blank (Lin & Tang, 2007). To calculate the concentration of flavonoids, we prepared a calibration curve (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0, 100.0, and 125.0 μg) using quercetin as the standard. We then used these data to generate a linear regression model, and the line equation obtained was used for the calculation of the experimental samples. The results were expressed in milligrams of quercetin equivalents per gram of extract. All of the assays were carried out in triplicate.

2.5. Condensed tannins

Condensed tannin (CT) concentrations were determined by a modified version of the method developed by Maxson & Rooney, (1972). The samples were mixed with 5 mL vanillin hydrochloric acid (HCl) reagent (8% concentrated HCl in methanol and 4% vanillin in methanol). The absorbance at 500 nm was read after 20 min. Catechin was used as the standard. The results were calculated in milligrams of tannins per gram of samples.

2.6. DPPH free radical scavenging assay

The free radical scavenging activities of the extract were determined using the 1, 1-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) method (Blois, 1958). Various concentrations of the samples were added to 2 mL of a methanol DPPH solution (0.1 mM) that was prepared daily. The mixture was shaken and left to stand at room temperature, in the dark. After 30 min, the absorbance was measured at 517 nm against a blank containing all of the reagents except the one

in the test samples. All of the assays were carried out in triplicate. BHT was used as the positive control. IC₅₀ (the concentration required for 50% inhibition of DPPH) was calculated using the graph of inhibition of the DPPH percentage (%I) versus the extract concentration in milligrams per milliliter (mg/mL).

The IC₅₀ (Table 1) corresponded to the concentrations of 50% of the inhibition of DPPH and was calculated from the graph of I% (inhibition percentage) versus extract concentration in micrograms/milliliter (µg/mL). The percentage of DPPH inhibition (%I) was calculated using the following equation: %I = (A₀ - A/A₀) x 100, where A₀ is the absorbance of DPPH (control) and A is the absorbance of the sample with DPPH.

2.7. β-Carotene bleaching test

The β-carotene solution was prepared by dissolving 2 mg β-carotene in 10 mL chloroform. 1 mL β-carotene-chloroform solution was mixed with 20 mg linoleic acid and 0.2 g Tween 40. Subsequently chloroform was removed by a rotary evaporator at 45°C. Distilled water (50 mL) was slowly added with vigorous agitation to form an emulsion. Emulsion aliquots (5 mL) were transferred with 0.2 mL of sample extracts. Control samples were prepared with 0.2 mL methanol instead of extracts (Jayaprakasha *et al.*, 2001; Kaur & Kapoor 2002; Shahidi *et al.*, 2001). As soon as the emulsion was added to each tube, zero time absorbance was read at 470 nm against a blank. The tubes were placed in a water bath at 50°C and the oxidation of the emulsion was monitored by the subsequent reading of absorbance at 15 min intervals, until the color of the β-carotene in the control sample had disappeared (105 min). BHT was used as reference. Analyses were performed in triplicate. The antioxidant activity (AA) was calculated as the percent of inhibition relative to the control, using the following equation: AA = [1 - (A_i - A_t) / (A_i' - A_t')] x 100, where A_i = absorbance of sample at zero time; A_t = absorbance of sample after incubation (105 min) at 50°C; A_i' = absorbance of the control at zero time; A_t' = absorbance of control after incubation (105 min) at 50°C.

2.8. ABTS assay

Total antioxidant activity was measured by the improved Azino-bis (ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging (ABTS) method (Rufino *et al.*, 2007), with minor modifications. Briefly, 7.0 mM ABTS and 140 mM of potassium persulfate were mixed for production of the ABTS cation (ABTS^{•+}) and kept in the dark for 16 hours, at an ambient temperature. ABTS^{•+} solution was diluted with ethanol (P.A.) till the absorbance obtained was 0.700 (\pm 0.05) at 734 nm. For sample analysis 3 mL of diluted ABT^{•+} solution was added to 30 μ L of five different dilutions of methanolic extracts and mixed thoroughly. The reaction mixture was allowed to set (6 min) in the dark, at ambient temperature, and the absorbance was recorded at 734 nm using ethanol (P.A.) as the blank. A standard curve of various concentrations of the ethanolic solution of Trolox in concentrations of 100, 500, 1000, and 2000 μ M was created. The results were expressed in micrometers (μ M) as a Trolox equivalent (TEAC) per one gram of an extract.

2.9. LC analysis of standards and samples

The extract obtained from the sample and the standards were analyzed in an analytical LC (Varian 210) system, with a ternary solvent delivery system, equipped with an auto-sampler and a photodiode array detector (PDA), monitored at λ = 200 - 800 nm. The LC column was a C-18 (25 cm x 4.6 mm; particle size, 5 μ m; Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA), with a small pre-column (2.5 cm x 3 mm) containing the same packing used to protect the analytical column. In each analysis, the flow rate and the injected volume were set as 1.0 mL/min and 20 μ L, respectively. All chromatographic analyses were performed at 22°C. Elution was carried out using acetic acid (6%), sodium acetate (2 mM) (solvent A), and acetonitrile (solvent B). The solvent gradient program was as follows: 0 min, 5% B; 45 min, 15% B; 55 min, 30% B, 60 min, 50% B; 65 min, 100% B, and in 75 min a return to the initial.

Linearity

The content estimation of the standards [caffeic acid (98%), p-coumaric acid (98%), ferulic acid (99%), sinapic acid (98%), luteolin (98%) and kaempferol (98%)]

in the samples was performed by external calibration. Aliquots of 20 μL of the dilutions were analyzed via LC, with each determination being carried out five times. For the standard, the corresponding chromatogram was obtained and a graph was constructed from the mean of the chromatogram areas plotted against the standards in a concentration of 1–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A linear least square regression of the peak areas as a function of the concentrations was performed, to determine the correlation coefficients. The equation parameters (slope and intercept) of the standard curve were used to obtain the concentration values for the samples.

2.10. Statistical analysis

The results were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) using statistics. The significance of the differences between the means was determined by the Tukey's test ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

The antioxidants from natural sources are the only alternatives to synthetic antioxidants in counteracting free radical-associated diseases. A great number of naturally occurring substances have been recognized to have antioxidant abilities and various *in vitro* methods have been used to assess their free radical scavenging and antioxidant activities.

The antioxidant potential of *A. cacans* was studied by using different *in vitro* models. Between the extracts tested, the seed extracts of *A. cacans* demonstrated a substantial antioxidant effect and exhibited the highest free radical scavenging activity with an IC_{50} value of 25.6 $\mu\text{g/mL}$, which was comparable to that of the commercial antioxidant BHT by the DPPH test (16.72 $\mu\text{g/mL}$). The seeds also afforded a higher antioxidant activity (89.67 %) by using the β -carotene bleaching test and a 200.96 $\mu\text{mol/g}$ sample in the ABTS assay (Table 1).

Protic solvents such as methanol (MeOH) may form a hydrogen bond with the diphenylamino group of DPPH, which would reduce electron delocalization in the DPPH, and thus cause better reactivity.

Figure 1 shows the total phenolic and flavonoid content and the condensed tannins (CT) from the extracts of *A. cacans*. The extract of the seeds exhibited the highest total phenolic content of 644.40 mg of gallic acid/g of extract and possessed a condensed tannin content of 411.09 mg of catechin/g of extract. The extract of the leaves exhibited a flavonoid content of 250.66 mg of quercetin/g of extract.

The extract of the seeds of *A. cacans* exhibited the highest antioxidant effects and LC data were developed to identify the main components (Fig. 2). Identification of the compounds with the aid of the PDA detector, scanning in the spectral range of 200–800 nm, did not reveal any interference in the retention time of the samples in LC, by the developed elution method. The standards were easily identified and quantified, based on their absorption spectra in the UV region and in the retention time. The standards found in the extracts were unambiguously identified by performing co-injection experiments in which aliquots of the extracts and standards were mixed and diluted to a known volume and analyzed through LC.

The calibration curves were determined by linear regression, using LC. The linearity for the standards was assessed for 10 concentration ranges. The average standard errors for the peak areas of replicated injections ($n = 5$) were less than 2%, thus showing good repeatability of the calibration curve. The respective coefficients of determination (r^2) were 0.9992 for caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, and $r^2 = 0.9994$ for luteolin and kaempferol. The retention time of standards and contents in the samples are shown in Table 2. The antioxidant effects observed for the extract are probably due to the presence of a high level of kaempferol and luteolin, since the DPPH-free radical activity of these flavonoids has been reported in the literature (Seyoum *et al.*, 2006). The results obtained there also show that even in low levels (Fig.1) they are highly active. The effectiveness of the antioxidant action of polyphenols is dependent on the molecular structure of these compounds and is differentiated by the number and position of the hydroxyl present in the molecule, in which express reducing properties (Rice-Evans *et al.*, 1997). For the ability of flavonoids is the hydroxyl

number the presence of phenolic orto-dihidroxição system the B ring, a connection C2=C3 coupled with the function C4-oxo in ring C or a hydroxyl group in the C3 (Burda & Oleszek, 2001).

It is also possible that a sample can present a considerable content of phenols, and they may not present a high antioxidant capacity. This is the first report on the antioxidant properties and LC data of the extracts of *A. cacans*.

Roesler *et al.* (2007), in an investigation of the chemical components of the ethanolic extract from the pulp and seeds of *A. crassiflora* by Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), reported the presence of important bioactive components, known to have antioxidant potential, such as caffeic acid, ferulic acid, quinic acid, ascorbic acid, cafeoil acid, rutin, xanthoxylin-tártarico, and cafeoil-glucose. In our study also, caffeic and ferulic acids were found by LC in the extract of *A. cacans*. Several other studies report the antioxidant activity of phenolic compounds derived from cinnamic and benzoic acids, providing support for our research (Morton *et al.*, 2000; Hsieh *et al.*, 2005; Gadow *et al.*, 1997; Ramalho and Jorge, 2006).

In conclusion, the present study demonstrates that among the extracts evaluated, the extracts the seeds of *A. cacans*, presented promising antioxidant activity, which provides support to the in nature, use of fruits this plant for effective free radical scavenger, augmenting its therapeutic. This findings show that this plant is a good candidate for more in-depth studies, and we wish our future research leads to the identification and structure elucidation of biologically active molecules present in its extract, which can be followed by a toxicity test.

4. Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

5. Acknowledgment

This study was supported by UFGD, Fundect, and Capes.

6. References

Alali, F. Q., Liu, X. X., Mclaughlin, J. L. (1999). Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products*, 62, 504-540.

- Ani V, Kamatham AN. 2011. Antioxidant potential of bitter cummin (*Centratherum anthelminticum* (L.) Kuntze) seeds in vitro models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11, 40.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29, 113.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199- 1200.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91, 179–194.
- Bibhabasu H, Santanu B, Nripendranath M. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8, 63.
- Burda, S & Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 2774.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- Formagio A. S., Kassuya C. A., Neto F. F., Volobuff C. R., Iriguchi E. K., Vieira M. do C., Foglio M. A. (2013). The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 13-14.
- Gadow, V. A., Joubert, E., Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(3), 632-638.
- Hsieh, C. L., Yen, G. C., Chen, H. Y. J. (2005). Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(15), 6151-6155.

- Jayaprakasha G. K., Singh R. P., Sakariah K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73, 285-290.
- Kaur, C. & Kapoor, H. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703–725.
- Kaur, C., & Kapoor, H.C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 37, 153- 161.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560–568.
- Lin, J. Y., & Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101, 140.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., Menichini, Francesco, F. (2012). Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25, 179–184.
- Maxson E. D., & Rooney L. W. (1972). Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chemistry*, 49, 719-729.
- Miller, A. L. (1996). Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alternative Medicine Review*, 1, 103–111.
- Morton, L. W. Abu-Amsha Caccetta R, Puddey I. B., Croft K. D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 27(3), 152-59.
- Neto, R. M. R.; Santos, J. S.; Silva, M. A.; Koppe, V. C. (2010). Potencialidades de uso de espécies arbustivas e arbóreas em diferentes fisionomias de cerrado, em Lucas do Rio Verde/MT. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 10(2).

- Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants (Review). *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.
- Ramalho, V. C. e Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), 755-760.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Science*, 2, 304- 309.
- Roesler, R, Catharino, R. R., Malta, L. G., Eberlin, M. N., Pastore, G. (2007). Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 104, 1048–1054.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. *Comunicado Técnico*, ISSN 1679-6535. Fortaleza, CE.
- Santos, D. Y. A. C. & Salatino, M. L. F. (2000). Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, 55, 567-573.
- Santos, L. A. R.; Pimenta, L. P. S.; Boaventura, M. A. D. (2007). Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A. St - Hil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 9(3),48-51,.
- Seetharaman, T. R. (1986). Flavonoids from the leaves of *Annona squamosa* and *Polyalthia longifolia*. *Fitoterapia*, 57,189-198.
- Seyoum A., Asres K., El-Fiky F. K. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058-2070.
- Shahidi F., Chavan U. D., Naczki M., Amarowicz R. (2001). Nutrient distribution and phenolic antioxidants in air-classified fractions of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 926-933.
- Silva, L. A. e Soares, J. J. (2002). Levantamento fitossociológico em um fragmento de floresta estacional semidecídua, no município de São Carlos, SP. *Acta Botânica Brasilica*, 16(2): 205-216.

Soares, S.E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15(1):71-81.

Tables

Table 1: Antioxidant activity of the extracts of *A. cacans* by DPPH, β -carotene bleaching, and ABTS test

Espécie	Extrato	Ensaio da atividade antioxidante		
		DPPH• (IC ₅₀ µg/mL)	Branqueamento do β -caroteno (AA %)	ABTS• (µM trolox/g amostra)
<i>A. cacans</i>	Leaves	68.33 ± 5.64	70.05 ± 8.10	86.56 ± 7.82
	Polpa	454.08 ± 17,29	51.51 ± 5,37	39.32 ± 5,98
	Semente	25.67 ± 2,46	89.67 ± 1.88	200.96 ± 10,33
BHT		16.72 ± 1,87	91.20 ± 4,54	-

Table 2: Retention time of standards and contents in micrograms/gram for the hydromethanolic extract of *A. cacans* in the LC method

Peak	Standards	Retention time (min)	λ (nm)	Content in seeds
1	caffeic acid	14.64	325	178
2	p-coumaric acid	25.48	315	159
3	ferulic acid	31.28	325	266
4	sinapic acid	33.96	325	299
5	luteolin	60.08	350	263
6	kaempferol	68.08	250	478

Figures

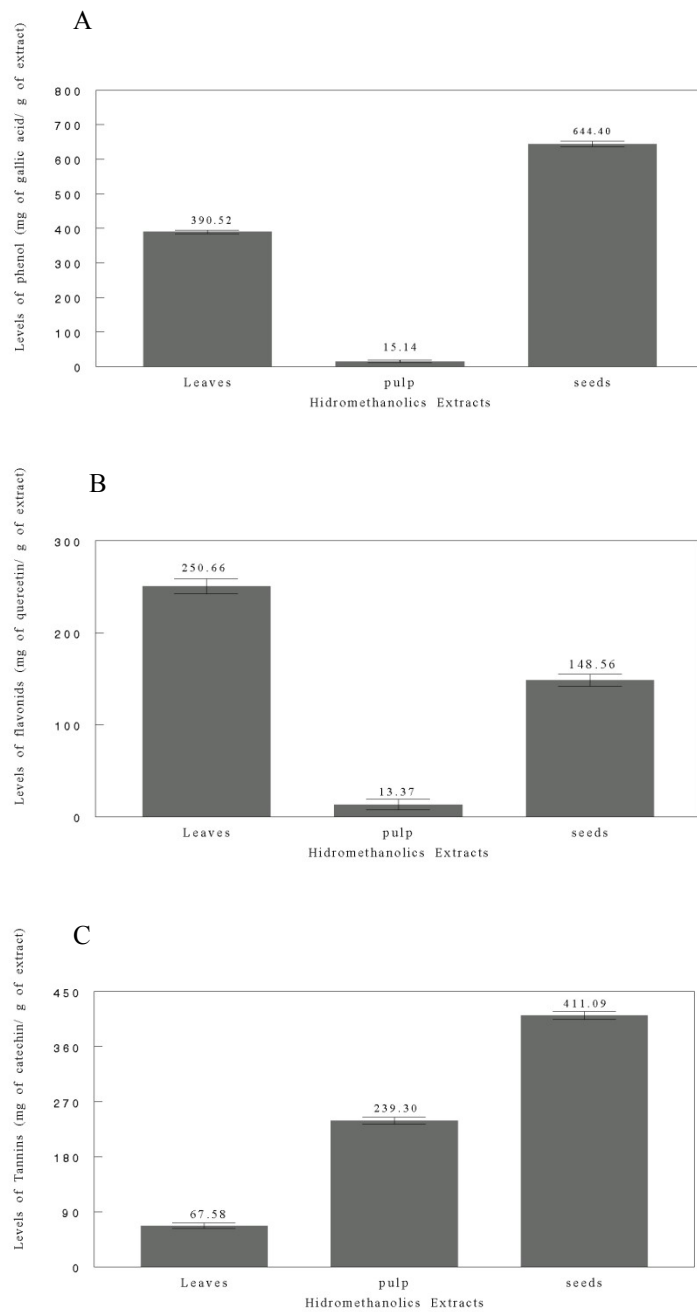


Figure 1: Levels of constituents in the hydromethanolic extract of *A. cacans*

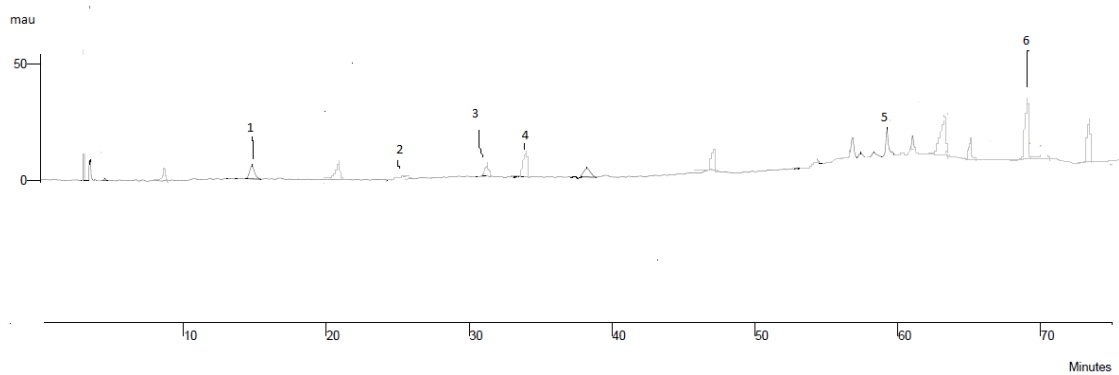


Figure 2: Chromatogram of the extract of seeds of *A. cacans*

ANEXO C – ARTIGO 2

Teor de constituintes fitoquímicos e atividade antioxidante dos extratos da semente e polpa de duas espécies de *Annona*: *A. coriacea* e *A. sylvatica*.

Potencial antioxidante de *A. coriacea* e *A. sylvatica*

Roseane Soares Ramos Benites ^a, Anelise Samara Nazari Formagio ^{b*}, Eliana Janet Sanjinez Argandoña^a, Carla Roberta Ferreira Volobuff ^c, Maria do Carmo Vieira^b.

^a *Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brasil.*

^b *Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brasil.*

^c *Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brasil.*

* Autor para correspondência. Tel: +55 67 81283141; endereço de E-mail: aneliseformagio@ufgd.edu.br (A. Formagio).

Abstract

The antioxidant potential of fruit pulp and seeds of extracts of the *Annona coriacea*, and *A. sylvatica* (Annonaceae) were investigated, as well as total phenolics, flavonoids, condensed tannins contents and ascorbic acid. Was used to determine the antioxidant activity the 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH), β -Carotene bleaching and ABTS⁺ radical cation method. The total phenol, total flavonoid, condensed tannin, and ascorbic acid contents were measured spectrophotometrically. In this study, the pulp and seeds of the fruits were extracted using methanol/water (8:2) for maceration. The seed extracts of *A. coriacea* demonstrated a moderate antioxidant effect and a free radical scavenging activity of 31.53%, by the DPPH test. The seeds also afforded antioxidant activity (51.59%) by the β -carotene bleaching test and 159.50 μ M trolox/g of extract in the ABTS assay. In this study, we found that the hydromethanolic seed extract of *A. coriacea* had the best radical scavenging activity with a high total phenol (147.08 ± 4.20 mg of GAE/g of extract) and flavonoid (131.18 ± 2.31 mg of QE/g of extract) content. This indicated that the antioxidant activity of the extracts was related to the contents of these constituents.

Keywords

Annona, antioxidant activity, phytochemistry

Resumo

O potencial antioxidante de extratos da polpa e sementes de frutos da *Annona coriacea* e *A. sylvatica* (Annonaceae) foram investigados, bem como os teores de fenóis totais, flavonóides totais, ácido ascórbico total e taninos condensados. Os métodos utilizados para avaliação da atividade antioxidante foram o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), branqueamento do β -caroteno e ensaio do radical ABTS•⁺. O teor de fenóis totais, flavonoides totais, taninos condensados e ácido ascórbico foram determinados utilizando espectrofotômetro. A polpa e as sementes dos frutos foram extraídas por maceração com metanol/água (8:2). O extrato da semente de *A. coriacea* demonstrou moderado efeito antioxidante, com 31.53% no sequestro de radicais livres pelo ensaio do DPPH•. As sementes também demonstraram atividade antioxidante (51.59%) pelo teste do branqueamento do β -caroteno e pelo ensaio do ABTS• com 159.50 μ M trolox/g de extrato. Neste estudo foi observado que o extrato hidrometanólico das sementes de *A. coriacea* obteve a melhor atividade sequestradora de radicais livres e alto teor de fenóis totais (147.08 ± 4.20 mg de EAG/ g de extrato) e flavonóides totais (131.18 ± 2.31 mg de EQ/ g de extrato). Isto indica que a atividade antioxidante dos extratos pode estar relacionada com o teor destes constituintes.

Palavras-chave

Annona, atividade antioxidante, fitoquímica

1. Introdução

Os radicais livres e outros oxidantes têm sido relatados como responsáveis pelo desenvolvimento de várias doenças crônicas e degenerativas tais como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata, doença de Alzheimer, diminuição do sistema imunológico e doenças cerebrais (Atoui *et al.*, 2005; Barreiros *et al.*, 2006; Sian, 2003). A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, que podem ser obtidos a partir da dieta alimentar e de outras fontes (Alasalvar *et al.*, 2005; Atoui *et al.*, 2005). Neste contexto os frutos têm atraído considerável atenção como uma fonte de antioxidantes naturais.

O gênero *Annona* (Annonaceae) é composto por 250 espécies distribuídas em todo o Brasil, conhecidas popularmente como "araticum" ou "marolo". A polpa de seus frutos é amplamente consumida *in natura* e apreciada pela população para o preparo de sucos, sorvetes ou geleias (Silva & Tassara, 2001). Partes da planta como folhas, caule, casca e polpa são largamente utilizados na medicina popular para o tratamento antiparasitário, antitumoral e para doenças intestinais. A infusão de folhas e sementes é utilizada para combater diarreia e induzir a menstruação (Almeida *et al.*, 1994, Silva *et al.*, 1994). O uso popular das plantas selecionadas para este estudo já foi anteriormente descrito na literatura (Tabela 1). Em consulta à literatura, não foram encontrados relatos sobre estudos da atividade antioxidante e teor de constituintes de *A. coriacea* e/ou *A. sylvatica*.

Os métodos desenvolvidos para a determinação da capacidade antioxidante são considerados rápidos, simples e confiáveis. De forma geral, os métodos são divididos em dois grupos principais: ensaios baseados na reação simples de transferência de elétrons (SET), por intermédio de uma mudança de cor, com redução do oxidante, e, ensaios baseados na reação de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) (Huang *et al.*, 2005), que mede a atividade do antioxidante para eliminar os radicais peroxila, tal como o ensaio de aprisionamento do radical antioxidante (TRAP), ensaio da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), e o ensaio baseado na capacidade de eliminação do luminol quimiluminescência (LPSC) ensaio radical peroxil (Alho & Leinonen, 1999; Huang *et al.*, 2005; Ou *et al.*, 2001). A transferência de elétrons dos ensaios inclui a reação de redução do ferro (FRAP), a capacidade antioxidante equivalente α -tocoferol/Trolox (TEAC / TEAC), e o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Benzie & Estirpe, 1996; Marca-Williams *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2005; Re *et al.*, 1999).

Os efeitos benéficos das espécies são atribuídos a uma variedade de fitoquímicos presentes bem como aos polifenóis, que revelaram um notável espectro de ações

bioquímicas e farmacológicas, provavelmente devido às suas propriedades de eliminação de antioxidantes e de radical livre (Noroozi, 1998).

Neste estudo avaliou-se a atividade antioxidante de *Annona coriacea* e *A. sylvatica* (polpa e sementes), através dos ensaios de DPPH, branqueamento do β -caroteno e ensaio do radical cátion ABTS^{•+}, em busca de antioxidantes naturais. Ainda alguns parâmetros foram determinados: polifenóis totais (PFT), flavonóides totais (FT), taninos condensados (TC) e teor de ácido ascórbico (TAA).

2. Materiais e métodos

2.1. Material vegetal e preparação do extrato

Os frutos de *A. coriacea* e *A. sylvatica* foram coletados em dezembro de 2011, no município de Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, em uma altitude média de 452 m; latitude 23°17'6" S, e longitude 54°43'28" W. As plantas foram identificadas pela Dra. Zefa Valdevina Pereira, professora da Universidade Federal da Grande Dourados e, um exemplar de cada espécie (folha) foi depositado no Herbário desta Universidade (Tabela 1). Para a preparação dos extratos a polpa e as sementes secas em estufas foram, separadamente, extraídas por maceração com metanol/água (8:2), à temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados, concentrado em rota-evaporador, a 50 °C e posteriormente liofilizados. O rendimento dos extratos foi determinado a partir da massa de material antes da extração e da massa do extrato obtido após a remoção do solvente. O rendimento de extração foi calculado em porcentagem após a pesagem.

2.2. Produtos químicos e reagentes

2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH), 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]), butil hidroxiltolueno (BHT), 2,2-azinobis ácido 3-etil-benzotiazolil-6-sulfônico (ABTS[•]), 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox), quercetina, catequina, e β -caroteno foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (MO, USA). Persulfato de potássio, tween 40, folin-Ciocalteau, carbonato de sódio da Dinâmica (SP, Brasil), Ácido sulfúrico, metanol, etanol, ácido clorídrico, ácido ascórbico, clorofórmio, ácido linoleico, ácido gálico, cloreto de alumínio, acetato de sódio e vanilina foram adquiridos da Vetec (RJ, Brasil).

2.3. Teor de polifenóis totais

O conteúdo fenólico total de cada extrato foi determinado usando o reagente Folin-Ciocalteu (Djeridane *et al.*, 2006). 100 µL do extrato em metanol (1g/L) foi misturado com 1,0 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v). Após a mistura foi adicionado 1,5 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio 2% e deixou descansar por 30 min, com agitação intermitente. A absorbância foi medida a 765 nm utilizando um espectrofotômetro. O teor de fenólicos foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG), em miligramas por grama (mg/g) de extrato. A solução de metanol foi utilizada como branco. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4. Teor de flavonóides totais

O teor de flavonoides totais nos extratos foi calculado utilizando espectrofotômetro conforme descrito (Lin e Tang, 2007). 500 µL de cada extrato foram misturados com 1,50 mL de solução de etanol a 95%, 0,10 mL de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 10%, 0,10 mL de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 M) e 2,80 mL de água destilada. Em seguida foram incubados por 40 min. e a absorbância foi medida a 415 nm utilizando espectrofotômetro. Para calcular a concentração de flavonóides, foi preparada uma curva de calibração utilizando como padrão a quercetina. O teor de flavonoides foram expressos em equivalentes de quercetina (EQ) em miligramas por grama (mg/g) de extrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5. Taninos condensados (TC)

Para determinar a concentração de taninos condensados foi utilizada uma versão modificada do método desenvolvido por Maxson & Rooney (1972). Os extratos foram misturados a 5 mL de reagente de vanilina HCL (8% de HCL_{conc} em metanol e 4% de vanilina em metanol). A absorbância foi lida a 500 nm após 20 min. A catequina foi usada

como padrão. Os resultados foram expressos em equivalentes de catequina (EC) em miligramas por grama (mg/g) de extrato.

2.6. Teor de ácido ascórbico total

A determinação quantitativa do teor de ácido ascórbico foi realizada a partir da adaptação do método espectrofotométrico desenvolvido por Roe & Kuether (1943). 0,1 mL da amostra (100 mg de extrato/10 mL de metanol HPLC) foram adicionadas ao reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH). Deixou-se em repouso por 30 minutos e procedeu-se a leitura, em triplicata, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 515 nm, utilizando água destilada como branco. O resultado foi expresso em miligramas de ácido ascórbico por grama de extrato.

2.7. Atividade sequestradora de radicais livres no ensaio de DPPH•

A capacidade de seqüestrar radicais livres dos extratos e do controle positivo butilhidroxitolueno (BHT) foram determinadas usando o método do radical livre DPPH (Blois, 1958). Várias concentrações das amostras foram adicionadas a 3 mL de solução metanólica de DPPH (0,1 mM) preparada diariamente. A mistura foi agitada e deixou-se em repouso à temperatura ambiente, em local escuro. Após 30 min a absorbância foi medida a 517 nm versus o branco (contendo todos os reagentes, exceto as amostras de teste). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A concentração das amostras necessária para inibir 50% do DPPH (IC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de I% versus a concentração da amostra em microgramas por mililitros ($\mu\text{g/mL}$). A porcentagem de inibição foi calculada usando a seguinte equação: $\%I = (A_0 - A/A_0) \times 100$, onde A_0 é a absorbância de DPPH (controle), e A é a absorbância da amostra.

2.8. Teste de branqueamento do β -caroteno

A solução β -caroteno foi preparada por dissolução de 2 mg de β -caroteno em 10 mL de clorofórmio. 1 mL de solução de β -caroteno/clorofórmio foi pipetada em um balão

rotativo contendo 20 mg de ácido linoleico e 0.2 g de Tween 40. Em seguida procedeu-se a rota-evaporação do clorofórmio a 45°C. Foi adicionada água destilada (50 ml) lentamente e agitou-se vigorosamente até formar uma emulsão. Alíquotas da emulsão (5mL) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,2 mL da amostra dos extratos (Jayaprakasha *et al.*, 2001; Kaur & Kapoor 2002; Shahidi *et al.*, 2001). Assim que a emulsão foi adicionada a cada tubo, procedeu-se a leitura do tempo zero a 470 nm contra o branco. Os tubos foram colocados então em banho-maria a 50°C e a oxidação da emulsão foi monitorada em intervalos de 15 min efetuando-se a leitura da absorção em cada intervalo, até que a cor da solução de β-caroteno na amostra controle tivesse desaparecido (105 min). BHT foi utilizado como controle. As análises foram realizadas em triplicata. A atividade antioxidante (AA) foi calculada como percentual de inibição relativa ao controle com a seguinte equação: % AA = [1 - (Ai - A) / (Ai - A't)] x 100, em que Ai é a absorbância amostra no tempo zero; At é a absorbância da amostra após a incubação (105 min) a 50 °C; Ai é a absorbância do controle no tempo zero; A't é a absorbância do controle após incubação (105 min) a 50°C.

2.9. Ensaio ABTS•

A atividade antioxidante foi calculada utilizando o método de eliminação de radicais azino-bis (ácido etil-benzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS) descrito por Rufino *et al.* (2007) com pequenas modificações. Inicialmente 7 mM de ABTS e 140 mM de persulfato de potássio foram misturados para formar o radical cátion (ABTS•+) e foram mantidos na ausência de luz, por 16 horas em temperatura ambiente. A solução então, foi diluída em etanol (P.A.) até obter-se a absorbância de 0,70 (± 0,05) nm a 734 nm. Para análise da amostra, 3 mL da solução diluída de ABTS•+ foi adicionada a 30 µl de cinco diferentes diluições dos extratos e misturados cuidadosamente. A mistura foi deixada descansar (6 min) no escuro em temperatura ambiente, e a absorbância foi lida a 734nm utilizando etanol como branco. A curva de calibração foi realizada utilizando soluções etanólicas de Trolox em diferentes concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 µM. Os resultados foram expressos em microMol (µM) de trolox equivalente por grama de extrato.

2.10. A análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata com três repetições. Os dados representados a média \pm desvio padrão (DP) de três resultados. O valor de IC₅₀ foi determinado por regressão linear, utilizando Origin 5.0.

3. Resultados

As espécies estudadas, as partes utilizadas para a preparação do extrato, o número do depósito, e a porcentagem de rendimento estão indicados na Tabela 1. Os extratos de *A. sylvatica* mostraram um rendimento de $> 8,7\%$.

O potencial antioxidante dos frutos das duas espécies de *Annona* foi estudado utilizando diferentes métodos *in vitro*: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH.), 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothizoline-6-sulfonato) (ABTS⁺), e teste do branqueamento do β -caroteno. Entre os quatro extratos analisados, o extrato das sementes de *A. coriacea* apresentou um efeito antioxidante moderado e exibiu atividade sequestradora de radicais livres de 31,53% pelo teste do DPPH, 51,59% pelo teste de branqueamento do β -caroteno e de 159,50 μ M trolox/g de extrato no ensaio do ABTS (Tabela 2).

O teor de fenóis totais, flavonóides, taninos condensados, e ácido ascórbico dos extratos são apresentados na Tabela 3. Os resultados mostram que o extrato hidrometanólico da semente de *A. coriacea* apresentou o maior teor de fenólicos totais ($147,08 \pm 4,20$ mg extrato EAG / g) e maior teor de flavonóides ($131,18 \pm 2,31$ mg EQ / g extrato). Em contrapartida, o teor de taninos condensados e o teor de ácido ascórbico total dos extratos não foram significativos (Tabela 3).

4. Discussão

Na busca por produtos naturais com atividade antioxidante foram preparados extratos hidrometanólicos de dois frutos de plantas nativas do Brasil. A diferença no rendimento da extração (% w/w) pode estar relacionada aos diferentes níveis de

constituintes químicos e físicos presentes na polpa e sementes, como as diferenças no conteúdo de açúcares, fibras, proteínas e outros componentes presentes na polpa.

Segundo Pereira *et al.* (2013), a polpa de *A. sylvatica* possui teor de 8,84 g de açúcares, 17,89 g de carboidratos, 1,82 g de proteína e 8,74 g de fibra total. A polpa de *A. coriacea* apresenta conteúdo de carboidratos de 11,91 g, 1,07 g de proteína e 5,62 g de fibra total (Hiane *et al.*, 1992).

O ensaio de eliminação de radicais livres (DPPH) baseia-se na capacidade de algumas substâncias doar um átomo de hidrogênio para o radical, reduzindo este à hidrazina, provocando uma mudança na coloração, de amarelo pálido para violeta. Esta mudança é acompanhada pela diminuição da coloração da absorbância a 517 nm (Alves *et al.*, 2010). O ensaio da inibição da auto oxidação do β -caroteno/ ácido linoleico baseia-se na capacidade de algumas substâncias protegerem o β -caroteno, a partir da oxidação. Esta oxidação é causada pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoleico, que atacam o cromóforo da emulsão β -caroteno, resultando numa reação de branqueamento (Alves *et al.*, 2010; Damasceno *et al.*, 2011).

A atividade antioxidante dos extratos vegetais também depende do tipo e polaridade do solvente extrator, do processo de isolamento e de purificação dos compostos ativos, assim como as técnicas de extração e os substratos utilizados (Meyer *et al.*, 1998). Geralmente extratos com solventes polares levam a extratos mais ativos do que a mistura com solventes menos polares. Este fator também pode ter influenciado nos resultados obtidos neste estudo, uma vez que foi utilizado solvente metanol/água, fornecendo excelente extração de constituintes.

Vários estudos com extratos de espécies de *Annona* relatam atividade antioxidante, para as folhas de *A. dioica* (Formagio *et al.*, 2013), folhas, cascas, raízes e sementes de *A. squamosa* (Baskar *et al.*, 2007; Mariod *et al.*, 2012; Shirwaikar *et al.*, 2004), polpa, sementes e cascas de *A. crassiflora* (Roesler, *et al.*, 2006; 2007), casca e folhas de *A. salzmannii* (Costa *et al.*, 2011, 2012a), folhas de *A. reticulata* e *A. muricata* (Baskar *et al.*, 2007, Gomes de Melo *et al.*, 2010), as folhas de *A. senegalensis* (Ajboye *et al.*, 2010), folhas de *A. pickelii* (Costa *et al.*, 2011) e folhas de *A. vepretorum* (Costa *et al.*, 2012b).

Tem sido sugerido que o conteúdo fenólico de diferentes partes do material vegetal está correlacionado com a sua atividade antioxidante (Velioglu *et al.*, 1998). Neste estudo verificou-se que o extrato hidrometanólico da semente de *A. coriacea* obteve a melhor atividade sequestradora de radicais, com alto teor de fenóis totais e flavonoides totais. Isto demonstra que a atividade antioxidante dos extratos está relacionada ao teor destes constituintes.

Os compostos fenólicos são considerados metabólitos secundários sintetizados pelas plantas durante o desenvolvimento normal e, em resposta a condições de stress, estes compostos tornam-se presentes nas plantas como o grupo diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina. Nos alimentos, compostos fenólicos podem contribuir para o amargor, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa de produtos. Além disso, possuem numerosos efeitos benéficos como sequestro de espécies radicalares de oxigênio, modulação da atividade de algumas enzimas específicas, inibição da proliferação celular, além do seu potencial antimicrobiano, antialergênico e anti-inflamatório (Manach *et al.*, 2004).

Segundo Sousa *et al.* (2007), os compostos fenólicos são distribuídos nas seguintes categorias: fenólicos simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzóico e ácido cinâmico), cumarinas, flavonoides, taninos hidrolisáveis e condensados, estilbenos, lignanas, e legninas. Eles têm a capacidade de inibir a peroxidação lipídica e lipoxigenase *in vitro*. O consumo de flavonoides presentes em frutas e legumes tem sido associado à proteção contra o câncer e doenças do coração (Hertog *et al.*, 1992; Atoui *et al.*, 2005).

Em conclusão, o presente estudo demonstrou uma moderada atividade antioxidante do extrato das sementes de *Annona coriacea* e mostrou que este efeito pode ser atribuído ao teor de fenóis e flavonoides presentes. Contudo, novos estudos sobre o isolamento e elucidação da estrutura dos componentes ativos do extrato, bem como investigações sobre o seu mecanismo de inibição fazem-se necessários.

5. Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela UFGD, Fundect e Capes.

6. Referências

AJBOYE, TO., YAKUBU, MT., SALAU, AK., OLADIJI, AT., AKANJI, MA. and OKOGUN, JI., 2010. Antioxidant and drug detoxification potential of aqueous extract of *Annona senegalensis* leaves in carbon tetrachloride-induced hepatocellular damage. *Pharmaceutical Biology*, vol. 48, n. 12, p. 1361-1370.

ALASALVAR, C., AL-FARSI, M., QUANTICK, PC., SHAHIDI, F. and WIKTOROWICZ, R., 2005. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry*, vol. 89, p. 69–76.

ALHO, H. and LEINONEN, J., 1999. Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods in Enzymology*, vol. 299, p. 3–15.

ALMEIDA, SP., PROENÇA, CEB., SANO, SM. and RIBEIRO, JF., 1994. Cerrado: espécies vegetais úteis. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), Brasil, p. 48-335.

ALVES, CQ., DAVID, JM., DAVID, JP., BAHIA, MV. and AGUIAR, RM., 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, vol. 33, n. 10, p. 2202-2210.

ATOUI, AK., MANSOURI, A., BOSKOU, G. and KEFALAS, P., 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, vol. 89, p. 27–36.

BARREIROS, ALBS., DAVID, JM. and DAVID, JP., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, vol. 29, p. 113.

BASKAR, R., RAJESWARI, V. and KUMAR, TS., 2007. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 45, n. 5, p. 480-485.

BENZIE, IF. and STRAIN, JJ., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, vol. 239, p. 70–76.

BLOIS, MS., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, vol. 26, p. 1199- 1200.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, ME. and BERSET, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, vol. 28, p. 25–30.

COSTA, EV., DA CRUZ, PE., DE LOURENÇO, CC., DE SOUZA MORAES, VR., DE LIMA NOGUEIRA, PC. and SALVADOR, MJ., 2012a. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). *Natural Product Research*, vol. 15.

COSTA, EV., DUTRA, LM., DE JESUS, HC., NOGUEIRA, PC., MORAES, VR., SALVADOR, MJ., CAVALCANTI, SC., DOS SANTOS, RL. and PRATA, AP., 2011. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). *Natural Product Communications*, vol. 6, n. 6, p. 907-912.

COSTA, EV., DUTRA, LM., NOGUEIRA, PC., MORAES, VR., SALVADOR, MJ., RIBEIRO, LH. and GADELHA, FR., 2012b. Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. *Natural Product Communications*, vol. 7, n. 2, p. 265-266.

DAMASCENO, EIT., SILVA, JKR., ANDRADE, EHA., SOUSA, PJC. and MAIA, JGS., 2011. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 21, n. 1, p. 78-85.

DJERIDANE, A., YOUSFI, M., NADJEMI, B., BOUTASSOUNA, D., STOCKER, P. and VIDAL, N., 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, vol. 97, p. 654-660.

FORMAGIO, AS., KASSUYA, CA., NETO, FF., VOLOBUFF, CR., IRIGUCHI, EK., VIEIRA, MC. and FOGGIO, MA., 2013. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11, p. 13-14.

GOMES DE MELO, J., DE SOUSA ARAÚJO, TA., THIJAN NOBRE DE ALMEIDA E CASTRO, V., LYRA DE VASCONCELOS CABRAL, D., DO DESTERRO RODRIGUES, M., CARNEIRO DO NASCIMENTO, S., CAVALCANTI DE AMORIM, EL., DE ALBUQUERQUE, UP., 2010. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*, vol. 15 n. 12, p. 8534-8542.

HERTOG, MGL., HOLLMAN, PCH. and VENEMA, DP., 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*, vol. 40, p. 1591-1598.

HIANE, AP., RAMOS, MIL., RAMOS-FILHO, MM. and PEREIRA, JG., 1992. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos de alguns frutos nativos do estado de

Mato Grosso do Sul. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, vol. 10, n. 1, p. 35-42.

HUANG, D., OU, B. and PRIOR, RL., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, p. 1841–1856

JAYAPRAKASHA, GK., SINGH, RP. and SAKARIAH, KK., 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, vol. 73, p. 285-290.

KAUR, C. and KAPOOR, HC., 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, vol. 37, p. 153- 161.

LIN, JY., and TANG, CY., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, vol. 101, p. 140.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C. and JIMÉNEZ, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, vol. 79, n. 5, p. 727-747.

MARIOD, AA., ABDELWAHAB, SI., ELKHEIR, S., AHMED, YM., FAUZI, PN. and CHUEN, CS., 2012. Antioxidant activity of different parts from *Annona squamosa*, and *Catunaregam nilotica* methanolic extract. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, vol. 11, n. 3, p. 249-58.

MAXSON, ED. and ROONEY, LW., 1972. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chemistry*, vol. 49, p. 719-729.

MEYER, AS., HEINONEN, M. and FRANKEL, EN., 1998. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, vol. 61, p. 71–75.

NOROOZI, M., ANGERSON, WJ. and LEAN, ME., 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 67, p. 1210-1218.

OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., & PRIOR, RL., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, p. 4619–4626.

PEREIRA, MC., STEFFENS, RS., JABLONSKI, A., HERTZ, PF., RIOS, AO., VIZZOTTO, M. and FLÔRES, SH., 2013. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 29, p. 19-24.

- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. and RICE-EVANS, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, p. 1231–1237.
- ROE, JH. and KUETHER, CA., 1943. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 147, p. 399-407.
- ROESLER, R., CATHARINO, RR., MALTA, LG., EBERLIN, MN. and PASTORE, G., 2007. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, vol. 104, p. 1048–1054.
- ROESLER, R., MALTA, LG., CARRASCO, LC. and PASTORE, G., 2006. Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). *Journal of Food Science*, vol. 71, p. 102-107.
- RUFINO, MSM., ALVES, RE., BRITO, ES., MORAIS, SM., SAMPAIO, CG., PÉREZ-JIMÉNEZ, J. and SAURA-CALIXTO, FD., 2007. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. Comunicado Técnico, ISSN 1679-6535. Fortaleza, CE.
- SHAHIDI, F., CHAVAN, UD., NACZK, M. and AMAROWICZ, R., 2001. Nutrient distribution and phenolic antioxidants in air-classified fractions of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, p. 926-933.
- SHIRWAIKAR, A., RAJENDRAN, K. and KUMAR, CD., 2004. In vitro antioxidant studies of *Annona squamosa* Linn. leaves. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 42, n. 8, p. 803-807.
- SIAN, BA., 2003. Dietary antioxidants-past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 14, p. 93–98.
- SILVA, S. and TASSARA, H., 2001. Frutas no Brasil. Empresa das Artes. São Paulo, SP, Brazil.
- SILVA, JA., SILVA, DB., JUNQUEIRA, NJ. and ANDRADE, LRM., 1994. Frutas Nativas dos Cerrados. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), p. 50-149.
- SOUSA, CMM., SILVA, HR., VIEIRA-JR, GM., AYRES, MCC., COSTA, CLS., ARAÚJO, DS., CAVALCANTE, LC., BARROS, EDS., ARAÚJO, PBM. and BRANDÃO, MS., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, vol. 30, n. 2, p. 351-355.
- VELIOGLU, YS., MAZZA, G., GAO, L. and OOMAH, BD., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, p. 4113-4117.

Tabelas

Tabela 1. Espécies selecionadas para a avaliação da atividade antioxidante.

Espécie (número de registro)	Nome popular	Uso na medicina popular	Partes da planta testadas (Rendimento de extração % w/w)
<i>A. coriacea</i> Mart. (DDMS 186)	marolo	Contra diarreia crônica (Rodrigues e Carvalho, 2001), antimalária (Mesquita et al., 2007); anti-helmíntico (Santos & Sant'Ana, 2000, 2001) e contra leishmaniose (Akendengue et al., 1999)	Polpa (20.5), Sementes (14.3)
<i>A. sylvatica</i> St.-Hill (DDMS 4600)	Araticum da mata	As folhas são usadas no tratamento da malária e como antipirético (Balbach, 1986)	Polpa (5.2), Sementes (8.7)

Tabela 2: Atividade antioxidante dos quatro extratos de frutos de *Annona* pelos métodos do DPPH•, branqueamento do β -caroteno e ensaio do ABTS•.

Espécie	Extrato	Método			
		DPPH•		β -caroteno/ ácido linoléico	ABTS ⁺
		IC ₅₀ μ g/mL	%FRS*	(%AA)	(μ M trolox/g extract)
<i>A. coriacea</i>	Polpa	822.19 \pm 13.89	13.49 \pm 2.83	32.32 \pm 4.02	57.18 \pm 4.0
	Semente	330.55 \pm 2.34	31.53 \pm 1.65	51.59 \pm 6.43	159.36 \pm 8.32
<i>A. sylvatica</i>	Polpa	695.61 \pm 6.67	11.82 \pm 1.06	31.17 \pm 5.83	39.15 \pm 4.43
	Semente	724.14 \pm 17.79	16.70 \pm 1.06	12.82 \pm 3.96	135.50 \pm 8.94
BHT		16.72 \pm 1.87	82.19 \pm 1.29	91.20 \pm 4.54	n.d.

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3); n.d. = não determinado; * %FRS = porcentagem de eliminação de radicais livres (*avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, remoção de radicais livres, com concentração final equivalente a 250 μ g/mL de extrato). IC₅₀ = corresponde a concentração necessária para inibir 50% do DPPH e foi calculada a partir do gráfico de I% (porcentagem de inibição) versus a concentração do extrato em μ g/mL.

Tabela 3: Teor de constituintes nos quatro extratos de frutos de *Annona* avaliados.

Espécies	Extratos	Teor de constituintes (mg/g de extrato)			
		Fenóis Totais	Flavonóides	Taninos Condensados	Ácido Ascórbico
<i>A. coriacea</i>	Polpa	57.67± 1.16	24.38± 2.45	17.43± 1.08	0.56± 1.58
	Sementes	147.08 ± 4.2	131.18 ± 2.31	45.76 ± 0.97	0.75± 1.06
<i>A. sylvatica</i>	Polpa	13.64 ± 2.18	13.74± 2.18	15.68 ± 2.04	0.95± 2.26
	Sementes	58.10 ± 1.45	51.11 ± 2.30	53.31 ± 1.01	0.68± 1.45

ANEXO D – Article 2

Quantification of the phytochemical constituents and antioxidant activity in the seed and pulp extracts of two *Annona* species: *A. coriacea* and *A. sylvatica*

Antioxidant activity of the *A. coriacea* and *A. sylvatica*

Roseane Soares Ramos Benites ^I, Anelise Samara Nazari Formagio ^{II*}, Eliana Janet Sanjinez Argandoña^I, Carla Roberta Ferreira Volobuff ^{III}, Maria do Carmo Vieira^{II}.

^I *Faculty of Exact Sciences and Technology, University Federal of Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brazil.*

^{II} *Faculty of Agricultural Sciences, University Federal of Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brazil.*

^{III} *Faculty of Biological and Environmental Sciences, University Federal of Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados-MS, Brazil.*

Corresponding author. Tel.: +55 67 81283141; E-mail address:

aneliseformagio@ufgd.edu.br (A. Formagio).

Abstract

The antioxidant potential of fruit pulp and seeds of extracts of the *Annona coriacea*, and *A. sylvatica* (Annonaceae) were investigated, as well as total phenolics, flavonoids, condensed tannins contents and ascorbic acid. Was used to determine the antioxidant activity the 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH), β -Carotene bleaching and ABTS⁺ radical cation method. The total phenol, total flavonoid, condensed tannin, and ascorbic acid contents were measured spectrophotometrically. In this study, the pulp and seeds of the fruits were extracted using methanol/water (8:2) for maceration. The seed extracts of *A. coriacea* demonstrated a moderate antioxidant effect and a free radical scavenging activity of 31.53%, by the DPPH test, 51.59% by the β -carotene bleaching test and 159.50 μ M trolox/g of extract in the ABTS assay. We found that the hydromethanolic seed extract of *A. coriacea* had high total phenol (147.08 ± 4.20 mg of GAE/g of extract) and flavonoid (131.18 ± 2.31 mg of QE/g of extract) content. This indicated that the antioxidant activity of the extracts was related to the contents of these constituents.

Keywords: *Annona*, antioxidant activity, phytochemistry

Quantificação de constituintes fitoquímicos e atividade antioxidante de extratos de sementes e polpa de duas espécies de *Annona*: *A. coriacea* e *A. sylvatica*

Resumo

O potencial antioxidante de extratos da polpa e sementes de frutos da *Annona coriacea* e *A. sylvatica* (Annonaceae) foram investigados, bem como os teores de fenóis totais, flavonóides totais, ácido ascórbico total e taninos condensados. Os métodos utilizados para

avaliação da atividade antioxidante foram o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), branqueamento do β-caroteno e ensaio do radical ABTS•⁺. O teor de fenóis totais, flavonoides totais, taninos condensados e ácido ascórbico foram determinados utilizando espectrofotômetro. A polpa e as sementes dos frutos foram extraídas por maceração com metanol/água (8:2). O extrato da semente de *A. coriacea* demonstrou moderado efeito antioxidante, com 31.53% no sequestro de radicais livres pelo ensaio do DPPH•, 51.59% pelo teste do branqueamento do β-caroteno e pelo ensaio do ABTS• com 159.50 μM trolox/g de extrato. Foi observado que o extrato hidrometanólico das sementes de *A. coriacea* obteve alto teor de fenóis totais (147.08 ± 4.20 mg of GAE/ g de extrato) e flavonóides totais (131.18 ± 2.31 mg of QE/ g de extrato). Isto indica que atividade antioxidante dos extratos pode estar relacionada com o teor destes constituintes.

Palavras-chave: *Annona*, atividade antioxidante, fitoquímica

1. Introduction

Free radicals and other oxidants have been associated with being responsible for the development of a number of chronic and degenerative diseases such as cancer, cardiovascular diseases, cataract, Alzheimer's, aging, immune system decline, and cerebral disorders (Atoui et al., 2005; Barreiros, 2006; Sian, 2003). The production of free radicals is controlled in living things by several antioxidant compounds, which can come from the diet and other sources (Alasalvar et al., 2005; Atoui et al., 2005). These fruits have attracted considerable attention as a source of natural antioxidants.

The genus *Annona* (Annonaceae) consists of 250 species distributed across Brazil, and has a great variety of exotic fruits, known as “araticum” or “marolo”, widely consumed “*in natura*” and used by the population to prepare juice, ice-cream or jelly (Silva & Tassara, 2001). The other parts of the fruit are also widely used in folk medicine for antiparasitic or antitumoral treatment of intestinal diseases. The infusion of leaves and powdered seeds is used to combat diarrhea and induce menstruation (Almeida et al., 1994; Silva et al., 1994). The popular use of the plants selected for this study has already been reported previously in the literature (Table 1). On consulting the literature, no reports on the comparative studies of the antioxidant activities of *A. coriacea* or *A. sylvatica* were found.

Methods were developed for a quick, simple, and reliable quantification of the antioxidant capacity. In general, the methods were divided into two major groups: Assays based on a single electron transfer (SET) reaction, displayed through a change in color as the oxidant is reduced, and assays based on a hydrogen atom transfer (HAT) (Huang et al., 2005), which measures the activity of the antioxidant to scavenge the peroxy radicals, such

as, the total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) assay, the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay, and the luminol-chemiluminescence-based peroxy radical scavenging capacity (LPSC) assay (Alho & Leinonen, 1999; Huang et al., 2005; Ou et al., 2001). The assays' electron transfer includes the reaction of ferric reduction (FRAP), the α -tocopherol/Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC/TEAC), and the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Benzie & Strain, 1996; Brand-Williams et al., 1995; Huang et al., 2005; Re et al., 1999).

The beneficial effects of the species are attributed to the variety of phytochemicals present and also the polyphenols, which have revealed a remarkable spectrum of biochemical and pharmacological actions, thought to be due to their antioxidative and free-radical scavenging properties (Noroozi, 1998).

In the present study, we evaluated the antioxidant activity of *Annona coriacea* and *A. sylvatica* fruits (pulp and seeds), measured by DPPH, β -carotene bleaching, and the ABTS⁺ radical cation method, in our search for natural antioxidants. In addition, a number of parameters were determined to characterize this activity, among which are: Total polyphenols (TPP), total flavonoids (TF), condensed tannins (CT), and ascorbic acid content (TAA).

2. Materials and Methods

2.1. Plant material and extract preparation

The fruits of *A. coriacea* and *A. sylvatica* were collected in December 2011, in Dourados, in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, which is located at an average altitude of 452 m; at 23°17'6" S latitude and 54°43'28" W longitude. The plants were identified by

Dr. Zefa Valdevina Pereira, who is a Professor at the University Federal of the Grande Dourados, and a voucher specimen was deposited at the Herbarium of this University (Table 1). For preparing the extracts, the fruit pulp and air-dried and powdered seeds of each species were separately and successively extracted by maceration with methanol/water (8:2), at room temperature. The extract was filtered, concentrated under pressure in a rotaevaporator at 50°C, and lyophilized. The extraction yield of the crude extracts was determined from the mass of the material prior to extraction and the mass of extract obtained after removal of methanol/water (8:2). The extraction yield was calculated in percentage after weighing.

2.2. Chemicals

2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH), 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), quercetin, catechin, and β -carotene were obtained from Sigma Chemical Co. (MO, USA). Potassium persulfate, tween 40, folin-ciocalteau, sodium carbonate from Dinamina, sulfuric acid, methanol, ethanol, hydrochloric acid, ascorbic acid, chloroform, linolenic acid, gallic acid, aluminum chloride, sodium acetate, and vanillin were obtained from Vetec (RJ, Brazil).

2.3. Total phenol content

The total phenol content of the samples was determined using the Folin reagent (Djeridane et al, 2006). Briefly, 100 μ L of extracts in methanol (1 g/L) were mixed with 1.0 mL of distilled water and 0.5 mL of folin-ciocaleu's (1:10 v/v) reagent. After mixing, 1.5 ml of

2% sodium bicarbonate was added, and the mixture was allowed to stand for 30 min with intermittent shaking. The absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer. The total phenolic content was expressed as a gallic acid equivalent (GAE) in milligrams per gram (mg/g) of extract. The methanol solution was used as a blank. All of the assays were carried out in triplicate.

2.4. Total flavonoid content

The amount of total flavonoids in the extracts was measured spectrophotometrically, as reported (Lin & Tang, 2007). Briefly, 500 μ L of each extract was mixed with 1.50 mL of 95% ethanol, 0.10 mL of 10% aluminum chloride ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0.10 mL of acetate sodium ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 M), and 2.80 mL of distilled water. After incubation for 40 min, the absorbance was measured at 415 nm, using a spectrophotometer. To calculate the concentration of flavonoids, we prepared a calibration curve by using quercetin as the standard. The flavonoid content was expressed as quercetin equivalents (QE) in milligrams per gram (mg/g) of extract. All of the assays were carried out in triplicate.

2.5. Condensed tannin content

Condensed tannin concentrations were determined by a modified version of the method developed by Maxson & Rooney (1972). The samples were mixed with 5 mL of the vanillin–HCl reagent (8% concentrated HCl in methanol and 4% vanillin in methanol). The absorbance at 500 nm was read after 20 min. Catechin was used as the standard. The

condensed tannin content was expressed as catechin equivalents (CE) in milligrams per gram (mg/g) of extract.

2.6. Ascorbic acid content

The determination of TAA was adapted from the spectrophotometric method developed by Roe & Kuether (1943), for the estimation of ascorbic acid content. A sample of 0.1 mL (100 mg extract/10 mL methanol HPLC) was added to 2.4 dinitrophenylhydrazine reagent (2,4-DNPH). It was allowed to sit for 30 minutes and was read in triplicate on the spectrophotometer, with a wavelength of 515 nm, using distilled water as white. The result was expressed in milligrams of ascorbic acid per gram of extract.

2.7. DPPH free radical scavenging assay

Free radical scavenging activities of the test samples and of the positive control butylhydroxytoluene (BHT) were determined using the DPPH free radical method (Blois, 1958). Various concentrations of the samples were added to 3 mL of methanol DPPH solution (0.1 mM) prepared daily. The mixture was shaken and left to stand at room temperature, in the dark. After 30 min, the absorbance was measured at 517 nm against a blank (containing all reagents except the test samples). The assays were carried out in triplicate. The concentrations of the samples for 50% inhibition of DPPH (IC₅₀) were obtained from the graph of I% (inhibition percentage) versus a concentration of the sample in microgram per milliliter (µg/mL). I% was calculated using the equation: $I\% = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}}) \times 100$, where A_{blank} is the absorbance of the blank solution and A_{sample} is the absorbance of the test sample.

2.8. β -Carotene bleaching test

The β -carotene solution was prepared by dissolving 2 mg of β -carotene in 10 mL of chloroform. 1 mL of β -carotene-chloroform solution was mixed with 20 mg linoleic acid and 0.2 g Tween 40. Subsequently, the chloroform was removed by a rotary evaporator at 45°C. Distilled water (50 mL) was slowly added with vigorous agitation to form an emulsion. Emulsion aliquots (5 mL) were transferred with 0.2 mL of sample extracts. The control samples were prepared with 0.2 mL methanol instead of extracts (Jayaprakasha et al., 2001; Kaur & Kapoor 2002; Shahidi et al., 2001). As soon as the emulsion was added to each tube, zero time absorbance was read at 470 nm against the blank. The tubes were placed in a water bath at 50°C and the oxidation of the emulsion was monitored by the subsequent reading of absorbance at 15 min intervals, until the color of the β -carotene in the control sample had disappeared (105 min). BHT was used as reference. Analyses were performed in triplicate. The antioxidant activity (AA) was calculated as a percent of inhibition, relative to the control, using the following equation: $AA = [1 - (A_i - A_t) / (A'_i - A'_t)] \times 100$, where A_i = absorbance of the sample at zero time; A_t = absorbance of the sample after incubation (105 min) at 50°C; A'_i = absorbance of the control at zero time; A'_t = absorbance of control after incubation (105 min) at 50°C.

2.9. ABTS⁺ assay

The total antioxidant activity was measured by the improved azino-bis (ethylbenzothiazoline6-sulfonicacid) radical scavenging (ABTS) method (Rufino et al., 2007), with minor modifications. Briefly, 7.0 mM ABTS and 140 mM potassium persulfate

were mixed for the production of the ABTS cation (ABTS^{•+}) and kept in dark for 16 hours, at ambient temperature. The ABTS^{•+} solution was diluted with ethanol (P.A.) till the absorbance obtained 0.700(±0.05), at 734 nm. For sample analysis, 3 mL of diluted ABTS^{•+} solution was added to 30 µl of five different dilutions of the methanolic extract and mixed thoroughly. The reaction mixture was allowed to sit (6 min) in the dark, at an ambient temperature, and absorbance was recorded at 734 nm, using ethanol (P.A.) to the blank. A standard curve of various concentrations was prepared of ethanolic solution in trolox, in concentrations of: 100; 500; 1000, and 2000 µM. The results were expressed in (µM) trolox equivalent per gram of extract.

2.10. Statistical analysis

All of the experiments were conducted in triplicate. The data represented the mean ± standard deviation (SD) of three results. The IC₅₀ value was determined by linear regression, using Origin 5.0. The results were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) using SISVAR (Ferreira, 2000).

3. Results

The plant species, the parts used for extraction preparation, the voucher number, and percentage of yield are shown in Table 1. The extracts of *A. sylvatica* showed a yield > 8.7%.

The antioxidant potential of the fruits of two different species of *Annona* was studied by using different *in vitro* models, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS^{•+}), and β-carotene bleaching test.

Between the four extracts tested, the seed extracts of *A. coriacea* demonstrated a moderate antioxidant effect and exhibited a free radical scavenging activity of 31.53%, by the DPPH test. The seeds also afforded antioxidant activity (51.59%) by the β -carotene bleaching test and 159.50 μ M trolox/g of extract in the ABTS assay (Table 2).

The total phenolic content, flavonoids, condensed tannins, and ascorbic acid of the extracts are shown in Table 3. The results show that the hydromethanolic seed extract of *A. coriacea* has the highest total phenolic content (147.08 ± 4.20 mg GAE/g extract) and the highest flavonoid content (131.18 ± 2.31 mg QE/g extract). In comparison, the evaluated condensed tannin and ascorbic acid content of the extracts is not significant (Table 3).

4. Discussion

In our search for natural products with antioxidant activity, we prepared hydromethanolic extracts of three native plants from Brazil. The difference in extraction yields (%w/w) could be due to the different levels of chemical and physical constituents in the pulp and seeds, because of the differences in the content of sugars, fiber, and other constituents present in the pulp.

According to Pereira et al. (2013), the pulp of *A. sylvatica* has 8.84 g of sugar content, 17.89 g of carbohydrates, 1.82 g of protein, and 8.74 g of total fiber. The *A. coriacea* pulp content has 11.91 g of carbohydrates, 1.07 g of protein, and 5.62 g of total fiber (Hiane et al., 1992).

The DPPH free radical scavenging assay is based on the ability of certain substances to donate a hydrogen atom to the radical, reducing it to hydrazine, provoking a change in coloration, from pale yellow to violet. This change is accompanied by the fall in coloring of

the 517 nm absorbance (Alves et al., 2010). The test of inhibition of the autoxidation of β -carotene/linoleic acid is based on the ability of certain substances to protect the beta-carotene from oxidation. This oxidation is caused by the free radicals formed during the peroxidation of linoleic acid, which attack the chromophore of the β -carotene emulsion resulting in a whitening reaction (Alves et al., 2010; Damasceno et al., 2011).

The antioxidant activity of vegetable extracts depends on the type and polarity of the extracting solvent, the isolation procedures, and the purity of the active compounds, as well as the assay techniques and substrate used (Meyer et al., 1998). Generally polar solvents provide slightly more active extracts than mixtures with less polar solvents. This factor may also have affected the results when using the methanol/water solvent, providing greater extraction of components.

Several studies that included the species of *Annona* report excellent antioxidant activity, such as, the leaves of *A. dioica* (Formagio et al., 2013); leaves, bark, roots, and seedcake of *A. squamosa* (Baskar et al., 2007; Mariod et al., 2012; Shirwaikar et al., 2004); pulp, seeds, and peel of *A. crassiflora* (Roesler et al., 2006; 2007); bark and leaves of *Annona salzmannii* (Costa et al., 2011, 2012a); leaves of *A. reticulata* and *A. muricata* (Baskar et al., 2007, Gomes et al., 2010); leaves of *A. senegalensis* (Ajboye et al., 2010); leaves of *A. pickelii* (Costa et al., 2011); and leaves of *A. vepretorun* (Costa et al., 2012b).

It has been suggested that the phenolic content of plant materials is correlated to their antioxidant activity (Velioglu et al., 1998). In this study, we found that the hydromethanolic seed extracts of *A. coriacea* had the best radical scavenging activity, with high total phenol and flavonoid content. This indicates that the antioxidant activity of the extracts is related to the contents of these constituents.

Phenolic compounds are considered to be secondary metabolites that are synthesized by plants during normal development, in response to stress conditions, and the compounds occur ubiquitously in plants as a diversified group of phytochemicals derived from phenylalanine and tyrosine. In food, phenolics may contribute to the bitterness, astringency, color, flavor, odor, and oxidative stability of the products. In addition, they have numerous beneficial effects, such as, free radical scavenging oxygen species, modulate the activity of some specific enzymes, inhibit cell proliferation, and have antimicrobial, anti-inflammatory, and anti-allergic potential (Manach et al., 2004).

According Sousa et al. (2007), the phenolic compounds are distributed in the following categories: Simple phenolics, phenolic acids (benzoic and cinnamic acid derivatives), coumarins, flavonoids, hydrolysable and condensed tannins, stilbenes, lignans, and lignins. They have the ability to inhibit lipid peroxidation and lipoxygenase *in vitro*. Consumption of flavonoid-containing fruits and vegetables has been linked to protection against cancer and heart disease (Hertog et al., 1992; Atoui et al, 2005).

In conclusion, our study has demonstrated the moderate antioxidant properties of the seed extracts of *Annona coriacea* and shown that this effect can be attributed to the phenol and flavonoid content. However, further studies on isolation and structure elucidation of active components from the extract, as well as, investigations into their inhibitory mechanism are very essential.

5. Acknowledgment

This study was supported by UFGD, Fundect, and Capes.

6. References

AJBOYE, TO., YAKUBU, MT., SALAU, AK., OLADIJI, AT., AKANJI, MA. and OKOGUN, JI., 2010. Antioxidant and drug detoxification potential of aqueous extract of *Annona senegalensis* leaves in carbon tetrachloride-induced hepatocellular damage. *Pharmaceutical Biology*, vol. 48, n. 12, p. 1361-1370.

ALASALVAR, C., AL-FARSI, M., QUANTICK, PC., SHAHIDI, F. and WIKTOROWICZ, R., 2005. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry*, vol. 89, p. 69–76.

ALHO, H. and LEINONEN, J., 1999. Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods in Enzymology*, vol. 299, p. 3–15.

ALMEIDA, SP., PROENÇA, CEB., SANO, SM. and RIBEIRO, JF., 1994. Cerrado: espécies vegetais úteis. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), Brasil, p. 48-335.

ALVES, CQ., DAVID, JM., DAVID, JP., BAHIA, MV. and AGUIAR, RM., 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, vol. 33, n. 10, p. 2202-2210.

ATOUI, AK., MANSOURI, A., BOSKOU, G. and KEFALAS, P., 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, vol. 89, p. 27–36.

BARREIROS, ALBS., DAVID, JM. and DAVID, JP., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, vol. 29, p. 113.

BASKAR, R., RAJESWARI, V. and KUMAR, TS., 2007. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 45, n. 5, p. 480-485.

BENZIE, IF. and STRAIN, JJ., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, vol. 239, p. 70–76.

BLOIS, MS., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, vol. 26, p. 1199- 1200.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, ME. and BERSET, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, vol. 28, p. 25–30.

COSTA, EV., DA CRUZ, PE., DE LOURENÇO, CC., DE SOUZA MORAES, VR., DE LIMA NOGUEIRA, PC. and SALVADOR, MJ., 2012a. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). *Natural Product Research*, vol. 15.

COSTA, EV., DUTRA, LM., DE JESUS, HC., NOGUEIRA, PC., MORAES, VR., SALVADOR, MJ., CAVALCANTI, SC., DOS SANTOS, RL. and PRATA, AP., 2011. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). *Natural Product Communications*, vol. 6, n. 6, p. 907-912.

COSTA, EV., DUTRA, LM., NOGUEIRA, PC., MORAES, VR., SALVADOR, MJ., RIBEIRO, LH. and GADELHA, FR., 2012b. Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. *Natural Product Communications*, vol. 7, n. 2, p. 265-266.

DAMASCENO, EIT., SILVA, JKR., ANDRADE, EHA., SOUSA, PJC. and MAIA, JGS., 2011. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 21, n. 1, p. 78-85.

DJERIDANE, A., YOUSFI, M., NADJEMI, B., BOUTASSOUNA, D., STOCKER, P. and VIDAL, N., 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, vol. 97, p. 654-660.

FORMAGIO, AS., KASSUYA, CA., NETO, FF., VOLOBUFF, CR., IRIGUCHI, EK., VIEIRA, MC. and FOGGIO, MA., 2013. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11, p. 13-14.

GOMES DE MELO, J., DE SOUSA ARAÚJO, TA., THIJAN NOBRE DE ALMEIDA E CASTRO, V., LYRA DE VASCONCELOS CABRAL, D., DO DESTERRO RODRIGUES, M., CARNEIRO DO NASCIMENTO, S., CAVALCANTI DE AMORIM, EL., DE ALBUQUERQUE, UP., 2010. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*, vol. 15 n. 12, p. 8534-8542.

- HERTOG, MGL., HOLLMAN, PCH. and VENEMA, DP., 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*, vol. 40, p. 1591-1598.
- HIANE, AP., RAMOS, MIL., RAMOS-FILHO, MM. and PEREIRA, JG., 1992. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos de alguns frutos nativos do estado de Mato Grosso do Sul. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, vol. 10, n. 1, p. 35-42.
- HUANG, D., OU, B. and PRIOR, RL., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, p. 1841–1856
- JAYAPRAKASHA, GK., SINGH, RP. and SAKARIAH, KK., 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, vol. 73, p. 285-290.
- KAUR, C. and KAPOOR, HC., 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, vol. 37, p. 153- 161.
- LIN, JY., and TANG, CY., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents In selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, vol. 101, p. 140.
- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C. and JIMÉNEZ, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, vol. 79, n. 5, p. 727-747.
- MARIOD, AA., ABDELWAHAB, SI., ELKHEIR, S., AHMED, YM., FAUZI, PN. and CHUEN, CS., 2012. Antioxidant activity of different parts from *Annona squamosa*, and *Catunaregam nilotica* methanolic extract. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, vol. 11, n. 3, p. 249-58.
- MAXSON, ED. and ROONEY, LW., 1972. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chemistry*, vol. 49, p. 719-729.
- MEYER, AS., HEINONEN, M. and FRANKEL, EN., 1998. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, vol. 61, p. 71–75.

- NOROOZI, M., ANGERSON, WJ. and LEAN, ME., 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 67, p. 1210-1218.
- OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., & PRIOR, RL., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, p. 4619–4626.
- PEREIRA, MC., STEFFENS, RS., JABLONSKI, A., HERTZ, PF., RIOS, AO., VIZZOTTO, M. and FLÔRES, SH., 2013. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 29, p. 19-24.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. and RICE-EVANS, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, p. 1231–1237.
- ROE, JH. and KUETHER, CA., 1943. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 147, p. 399-407.
- ROESLER, R., CATHARINO, RR., MALTA, LG., EBERLIN, MN. and PASTORE, G., 2007. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, vol. 104, p. 1048–1054.
- ROESLER, R., MALTA, LG., CARRASCO, LC. and PASTORE, G., 2006. Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). *Journal of Food Science*, vol. 71, p. 102-107.
- RUFINO, MSM., ALVES, RE., BRITO, ES., MORAIS, SM., SAMPAIO, CG., PÉREZ-JIMÉNEZ, J. and SAURA-CALIXTO, FD., 2007. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. Comunicado Técnico, ISSN 1679-6535. Fortaleza, CE.
- SHAHIDI, F., CHAVAN, UD., NACZK, M. and AMAROWICZ, R., 2001. Nutrient distribution and phenolic antioxidants in air-classified fractions of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, p. 926-933.

- SHIRWAIKAR, A., RAJENDRAN, K. and KUMAR, CD., 2004. In vitro antioxidant studies of *Annona squamosa* Linn. leaves. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 42, n. 8, p. 803-807.
- SIAN, BA., 2003. Dietary antioxidants-past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 14, p. 93-98.
- SILVA, S. and TASSARA, H., 2001. Frutas no Brasil. Empresa das Artes. São Paulo, SP, Brazil.
- SILVA, JA., SILVA, DB., JUNQUEIRA, NJ. and ANDRADE, LRM., 1994. Frutas Nativas dos Cerrados. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), p. 50-149.
- SOUSA, CMM., SILVA, HR., VIEIRA-JR, GM., AYRES, MCC., COSTA, CLS., ARAÚJO, DS., CAVALCANTE, LC., BARROS, EDS., ARAÚJO, PBM. and BRANDÃO, MS., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, vol. 30, n. 2, p. 351-355.
- VELIOGLU, YS., MAZZA, G., GAO, L. and OOMAH, BD., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, p. 4113-4117.

Tables

Table 1

Selected species for the evaluation of antioxidant activity

Plant species (voucher number)	Vernacular name	Ethnomedical uses	Part of plant tested (Extraction yield % w/w)
<i>A. coriacea</i> Mart. (DDMS 186)	marolo	Against chronic diarrhea (Rodrigues e Carvalho, 2001); antimalarial (Mesquita <i>et al.</i> , 2007); anti-helminthic (Santos & Sant'Ana, 2000, 2001); and leishmaniasis (Akendengue <i>et</i> <i>al.</i> , 1999)	Pulp (20.5), seeds (14.3)
<i>A. sylvatica</i> St.- Hill (DDMS 4600)	Araticum da mata	The leaves are used to treat malaria or as a febrifuge (Balbach, 1986)	Pulp (5.2), seeds (8.7)

Table 2:

Antioxidant activity of the four extracts of *Annona* fruits by DPPH, β -carotene bleaching, and ABTS test

Species		Test			
		DPPH		β -carotene/linoleic acid	ABTS ⁺
		IC ₅₀ μ g/mL	%FRS*	(%AA)	(μ M trolox/g extract)
<i>A. coriacea</i>	Pulp	822.19 \pm 13.89	13.49 \pm 2.83	32.32 \pm 4.02	57.18 \pm 4.0
	Seeds	330.55 \pm 2.34	31.53 \pm 1.65	51.59 \pm 6.43	159.36 \pm 8.32
<i>A. sylvatica</i>	Pulp	695.61 \pm 6.67	11.82 \pm 1.06	31.17 \pm 5.83	39.15 \pm 4.43
	Seeds	724.14 \pm 17.79	16.70 \pm 1.06	12.82 \pm 3.96	135.50 \pm 8.94
BHT		16.72 \pm 1.87	82.19 \pm 1.29	91.20 \pm 4.54	n.d.

Values were expressed as mean \pm SD (n = 3); n.d. = not determined; * %FRS = free-radical scavenging percentage (* antioxidant activity evaluated by the method of DPPH free-radical scavenging, with the final concentration equivalent to 250 μ g/mL of extract). IC₅₀ = corresponds to the concentration of 50% inhibition of DPPH and is calculated from the graph of I% (inhibition percentage) versus extract concentration in μ g/mL.

Table 3:
Levels of constituents the four extracts of *Annona* fruits

Species	Extracts	Levels of constituents (mg/g of the extract)			
		Phenols	Flavonoids	Condensed tannins	Ascorbic acid
<i>A. coriacea</i>	Pulp	57.67± 1.16	24.38± 2.45	17.43± 1.08	0.56± 1.58
	Seeds	147.08 ± 4.2	131.18 ± 2.31	45.76 ± 0.97	0.75± 1.06
<i>A. sylvatica</i>	Pulp	13.64 ± 2.18	13.74± 2.18	15.68 ± 2.04	0.95± 2.26
	Seeds	58.10 ± 1.45	51.11 ± 2.30	53.31 ± 1.01	0.68± 1.45

ANEXO E – Normas da revista para artigo 1

ANEXO F – Normas da revista para artigo 2