

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

CARLA ROBERTA FERREIRA VOLOBUFF

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE *Annona dioica* (ANNONACEAE)**

DOURADOS

2012

CARLA ROBERTA FERREIRA VOLOBUFF

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE *Annona dioica* (ANNONACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Universidade Federal da Grande Dourados

Orientador: Profa. Dra. Anelise Samara Nazari
Formagio

Co-orientador: Profa. Dra. Claudia Roberta Damiani

DOURADOS

2012

CARLA ROBERTA FERREIRA VOLOBUFF

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE *Annona dioica* (ANNONACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Orientadora: Prof. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio
FCA - UFGD

Prof. Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandoña
FACET - UFGD

Prof. Dra. Maria do Carmo Vieira
FCA - UFGD

Dourados, 10 de Outubro de 2012

*Dedico à minha querida mãe
Valdirene, meu porto seguro,
por ser meu exemplo de
superação e coragem.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e permitir tantas bênçãos em minha vida.

À minha mãe Valdirene, por todo amor, apoio, motivação e por nunca ter medido esforços para me auxiliar nesta trajetória.

À minha família, serei eternamente grata, por sempre estarem de braços abertos, pela dedicação e apoio permanentes. Aos meus irmãos Roberta e Paulo por terem me acolhido, pelas conversas, pelos risos e conselhos.

Ao meu amor Carlos pelo apoio, incentivo, paciência, por me acalmar e dar mais alegria à minha vida.

À professora e orientadora Anelise Formagio pela paciência, pelos valiosos ensinamentos, conselhos e por todas as oportunidades que me proporcionou, além de todo o auxílio dado a este trabalho.

Aos amigos do laboratório Luiz, Suellen, Marina e Lucas por contribuírem na realização dos testes biológicos.

Aos membros da Elite Carioca da Biotecnologia pela amizade, companheirismo e gargalhadas ao longo do curso. Em especial aos amigos Danielly, Lara, Nicholas, Mônica, Suellen, Luiz, Edinaldo, Elton, Patrícia, Thays e Igor pelo convívio e por todo apoio durante estes quatro anos.

À Prof. Dra. Zefa Pereira pela identificação da planta.

À Prof. Dra. Mary Ann por realizar a atividade antitumoral.

A todos aqueles que auxiliaram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

A Fundect e ao CNPq pela bolsa concedida.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso antes de qualquer coisa, querer.”

Amyr Klink

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ESQUEMAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 ANNONACEAE	14
2.2 Gênero <i>Annona</i>	15
2.3 <i>Annona dioica</i> St. Hill.....	21
2.4 Atividade Biológica	24
2.4.1 Atividade Antioxidante	24
2.4.2 Atividade Antitumoral e Toxicidade	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Coleta e Identificação da Planta	27
3.2 Secagem do Material e Obtenção do Extrato Metanólico	27
3.3 Triagem Fitoquímica	27
3.4 Fracionamento do Extrato Metanólico	28
3.5 Isolamento das Substâncias Químicas	28
3.6 Identificação dos Compostos Isolados	30
3.7 Avaliação da Atividade Antitumoral	29
3.8 Avaliação da Atividade Antioxidante	30
3.9 Teste de toxicidade	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

4.1	Determinação estrutural das substâncias isoladas	34
4.1.1	Substância AD-1	34
4.1.2	Substância AD-2	38
4.1.3	Mistura de AD-3 e AD-4	40
4.1.4	Substância AD-5	46
4.2	Resultados biológicos	47
4.2.1	Avaliação antioxidante.....	47
4.2.2	Toxicidade	48
4.2.3	Antitumoral.....	50
5	CONCLUSÃO	52
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>A. squamosa</i> (A), <i>A. muricata</i> (B), <i>A. reticulata</i> (C) e <i>A. cherimola</i> (D)	16
Figura 2: Folhas e frutos de <i>Annona dioica</i> , coletados na região de Dourados- MS ...	22
Figura 3: Descoloração do radical livre DPPH	25
Figura 4: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300, 06 MHz) de AD-1	35
Figura 5: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75, 5 MHz) de AD-1	36
Figura 6: Espectro de DEPT (CDCl_3) de AD-1	36
Figura 7: Espectro de RMN de ^1H (DMSO, 300,06 MHz) para AD-2	39
Figura 8: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO, 75,5 MHz) para AD-2	39
Figura 9: Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, DMSO- d_6) da mistura de AD-3 e AD-4	41
Figura 10: Espectro de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (DMSO- d_6 , 300,06 MHz) da mistura AD-3 e AD-4	42
Figura 11: Espectro de RMN de ^{13}C (75,5 MHz, DMSO- d_6) de AD-3 e AD-4	44
Figura 12: Espectro de DEPT (DMSO – d_6) de AD-3 e AD-4	44
Figura 13: Espectro de HMQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$, DMSO- d_6) de AD-3 e AD-4	45
Figura 14: Avaliação antitumoral de EAD de <i>A. dioica</i> frente a dez linhagens de celulares.....	50

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Procedimento empregado para isolamento dos constituintes do extrato metanólico de <i>A. dioica</i> (Annonaceae)	29
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de RMN de ^{13}C (δ , 75,45 MHz, CD_3OD) para a substância AD-1 e para o sitosterol 3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo (δ , 75,7 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	37
Tabela 2: Composto AD-2 e quercetina 3- <i>O</i> - β -galactosídeo	40
Tabela 3: Correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no espectro de COSY para as unidades aglicônicas de AD-3 e AD-4	43
Tabela 4: Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no espectro de HMQC para a mistura das substâncias AD-3 e AD-4	45
Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (δ , 300,06/ 75,5 MHz, mult., J em Hz, DMSO-d_6) para as substâncias AD-4 e para o canferol 3- <i>O</i> - β -galactosídeo e da AD-3 e para a quercetina 3- <i>O</i> - β -galactosídeo	46
Tabela 6: Atividade antioxidante DPPH (IC_{50}) para extrato metanólico, frações e composto isolado de <i>A. dioica</i>	47
Tabela 7: Teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	48
Tabela 8: Atividade larvicida frente à <i>Artemia salina</i> com alguns extratos e frações de plantas da família Annonaceae	49
Tabela 9: Avaliação da atividade antitumoral (valores de IC_{50} , IC_{100} e LC_{50} em $\mu\text{g/mL}$) para extrato metanólico de <i>A. dioica</i> e doxorubicina	51

RESUMO

Espécies da família Annonaceae têm despertado a atenção de vários pesquisadores, por serem largamente empregadas na etnofarmacologia. O objetivo do trabalho foi realizar o estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade a atividade antioxidante e antitumoral de *Annona dioica*. O fracionamento por técnicas cromatográficas conduziu no isolamento de sitosterol e flavonóides glicosilados derivados do canferol e da quercetina. O extrato metanólico, frações e substância foram altamente ativos na inibição da formação de radicais livres. O extrato metanólico e frações apresentaram elevada toxicidade. O extrato metanólico apresentou potente atividade antitumoral para quatro linhagens de células tumorais, com concentrações inferiores a $6,4 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Araticum nú, atividade biológica, fitoquímica, flavonóides.

1 INTRODUÇÃO

As plantas são fontes importantes de produtos naturais com uma vasta aplicação, uma vez que compostos encontrados na natureza revelam uma gama inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas.

O emprego de produtos naturais de origem vegetal no desenvolvimento de substâncias biologicamente ativas tem aumentado consideravelmente, porém, das 350.000 a 550.000 espécies de plantas existentes, apenas um pequeno percentual foi investigado fitoquimicamente. Além disto, a fração submetida a investigações farmacológicas ou biológicas é ainda menor. Dados revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal ou químico (SIMÕES, 1999).

Dentre as substâncias empregadas para a geração de produtos de importância econômica, destacam-se os fitoterápicos preparados a base de plantas medicinais, como a sete-sangrias (*Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr.) e a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e os fitofármacos que são substâncias extraídas de vegetais, que apresentam atividades farmacológicas como o jaborandi (*Pilocarpus* spp.), que por meio de suas folhas produz a pilocarpina, substância utilizada para o tratamento do glaucoma (SIMÕES et al., 2003).

A investigação fitoquímica é de grande importância, pois o isolamento de princípios ativos e a modificação química destes podem resultar na descoberta de novos produtos com aplicação terapêutica. Outro aspecto a ser considerado, é a classificação das plantas em função de seus constituintes químicos fornecendo subsídio para estudos de quimiotaxonomia.

Em função dos aspectos discutidos, o nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo o estudo do potencial químico, farmacológico e biológico de plantas presentes na região de Dourados-MS. O Estado de Mato Grosso do Sul apresenta grande diversidade de vegetação, como Cerrados, matas semidecíduas, matas de galeria, dentre outras. Os Cerrados cobrem 65% e as florestas semidecíduas 8,9% da área do Estado (MATO GROSSO DO SUL, 1990). Das várias famílias presentes nesta região, destaca-se Annonaceae, por sua ampla distribuição nos Cerrados e por ter espécies ocorrentes ainda não estudadas cientificamente e amplamente utilizadas pela população. O objetivo deste estudo foi investigar e isolar os principais constituintes químicos

presentes no extrato metanólico de *A. dioica*, bem como a caracterização dos constituintes isolados por técnicas espectroscópicas e verificar a ação biológica através da avaliação de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, atividade antitumoral e o potencial antioxidante.

2 REVISÃO DA LITERATURA

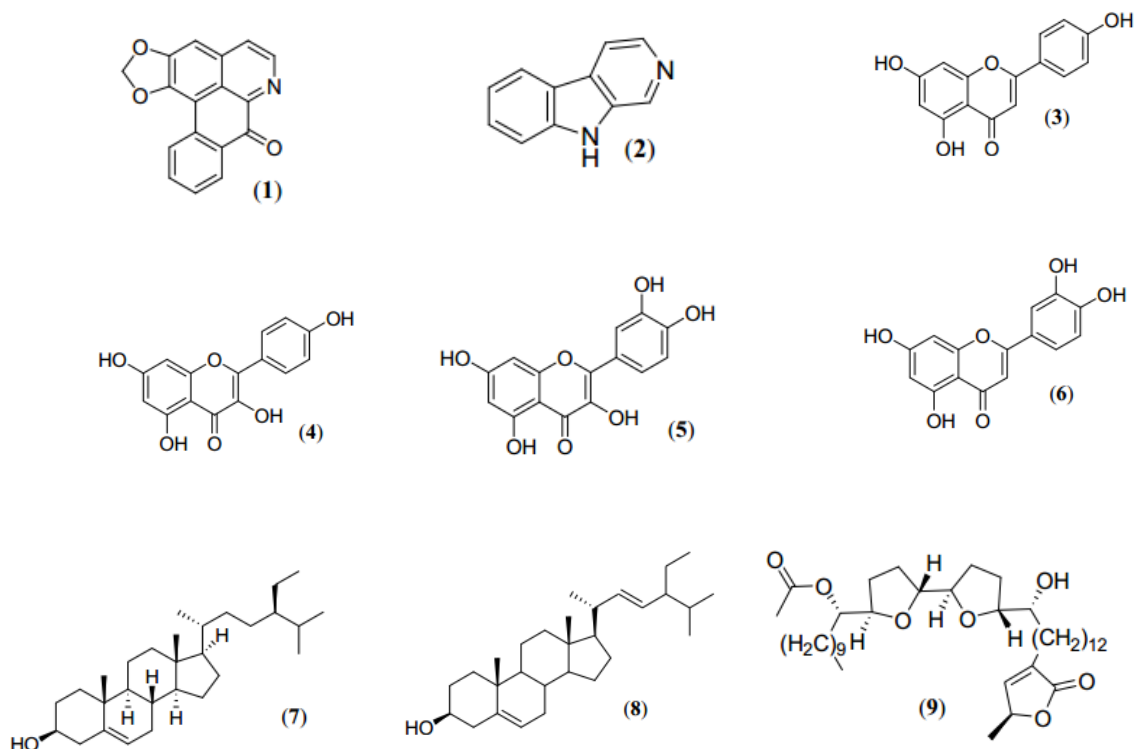
2.1 ANNONACEAE

A família Annonaceae é uma das maiores entre as Angiospermas basais, com aproximadamente 135 gêneros e 2500 espécies (CHATROU et al., 2004). No Brasil é representada por 26 gêneros, sendo sete endêmicos, com cerca de 260 espécies (MAAS et al., 2001). Plantas desta família são caracterizadas por apresentarem folhas simples, dispostas alternadamente em mesmo plano, ao longo dos ramos e pela semelhança entre seus frutos. As flores são isoladas, auxiliares, grandes carnosas e sedosas, de coloração interna creme-amarelada. Fruto sincarpo oval, grande, amarelo-esverdeado a marrom, com polpa firme de cor creme e comestível, frutifica em novembro (ALMEIDA et al., 1998).

Recebem nomes como araticum-do-cerrado, dado a diferentes espécies encontradas nos Cerrados da região central do Brasil ou marolo, como é conhecido por todo o sul de Minas Gerais, onde são nativos e espontâneos nos enclaves de campos de cerrados existentes na região.

Em relação a estudos fitoquímicos, já foram isoladas 417 acetogeninas, sendo que 176 foram relatadas no período de 1998 a 2004, com predominância para espécies de *Annona* (BERMEJO et al., 2005).

O alcalóide oxoaporfínico, liriodenina (**1**), é o mais encontrado em espécies da família Annonaceae (SANTOS et al., 2003). Os de ocorrência menos comum são os alcalóides β -carbolínicos (**2**) (WANG et al., 2002). Flavonóides são os compostos fenólicos de maior ocorrência como *O*-glicosídeos de apigenina (**3**), canferol (**4**), quercetina (**5**) e luteolina (**6**) (SANTOS e SALATINO, 2000). Entre os esteróides, são o β -sitosterol (**7**) e o estigmasterol (**8**) (LEBOEUF et al., 1982). A primeira acetogenina de Anonácea, a uvaricina (**9**) foi isolada das raízes de *Uvaria acuminata* (JOLAD et al., 1982).



A busca por espécies da família Annonaceae também se destaca por apresentar as mais variadas atividades biológicas, como antimicrobiana, antiemética, pesticida, vermífida, abortiva, antitumoral, citotóxica, inibidora do apetite e antimalárica (LEBOEUF et al., 1982).

2.2 *Annona*

O gênero *Annona* possui 120 espécies catalogadas (BARROSO et al., 2002). É economicamente importante por conter espécies que são largamente cultivadas e comercializadas no Brasil, por apresentarem frutos com propriedades nutricionais quando consumidos *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (LORENZI e MATOS, 2002), como *A. squamosa* (fruta-do-conde), *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa) e *A. cherimola* (cherimóia) (**Figura 1**).



Figura 1. *A. squamosa* (A), *A. muricata* (B), *A. reticulata* (C) e *A. cherimola* (D).

Espécies de *Annona* são largamente empregadas na medicina popular devido suas diferentes propriedades farmacológicas atribuídas principalmente aos alcalóides e, mais recentemente, a acetogeninas e flavonóides, principais constituintes bioativos encontrados em gêneros específicos das Anonáceas (ALALI et al., 1999; BERMEJO et al., 2005; KOTAKE e OHTA, 2003). Estudos da literatura relatam atividades como antimicrobiana, inseticida e antiparasitária, em particular contra *Leishmania* sp., *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi* (QUEIROZ et al., 1996; SAHPAZ et al., 1994).

De acordo com Lako et al. (2006), a polpa do fruto de *A. muricata* possui propriedade antioxidante, a qual está relacionada à presença de antocianinas e polifenóis (KUSKOSKI et al., 2005). O estudo biomonitorado do extrato etanólico das folhas frente à *Artemia salina* mostrou-se tóxico apresentando LC_{50} de 0,49 $\mu\text{g/mL}$ (LUNA et al., 2006).

Na casca de *A. salzmanii* D.C. foram encontrados quatro alcalóides benzilisoquinolínicos, reticulina, annonaína, laureliptina e isoboldina. Em que apenas annonaína apresentou propriedade antibacteriana, enquanto os três alcalóides apresentaram atividade antifúngica (PAULO et al., 1992).

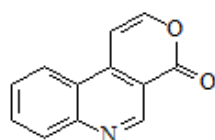
O extrato metanólico do caule e casca de *A. senegalensis* Pers. (araticum-da-areia) apresentou atividade para o tratamento da diarreia (SULEIMAN et al., 2008).

O isolamento de uma acetogenina mono-tetrahydrofurânica das sementes de *A. reticulata* apresentou citotoxicidade nos estágios G1 e S do ciclo celular, sugerindo seu potencial anticâncer (YUAN et al., 2003).

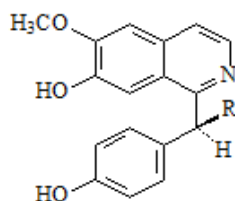
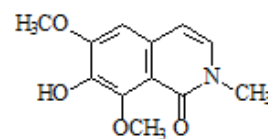
Foi identificado potencial alelopático de algumas espécies da família Annonaceae, dentre elas *A. crassiflora*, *A. coriacea*, *A. dioica*, *A. sylvatica* e *Duguetia*

furfuracea sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (FORMAGIO et al., 2010).

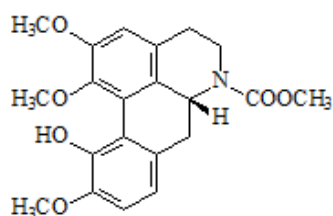
Uma das espécies mais estudadas, *A. chemirola*, foram isolados alcalóides como cherimolina (10), annocherina A e B (11-12), cherianoina (13) e romucosina H (14); acetogeninas, aromina A (15); amidas (16-18) e ciclopeptídeos (19-21) (CHEN, 1999; 2001; WÉLÉ, 2005).



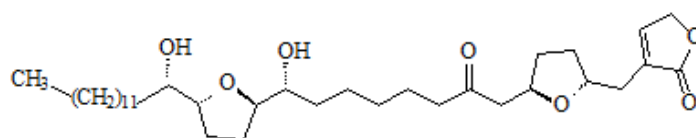
(10)

(11) R=OH
(12) R=OCH₃

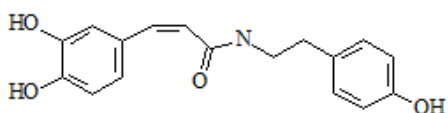
(13)



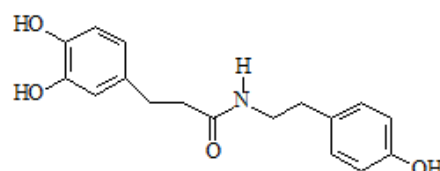
(14)



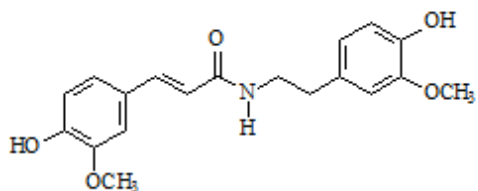
(15)



(16)



(17)



(18)

H-Pro-Gly-Leu-Asn-Ala-Val-Thr

(19)

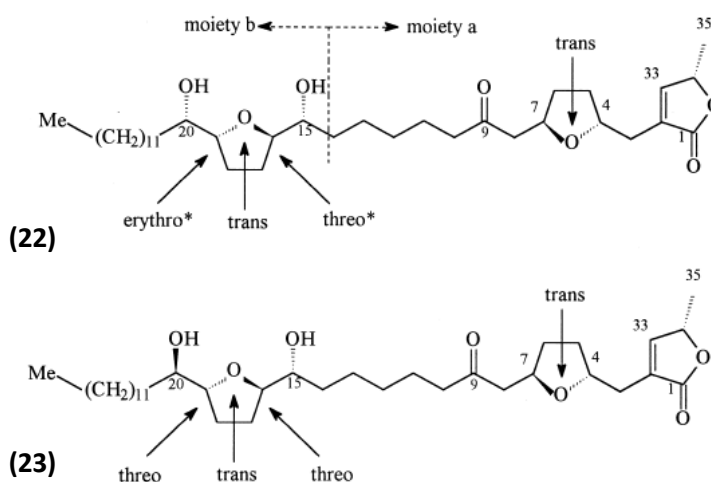
H-Pro-Gly-Met-Gly-Ile-Tyr-Leu-Pro-Met

(20)

H-Pro-Met-Pro-Gly-Met-Gly-Ile-Tyr-Leu

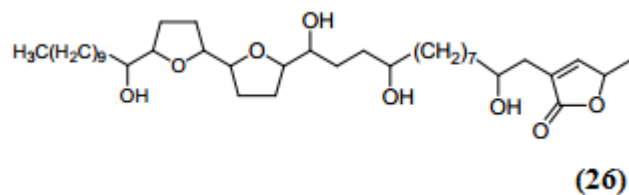
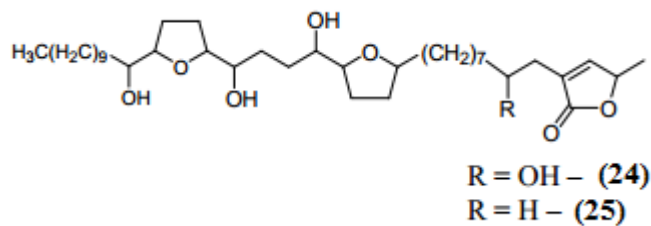
(21)

O ensaio citotóxico biomonitorado do extrato metanólico das sementes de *A. cherimola*, conduziu ao isolamento de dois ciclopeptídeos: cherimolaciclopeptídeo E e cherimolaciclopeptídeo F, que apresentaram atividade citotóxica significativa contra o carcinoma da nasofaringe humana (WELÉ et al., 2005). O fracionamento cromatográfico do extrato metanólico do caule de *A. cherimola*, levou ao isolamento de uma acetogenina, bis-THF (um anel de THF sendo em C-4 e outro em C-16), aromina-A (**22**) juntamente com a conhecida acetogenina esquamosina (**23**) (CHEN et al., 1999).

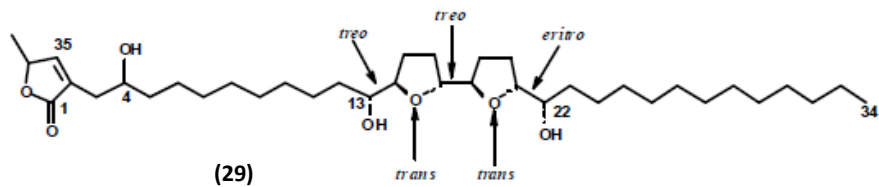
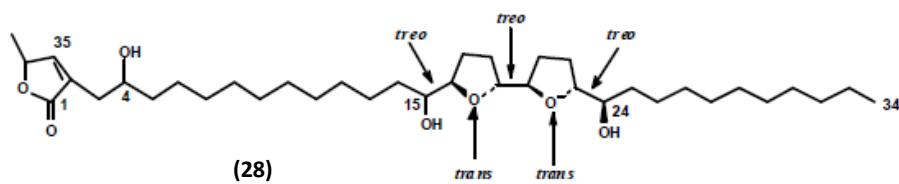
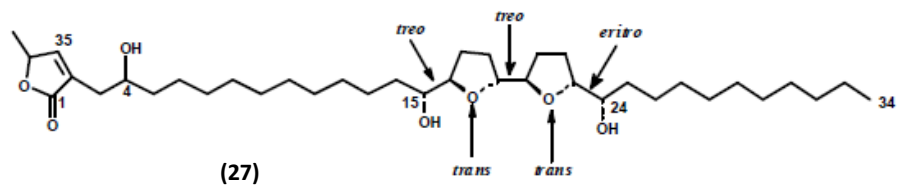


Estudos fitoquímicos das raízes de *A. coriacea* identificaram diterpenóides com esqueleto clerodano e acetogeninas como coriedienina, bisepoxicoriadienina, coriacina, 4-deoxicoriacina, gigantetronenina e gigantecina, que demonstraram atividade citotóxica contra células tumorais (YU et al., 1994). A lectina, denominada ACLEC, caracterizada nas sementes de *A. coriacea* (COELHO et al., 2003), aumentou a migração de neutrófilos na cavidade abdominal em camundongos (COELHO et al., 2006). O extrato alcoólico das sementes também demonstrou efeito genotóxico, aumentando a frequência de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea de camundongos (FAGUNDES et al., 2005) (SOUSA et al., 2007).

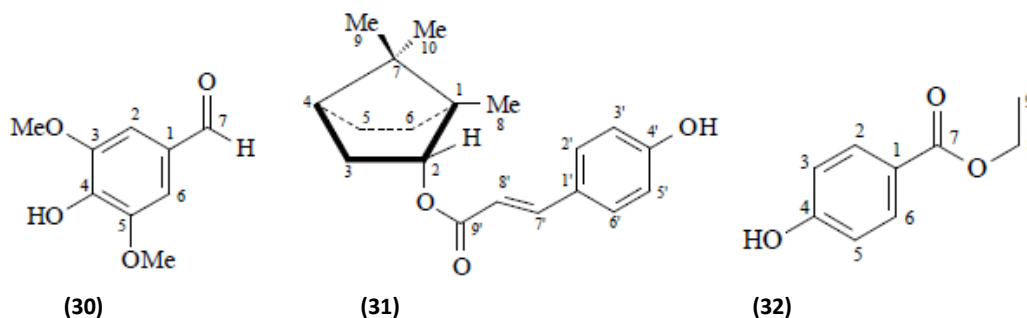
O estudo realizado por Gonçalves e colaboradores (2009) com a madeira de *A. crassiflora*, resultou na obtenção de dois alcalóides: aterospermidina e liriodenina. Este último possui atividade antimicrobiana e tripanosomicida; já o alcalóide aterospermidina possui atividade contra células de hepatoma humano. Das sementes foram isoladas três acetogeninas inéditas, a crassiflorina (**24**), a desoxicrassiflorina (**25**) e a araticulina (**26**) (PIMENTA, 1995).



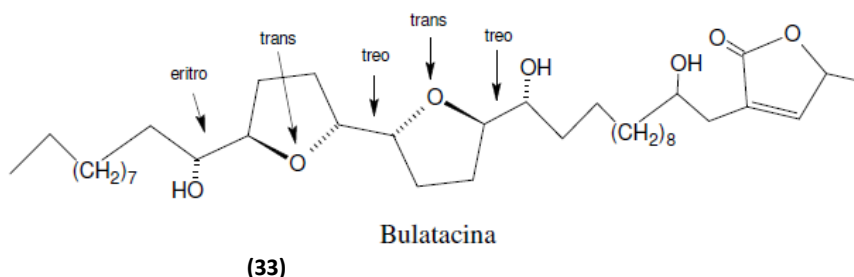
O estudo biomonitorado pelo teste de citotoxicidade das sementes de *A. cornifolia* (araticum de raposa) sobre *A. salina* resultou no isolamento de três acetogeninas inéditas para esta espécie: bulatacina (**27**), asimicina (**28**) e glaucanissina (**29**) (SANTOS et al., 2007).



A investigação fitoquímica dos extratos em hexano e etanol da madeira e folhas e extrato em acetato de etila dos frutos de *A. cacans* Warming (araticum-cagão) permitiu o isolamento e identificação de 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (**30**), *p*-hidroxicinamato de bornila (**31**), *p*-hidroxibenzoato de etila (**32**) (NASCIMENTO, 2008).



A acetogenina bulatacina (**33**), isolada de *A. bullata*, detém grande interesse devido à sua atividade sobre células leucêmicas L1210 (AHAMMADSAHIB et al., 1993).



Conforme Liu et al. (1999), duas novas acetogeninas mono-THF, annoglacinas A e B têm sido isoladas a partir do fracionamento dos extratos etanólicos das folhas de *A. glabra*, frente à toxicidade de *A. salina*. A partir das sementes de *A. glauca* (araticum-do-brejo) foram obtidos dois ciclopeptídeos: glaucaciclopeptídeo A (WELÉ et al., 2005).

O fracionamento biomonitorado do extrato da casca de *A. foetida* proporcionou o isolamento de um alcalóide antileishmanicida pirimidina- β -carbolina, *N*-hidroxanomontina, juntamente com annomontina, *O*-metilmoscatolina e liriodenina (COSTA et al., 2006).

Em função da importância de *Annona*, a investigação química e biológica de mais uma espécie, *Annona dioica*, visa ampliar os estudos tanto quimiotaxonômicos quanto biológicos do gênero.

2.3 *Annona dioica* St. Hill

É um arbusto de Cerrado com vasta dispersão na América do Sul, conhecida popularmente como araticum-nú (**Figura 2**). Na medicina tradicional, os frutos e folhas são utilizados contra reumatismo e as sementes contra diarreia (POTT e POTT, 1994). No Paraguai, as folhas são usadas para fazer chá ou gargarejo como anticatarral, enquanto os frutos comestíveis possuem propriedades sedativas e suas sementes são utilizadas como inseticidas ou no tratamento de infecções parasitárias da pele (GONZALEZ, 1992).



Figura 2. Folhas e frutos de *Annona dioica*, coletados na região de Dourados-MS.

Classificação taxonômica da espécie

Reino: Plantae

Ordem: Magnoliales

Divisão: Spermatophyta

Subdivisão: Angiospermae

Família: Annonaceae

Subfamília: Annonoideae

Reino: Magnoliophyta

Tribo: Unoneae

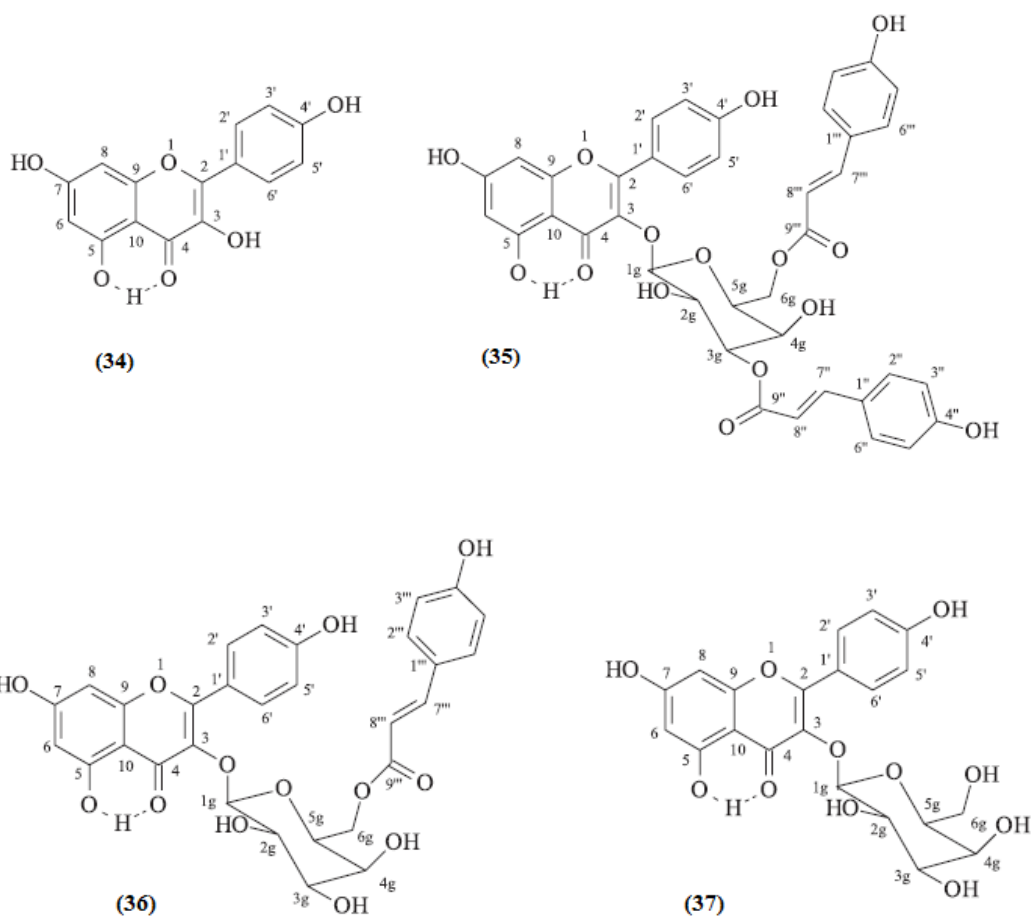
Classe: Magnolitaе

Sub-classe: Magnoliidae

Gênero: *Annona*

Espécie: *Annona dioica*

Investigações fitoquímicas anteriores realizadas com o extrato etanólico da madeira de *A. dioica*, resultou no isolamento e caracterização de seis alcalóides e, das folhas, quatro flavonóides (VEGA et al., 2007). Os flavonóides canferol (**34**), canferol 3-*O*-[3'', 6''-di-*O*-*p*-hidroxicinamoil]- β -galactopiranosídeo (**35**), canferol 6''-*O*-*p*-hidroxicinamoil- β -galactopiranosídeo (**36**) e canferol 3-*O*- β -galactopiranosídeo (**37**), foram isolados a partir do extrato metanólico das folhas de *A. dioica* coletadas no Paraguai (VEGA et al., 2007).



2.4 Atividade Biológica

2.4.1 Atividade antioxidante

O processo de envelhecimento está relacionado ao aparecimento de uma série de doenças degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares, a aterosclerose, derrame cerebral e vários tipos de câncer. As reações provocadas por radicais livres são ubíquas em sistemas biológicos e são reguladas pelo sistema de defesa antioxidante enzimático, que em conjunto com os antioxidantes exógenos limitam a média de danos produzidos por radicais livres a um nível tolerável (HUDSON, 1990).

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e, dentre os naturais se destacam o ácido ascórbico, a vitamina E e o β -caroteno.

Muitos antioxidantes utilizados atualmente são de origem fenólica, e estão presentes na dieta humana. Dessa forma, compostos de natureza terpênica, principalmente diterpenos e outros fenilpropanóides e flavonóides passaram a ser pesquisados com maior intensidade buscando determinar seu mecanismo de ação e procurando relacioná-los com as propriedades químico-biológicas apresentadas pelos mesmos.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar as atividades antioxidantes *in vitro*, de maneira a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destaca-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico, o método de sequestro de radicais livres (DPPH), peroxil-ORAC e ABTS.

O método de radicais livres está baseado no descoramento e uma solução composta por radicais livres estáveis DPPH de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; HUANG et al., 2005) (**Figura 3**), fundamenta-se em medidas espectrofotométricas de descoloração.

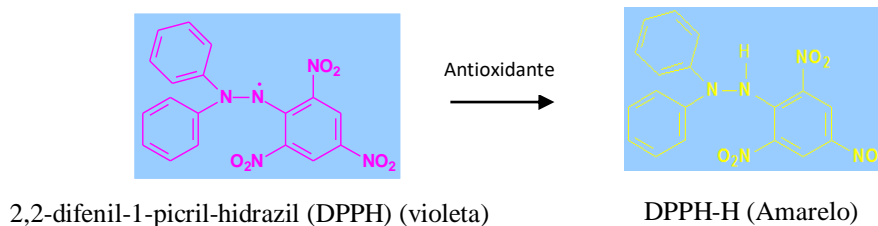


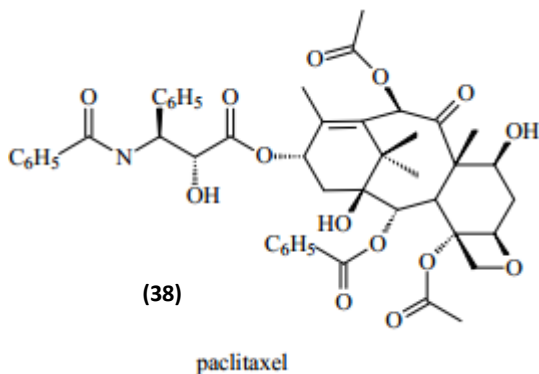
Figura 3. Descoloração do radical livre DPPH.

2.4.2 Atividade Antitumoral e Toxicidade

No Brasil as doenças tumorais neoplásicas são consideradas como a terceira causa mais frequente de morte no país (PITA, 2010). Assim observa-se a grande necessidade em realizar estudos com plantas medicinais na busca por novas drogas antitumorais.

Após inúmeros estudos, algumas substâncias isoladas de fontes naturais tornaram-se modelos para o desenvolvimento de novos fármacos. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae) é fonte dos alcalóides, vincristina e vimblastina, efetivos no tratamento de leucemia (HOSTETTMANN et al., 2003).

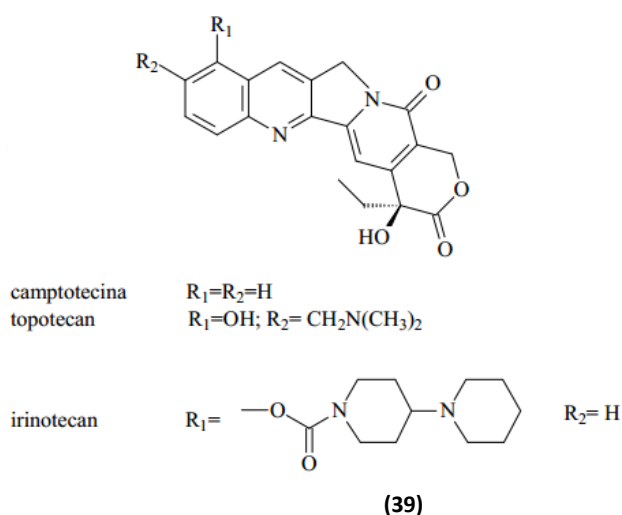
O diterpeno paclitaxel (**38**) (Taxol®) foi inicialmente isolado a partir das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), e posteriormente, em outras espécies do gênero *Taxus*, nas folhas de *Taxus baccata* L. O taxol é utilizado na terapia de cânceres ginecológicos como no câncer de ovário resistente à quimioterapia clássica (HOSTETTMANN et al., 2003).



O alcalóide camptotecina (**39**) foi obtido por meio do isolamento da planta ornamental chinesa *Camptotheca acuminata* D. (Nyssaceae). Em função de sua

atividade antitumoral acompanhada de elevada toxicidade e pouca solubilidade, estudos foram realizados para encontrar uma estrutura análoga mais ativa e menos tóxica. Topotecan (Hycamtin®) foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de casos avançados de câncer de ovário, resistentes a outros tipos de quimioterápicos. Em 1996 aprovou-se o análogo injetável, irinotecan HCl, para o tratamento de câncer de cólon e reto (HOSTETTMANN et al., 2003).

Diferentes espécies da família Annonaceae foram avaliados frente ação antitumoral. As atividades citotóxicas mais fortes foram detectadas para os extratos etanólico das cascas da raiz de *A. crassiflora* (DE MESQUITA et al., 2009).



Uma abordagem utilizada para se ter relação com atividade anticancerígena é a atividade citotóxica frente à *Artemia salina*, onde o experimento consiste em medir qual a concentração do produto que mata 50% da população de *Artemia*, fazendo assim uma alusão às células cancerosas (PERFEITO et al., 2005).

O bioensaio com o microcrustáceo é uma das técnicas utilizadas na avaliação da toxicidade geral de compostos orgânicos, metodologia que proporciona resultados rápidos, com boa reprodutibilidade, exigindo o mínimo de esforço e é aplicável em uma gama de análogos, pelo fato deste microcrustáceo ser de fácil crescimento e manutenção (BARAHONA e SANCHEZ-FORTÚN, 1994, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e Identificação da Planta

As folhas de *A. dioica* foram coletadas em Dourados, Mato Grosso do Sul e identificada pela Dra. Zefa Valdevina Pereira. Posteriormente, uma exsiccata (DDMS4598) foi depositada no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS.

3.2 Secagem do Material e Obtenção do Extrato Metanólico

A secagem do material vegetal foi realizada ao ar, à temperatura ambiente e em seguida, triturado em moinho de facas. A amostra foi submetida à extração por maceração com metanol, exaustivamente e posteriormente filtrada e concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida, para a obtenção do extrato metanólico (24,5g).

3.3 Triagem Fitoquímica

Os metabólitos secundários foram investigados primeiramente por testes químicos, através da adição de reagentes que provocam alteração ou intensificação na cor dos tubos, contendo as amostras e por cromatografia em camada delgada (CCD). Flavonóides pela reação de Shinoda, alcalóides pelo reagente de Dragendorff e Mayer, esteróides e triterpenóides pela reação de Lieberman-Burchard, taninos pela reação química com sais de Ferro. Para presença de saponinas, foram realizados métodos particulares, verificando-se a formação de uma suspensão de espuma por agitação manual. Para avaliação de cumarina, foi observado o aparecimento da fluorescência, quando gotas da amostra foram aplicadas em papel de filtro e submetidas à luz UV (MATOS, 1988; FALKENBERG et al., 2003).

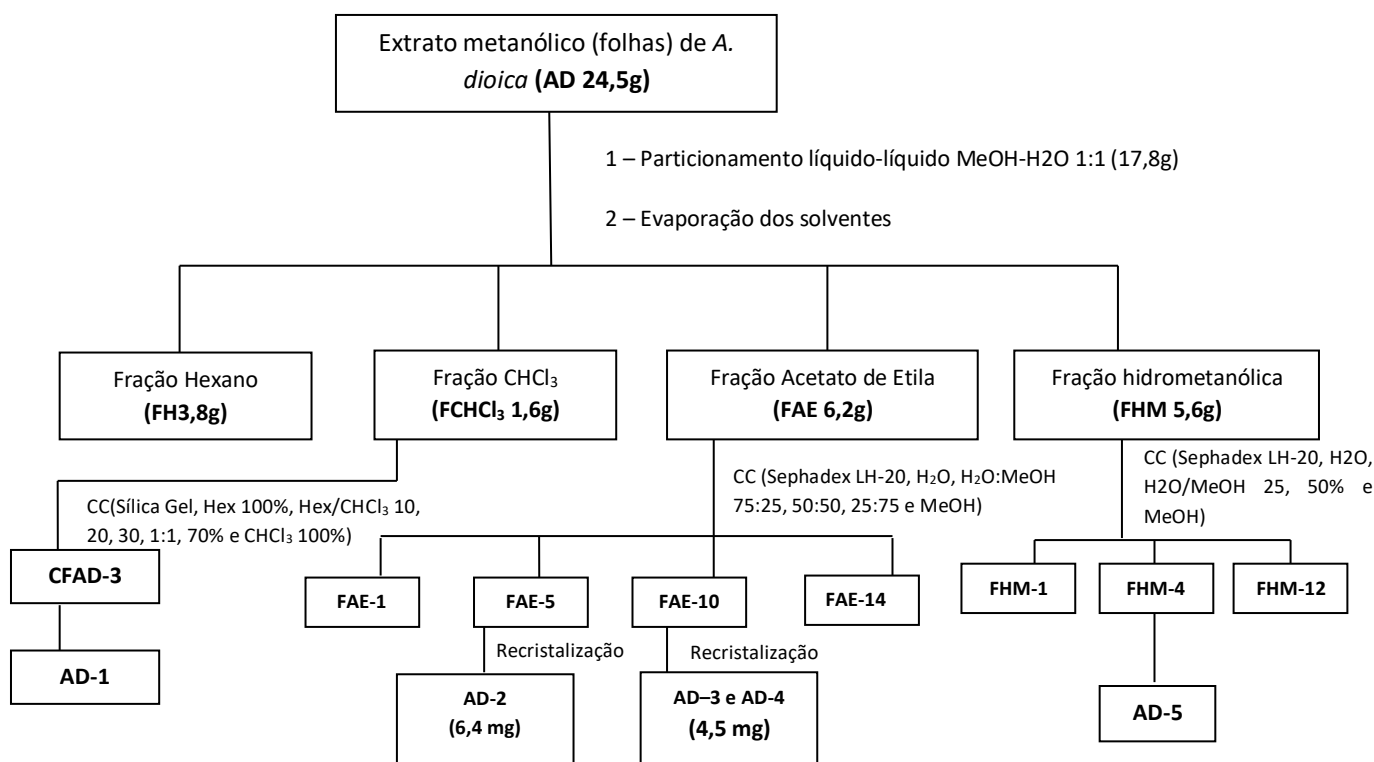
3.4 Fracionamento do Extrato Metanólico

O extrato metanólico (17,8g) foi dissolvido em metanol/água 1:1 e particionado sucessivamente em hexano, clorofórmio e acetato de etila, para posterior obtenção das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidrometanólica.

3.5 Isolamento das Substâncias Químicas

As frações obtidas do fracionamento do extrato metanólico, foram submetidas a métodos cromatográficos para isolamento dos principais metabólitos secundários. Extratos de baixa ou média polaridade foram fracionados por meio de coluna de sílica gel (70-230 ou 230-400 mesh) com diferentes solventes orgânicos e em cromatografia em gel de Sephadex LH-20. As frações também foram submetidas à recristalização, monitoradas por CCD e posteriormente encaminhadas à análise espectrométrica.

O **Esquema 1** apresenta uma visão geral do procedimento empregado para o isolamento dos constituintes do extrato metanólico de *A. dioica*.



Esquema 1: Procedimento empregado para isolamento dos constituintes do extrato metanólico de *A. dioica* (Annonaceae).

A fração **FCHCl₃** (1,6g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel, eluída em hexano, hexano/clorofórmio 10, 20, 30, 1:1, 70% e clorofórmio resultando em 83 frações. De acordo com a semelhança em CCD, foram obtidas 22 frações. A fração **CFAD-3** forneceu uma substância codificada como **AD-1**.

Parte da fração acetato de etila (**FAE**) (3,02g) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 eluída com H₂O, H₂O:MeOH 75:25, 50:50, 25:75 e MeOH. Foram obtidas 61 frações de aproximadamente 25,0 mL cada, que foram reunidas em 14 novas frações, conforme semelhança apresentada através de análise em CCD. Pela análise das frações **FAE-5** a **FAE-10** em CCD, observou-se que as frações apresentaram semelhança quando submetidas à presença de iodo e pulverização com solução de ácido sulfúrico/metanol 1:1, sendo cristalizadas com acetona/metanol, fornecendo as substâncias puras como um sólido amarelo codificadas como **AD-2**, **AD-3** e **AD-4**.

A fração **FHM** (3,0 mg) foi submetida à filtração em coluna de Sephadex LH-20, eluída em H₂O, H₂O/MeOH 25, 50% e MeOH, fornecendo 62 frações de

aproximadamente 10,0 mL cada, que após reunidas de acordo com semelhança em CCD, resultaram em 12 novas frações. A fração **FHM-4** foi cristalizada com metanol, fornecendo uma substância como um sólido amarelo codificado como **AD-5**.

3.6 Identificação dos Compostos Isolados

A identificação dos compostos isolados foi com base em análise de seus dados espectroscópicos e espectrométricos (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMQC e HMBC) e dados da literatura, a fim de auxiliar na determinação estrutural.

3.7 Avaliação da Atividade Antitumoral

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada no CPQBA – UNICAMP/Campinas sob responsabilidade da Prof. Dra. Mary Ann Foglio. Os ensaios foram realizados pelo método colorimétrico com sulforrodamina B (MONKS et al., 1991) a doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

O extrato metanólico foi avaliado em culturas de células tumorais humanas de Melanoma (UACC-62), Mama (MCF-7), Ovário Resistente (NCI/ADR-RES), Pulmão (NCI-H460), Leucemia (K-562), Ovário (OVCAR-3), Próstata (U251), Cólon (HT-29), Renal (786-0) e VERO. Os valores de IC_{50} , IC_{100} e LC_{50} foram calculados a partir da curva de concentração *versus* porcentagem de crescimento.

Foram plaqueados 100 μL de células, em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação em placas de 96 compartimentos. Estas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e 100% de umidade. Para cada linhagem foi utilizado um número estipulado de placas, além da placa T0 (Placa controle), dependendo da quantidade de células obtidas na contagem.

Diluição das amostras

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 1 g/ml resultando em soluções estoques. Estas soluções foram diluídas

40 vezes em RPMI/SFB/gentamicina. Foram adicionadas 100 μ L do extrato a ser testado nas placas de 96 compartimentos, exceto na T₀, nas doses de 0,25; 2,5; 25; 250 mg/ml, sendo realizada no mesmo momento, a fixação e posterior leitura da placa T₀, determinando assim a quantidade de células presentes no momento em que os extratos foram colocados. As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período, foram realizadas as leituras pelo ensaio do SRB.

Ensaio do SRB

As placas de 96 compartimentos foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e foram fixadas com 50 μ L de ácido tricloroacético 50% (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C. Após esse tempo, foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Estas placas foram mantidas a temperatura ambiente até a secagem completa.

Em seguida, as células foram coradas pela adição de 50 μ L de SRB a 0,4% (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1%. Estas foram incubadas a 4°C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente.

O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10 μ L e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

Análise dos resultados

Foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e através da fórmula abaixo, foi determinada a inibição de crescimento (IG) de cada amostra testada.

Se $T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresenta IG.

Se $\geq T_0$ mas $< C$, a droga será citostática e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$.

Se $T < T_0$ a droga será citocida a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$

Sendo que T é a média da absorbância da célula tratada; C é o controle de célula; T₀ é o controle das células no dia da adição das drogas. O resultado obtido foi subtraído de 100% obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma dose-dependente.

3.8 Atividade Antioxidante

A investigação da atividade antioxidante do extrato e composto isolado foi realizada pelo método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (\cdot DPPH \cdot) utilizando como controle positivo o BHT, conforme metodologia de Yen e Wu (1999) com modificações. O método consiste no monitoramento do consumo do radical livre DPPH \cdot pelas amostras, através do decréscimo da medida de absorbância. Alíquotas de 1 mL das amostras foram adicionadas a 2 mL da solução de DPPH \cdot 0,004% e incubadas na temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da absorbância de cada amostra foi realizada no espectrofômetro a 517 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula:

$$\% I = (A_0 - A)/A_0 \times 100.$$

Onde A₀ é a absorbância do DPPH \cdot (controle) e A é a absorbância da amostra mais DPPH \cdot .

3.9 Teste de Toxicidade

Para avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*, foi utilizada a metodologia de Neto e colaboradores (2009) com algumas modificações. Os ovos do microcrustáceo são colocados para eclodir em recipiente com solução salina na concentração de 3,8 g/L, sob oxigenação e radiação luminosa por 48 horas. Após este período, 40 mg de extratos secos (metanólico e frações hexânica, acetato de etila, clorofórmica e hidrometanólica) foram diluídos em 4 mL de metanol e alíquotas de 10, 50, 100, 250 e 500 μ L foram

transferidas a tubos de ensaio. Posterior à evaporação do solvente, adicionaram-se 5 mL de solução salina, sendo colocados 10 náuplios de *A. salina* para cada tubo, aguardando-se o período de 24 horas, seguido da contagem dos microcrustáceos vivos e mortos. Os dados foram tratados no programa Origin 5.0 para o cálculo da CL_{50} , que é a concentração letal para 50% para *A. salina*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação estrutural das substâncias isoladas

O estudo químico do extrato metanólico de *A. dioica* resultou no isolamento de duas substâncias puras codificadas como **AD-1** e **AD-2**, uma mistura de duas substâncias **AD-3** e **AD-4** e uma substância ainda em fase de elucidação.

As substâncias isoladas correspondem principalmente à classe de compostos, flavonóides e esteróide. As estruturas das substâncias isoladas foram propostas pela análise de seus dados espectroscópicos e comparação com dados obtidos da literatura.

4.1.1 Substância AD-1

A substância **AD-1**, isolada da fração **FCHCl₃**, apresentou-se como cristais brancos e foi identificada como sendo 3-*O*- β -glucopiranosil sitosterol baseado nos dados de RMN de ¹H e ¹³C e por comparação com dados encontrados na literatura (ARRIAGA et al., 1990)

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 4**) apresentou sinais de hidrogênios metílicos e metilênicos em δ_H 0,60 – 2,50, de hidrogênios oximetínicos em δ_H 3,29 (m) (H-3) e de hidrogênio ligado à dupla ligação em δ_H 5,37 (d, J=5,1 Hz) (H-6), característicos de substâncias contendo o núcleo esteroidal.

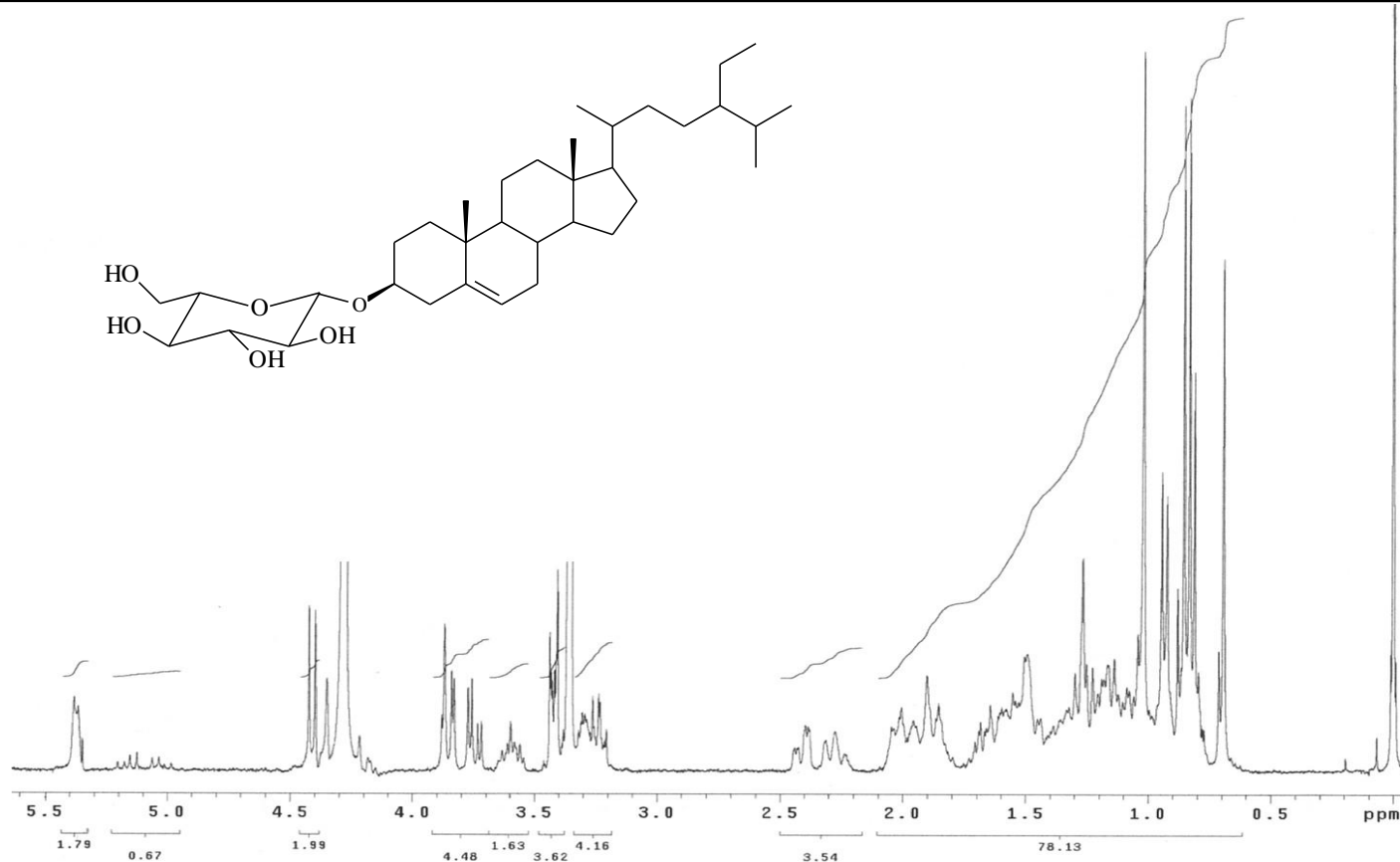


Figura 4: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300, 06 MHz) de AD-1.

Os espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 5**) e DEPT (**Figura 6**) também revelaram sinais característicos de glicosídeo esteroidal, mostrando dois carbonos insaturados em δ_{C} 140,1 e 122,0, e seis carbonos metílicos em 22,9; 19,5; 19,0; 18,7; 11,6 e 11,7 e sinais de carbonos metilênicos na região de δ_{C} 40,0 à 20,0. Além dos sinais referentes ao núcleo esteroidal foi observado sinais em δ_{C} 100,9 (CH); 75,6 (CH); 77,1 (CH); 69,8 (CH); 77,0 (CH) e 61,5 (CH_2) evidenciando uma unidade glicosídica, a qual foi identificada como glucose. O sinal em 4,41 (d, $J= 7,5$ HZ) indicou que o hidrogênio anomérico encontra-se em posição axial, levando a uma configuração β para o carbono anomérico da glucose.

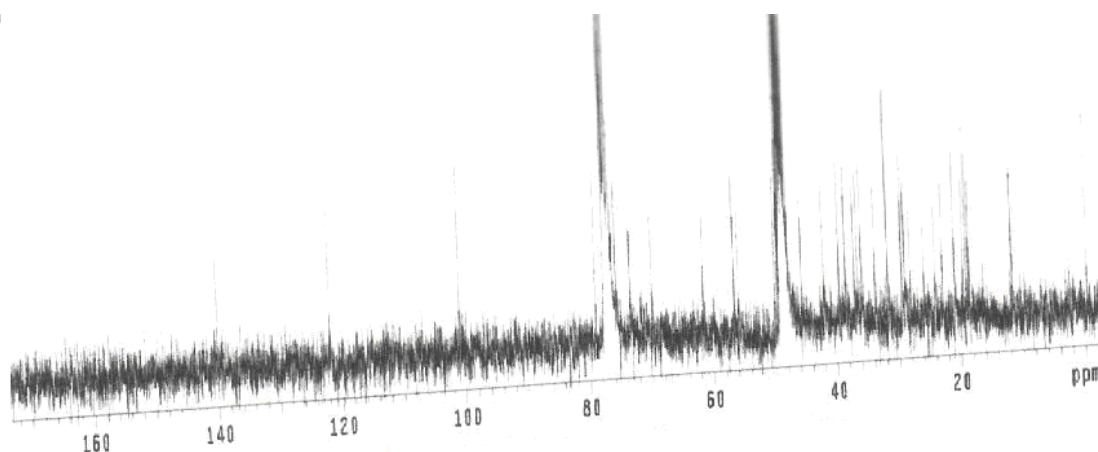


Figura 5: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz) de **AD-1**.

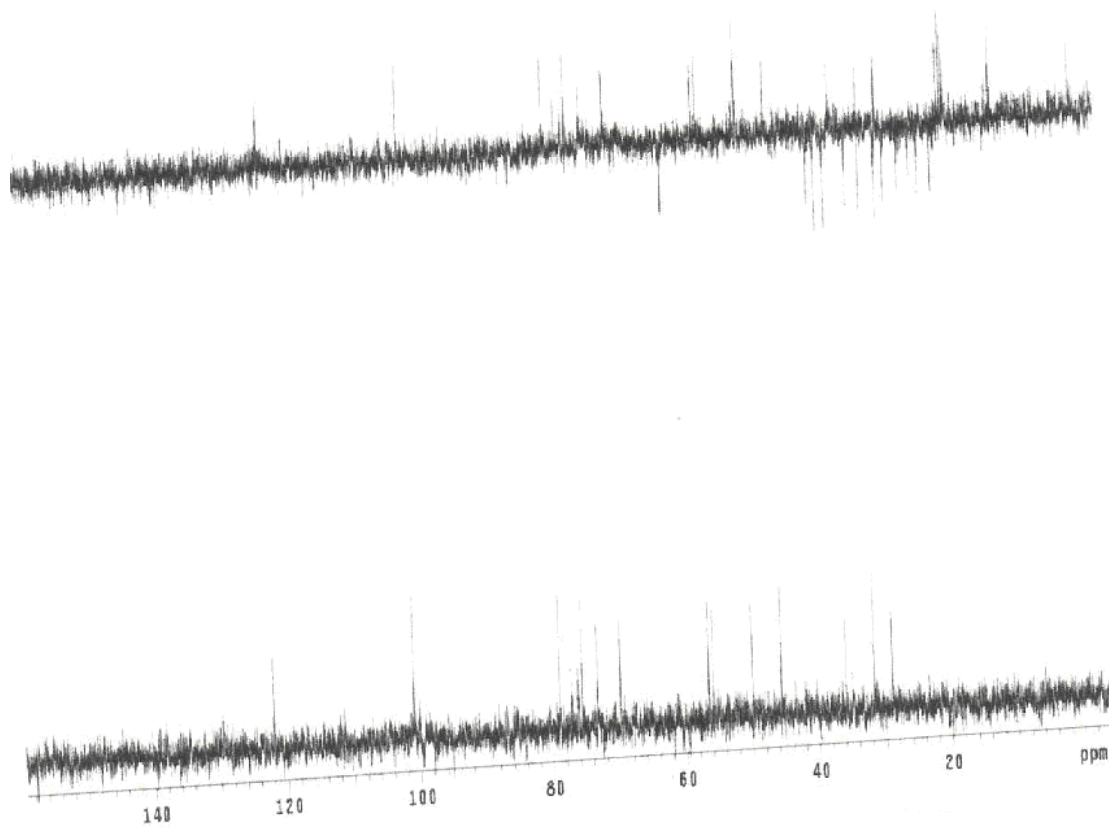


Figura 6: Espectro de DEPT (CDCl_3) de **AD-1**.

Os deslocamentos químicos dos carbonos da substância **AD-1** foram comparados aos da literatura para o 3-*O*- β -glucopiranosídeo sitosterol, conforme mostrado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Dados de RMN de ^{13}C (δ , 75,45 MHz, CD_3OD) para a substância **AD-1** e para o sitosterol 3-*O*- β -glucopiranosídeo (δ , 75,5 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

Nº de Carbonos	AD-1	Sitosterol 3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo
1	37,0	37,2
2	29,3	29,9
3	78,9	78,2
4	38,4	39,0
5	140,1	140,6
6	122,0	122,6
7	31,6	31,8
8	31,6	31,9
9	50,0	50,0
10	36,5	36,6
11	20,9	21,0
12	39,5	39,6
13	42,1	42,2
14	56,5	56,5
15	24,0	24,2
16	28,0	28,2
17	55,8	55,9
18	11,6	11,7
19	19,0	19,1
20	35,9	38,1
21	18,7	18,9

22	33,7	33,9
23	25,8	26,1
24	45,6	45,7
25	28,9	29,2
26	18,5	18,7
27	19,5	19,7
28	22,9	23,1
29	11,6	11,9
1'	100,9	102,2
2'	75,6	75,0
3'	77,1	77,0
4'	69,8	71,3
5'	77,9	78,1
6'	61,5	62,5

4.1.2 Substância AD-2

O composto isolado **AD-2** foi identificado pela análise dos seus dados de RMN. No espectro de RMN de ^1H (**Figura 7**) observa-se sinais correspondentes a um flavonóide cuja unidade aglicônica foi caracterizada como 3, 4', 5', 5, 7-pentaidroxiflavona (quercetina), pelos sinais de dubletos em δ_{H} 6,21 (1H, $J = 2.1\text{Hz}$, H-6) e 6,39 (1H, $J = 2.1\text{Hz}$, H-8), de dubleto de dubleto em δ_{H} 7,56 (1H, $J = 8,7; 2,1\text{ Hz}$, H-6') e dos dubletos em δ_{H} 6,87 (1H, $J = 8,7\text{ Hz}$, H-5 ') e 7,76 (1H, $J = 2,1\text{ Hz}$, H-2 ').

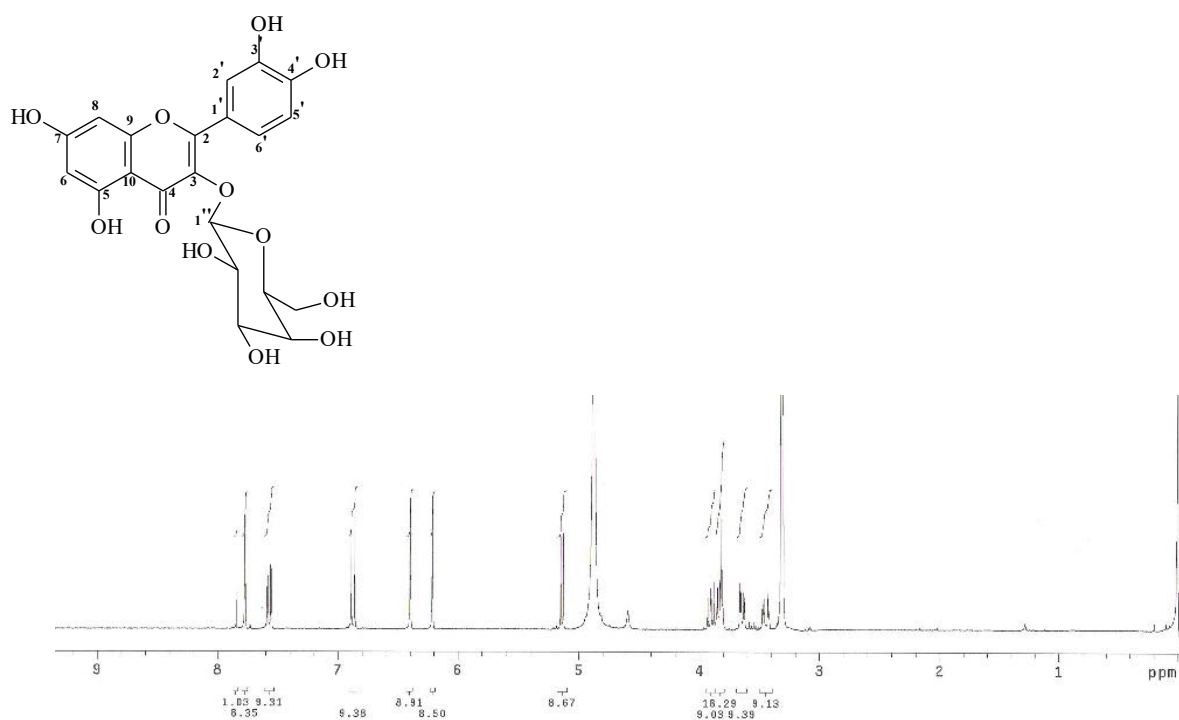


Figura 7: Espectro de RMN de ^1H , (DMSO, 300,06 MHz) para AD-2.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 8**) foi concordante para o esqueleto da quercetina, pela presença de uma carbolina em 179,3 e sinais de carbonos aromáticos oxigenados ou ligados a hidrogênios, mostrando um total de quinze carbonos.

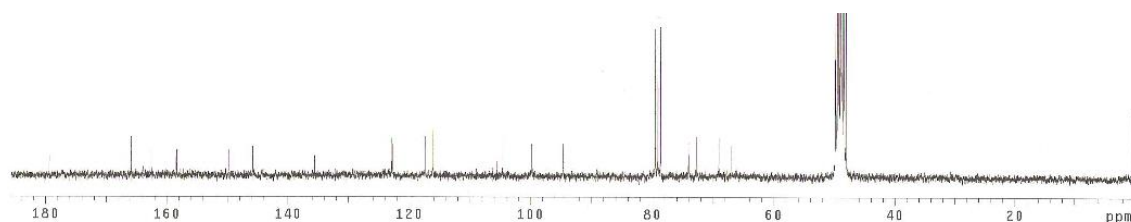


Figura 8: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO, 755 MHz) para AD-2.

A unidade glicosídica foi evidenciada pela presença de um carbono anomérico com $\delta_{\text{H/C}}$ 5,14 / 104,5 no espectro de RMN de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, sendo evidenciado como a

galactose pelos sinais de carbonos oximetilênicos em δ_C 66,9 e demais sinais de carbonos oximetínicos. Pelo valor da constante de acoplamento ($J = 7.5\text{Hz}$) para o hidrogênio anomérico foi possível estabelecer a configuração β .

A concordância dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C com os dados da literatura para a quercetina 3- O - β -galactosídeo (BENINI et al., 1992) (Tabela 2), confirmaram a estrutura proposta.

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto **AD-2** e quercetina 3- O - β -galactosídeo.

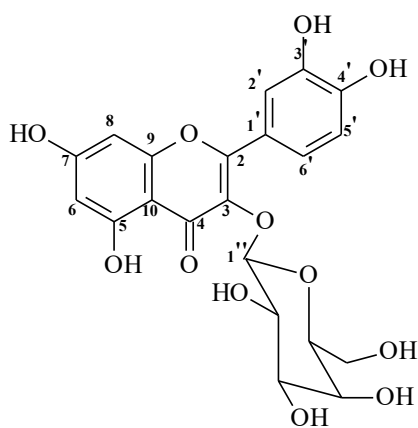
C	AD-2		Quercetina 3- O - β -galactosídeo		
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2	158,5		156,5		156,2
3	135,5		133,7		133,4
4	179,3		177,8		177,4
5	163,0		161,5		161,1
6	99,8	6,21 (d, J=2,1Hz)	98,9	6,18 (d, J=1,9 Hz)	98,6
7	165,8		164,4		164,2
8	94,8	6,39 (d, J=2,1 Hz)	93,7	6,38 (d, J=1,9 Hz)	93,4
9	158,2		156,5		156,2
10	105,5		104,2		103,8
1'	122,8		121,1		121,0
2'	117,4	7,76 (d, J=2,1Hz)	116,2	7,52 (d, J=2,2 Hz)	115,1
3'	145,8		145,1		144,7
4'	149,8		148,7		148,4
5'	116,0	6,87 (d, J=8,7Hz)	115,3		115,9
6'	122,7	7,56 (d,J=8,7;2,1Hz)	122,2		121,9
Galactose					101,8
1''	104,5	5,14 (d, J=7,5 Hz)	102,0	5,35 (d, J=7,6 Hz)	101,8
2''	69,9	3,80 – 3,40	71,4		71,2
3''	72,7	3,80 – 3,40	73,4		73,2
4''	69,8	3,80 – 3,40	68,2		67,9
5''	74,0	3,80 – 3,40	76,1		75,7
6''	66,9	3,80 – 3,40	60,4		60,1

4.1.3 Mistura de AD-3 e AD-4

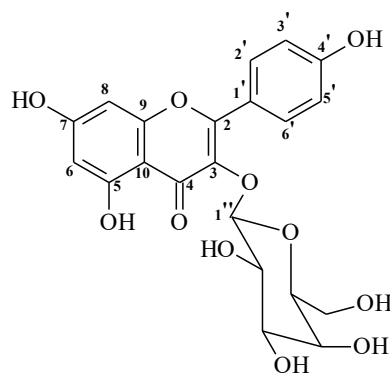
A mistura de substâncias codificadas **AD-3** e **AD-4** isolada da fração acetato de etila também evidencia sinais de flavonóides.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 9**) observam-se sinais correspondentes a quercetina em 6,20 (J=2,1Hz), 6,39 (J=2,1Hz), 7,76 (J=8,7 e 2,4 Hz), e em 6,80 (J=8,7 Hz) e 7,51 (J=2,4 Hz), semelhantes aos dados de **AD-2**.

Os demais sinais na região de hidrogênios aromáticos indicaram a presença de um segundo flavonóide cuja unidade aglicônica foi caracterizada como canferol, pelos sinais adicionais em 6,19 (d, J=2,1Hz) e 6,42 (d, J= 2,1Hz) e em 8,06 (d, J=8,7 Hz) e 6,85 (d, J=8,7 Hz).



AD-3



AD-4

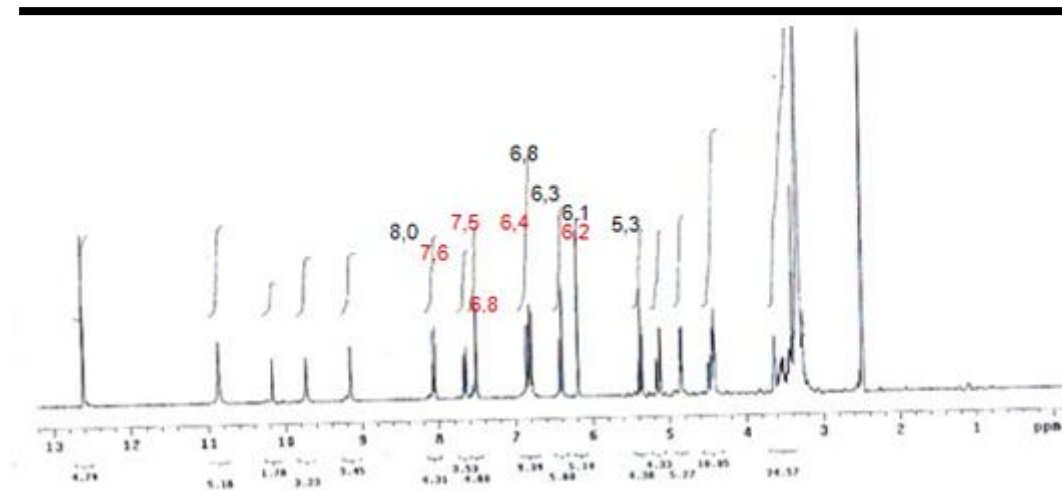


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, DMSO- d_6) da mistura de AD-3 e AD-4.

Tais acoplamentos foram confirmados pelas correlações observadas no espectro de COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) (**Figura 10**), as quais são mostradas na **Tabela 3**.

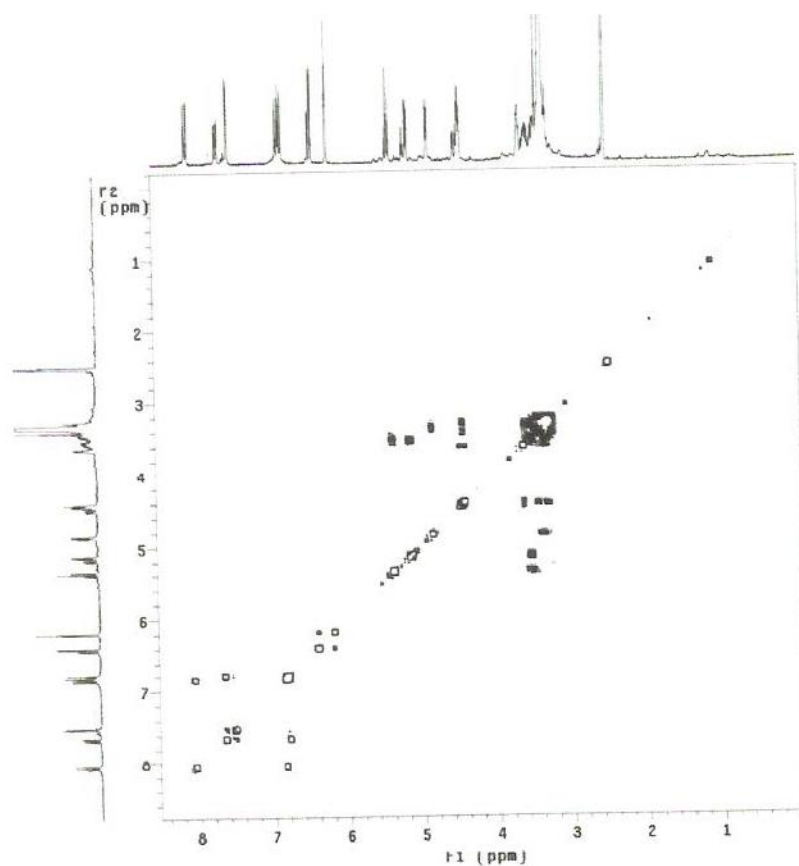
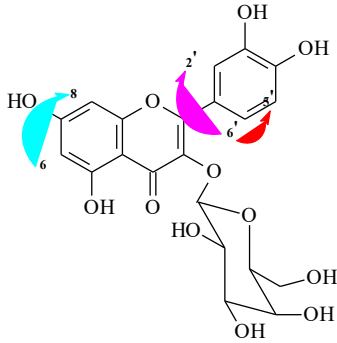
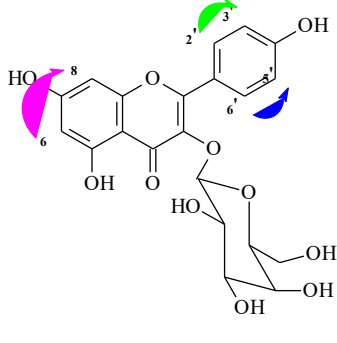


Figura 10: Espectro de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (DMSO- d_6 , 300 MHz) da mistura AD-3 e AD-4.

Tabela 3: Correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no espectro de COSY para as unidades aglicônicas de **AD-3** e **AD-4**.

AD-3		AD-4	
			
$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$
6,20 (d,J=2,1Hz, H-6)	6,39 (d,J=2,1Hz, H-8)	6,19 (d,J=2,1Hz, H-6)	6,39 (d,J=2,1Hz, H-8)
7,66 (dd,J=8,7 e 2,1Hz, H-6')	6,80 (d,J=8,7Hz, H-5'); 7,51 (d,J=2,1Hz, H-2')	8,06 (dd,J=8,7Hz, H-2')	6,85 (d,J=8,7Hz, H-3')

Os espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 11**) e DEPT (**Figura 12**) foram concordantes para o esqueleto da quercetina de **AD-3** e do canferol de **AD-4**, pela presença de duas carbonilas em δ_{C} 177,7 e 177,8 e sinais de carbonos aromáticos oxigenados ou ligados a hidrogênios, mostrando um total de trinta carbonos, correspondentes então a dois flavonóides.

As unidades glicosídicas de **AD-3** e **AD-4** foram evidenciadas pela presença de dois hidrogênios anoméricos em δ_{H} 5,39 (d, J=7,8 Hz) e 5,37 (d, J=7,8 Hz) no espectro de RMN de ^1H e pelos sinais de dois carbonos anoméricos em δ_{C} 101,9 e 102,0. Estas unidades foram caracterizadas como galactose pelos sinais de dois carbonos oximetilênicos em δ_{C} 60,4 e demais sinais de carbonos oximetínicos. Pelos valores das constantes de acoplamento (J=7,8 Hz) para os hidrogênios anoméricos foi possível estabelecer a configuração β para ambas as unidades glicosídicas.

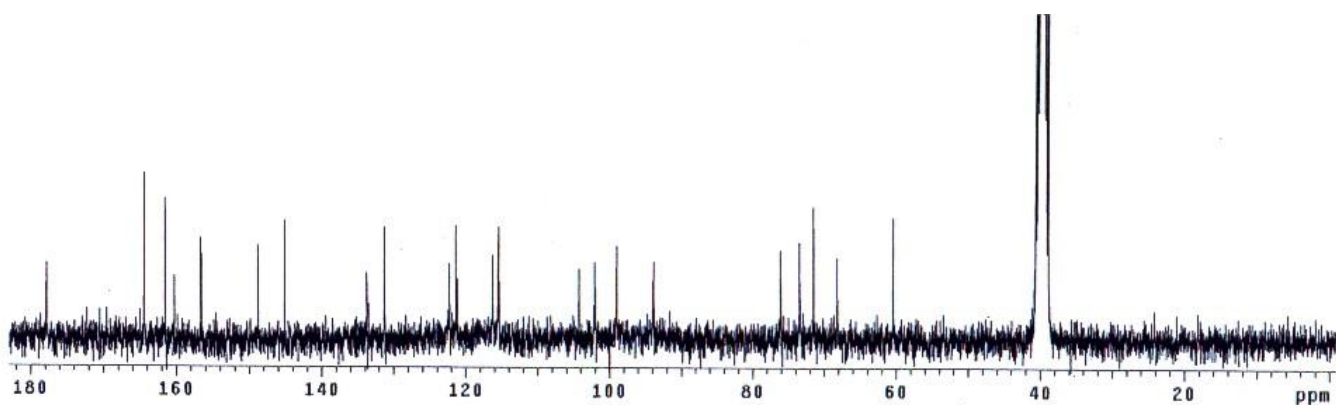


Figura 11: Espectro de RMN de ^{13}C (75,5 MHz, DMSO- d_6) de **AD-3** e **AD-4**.

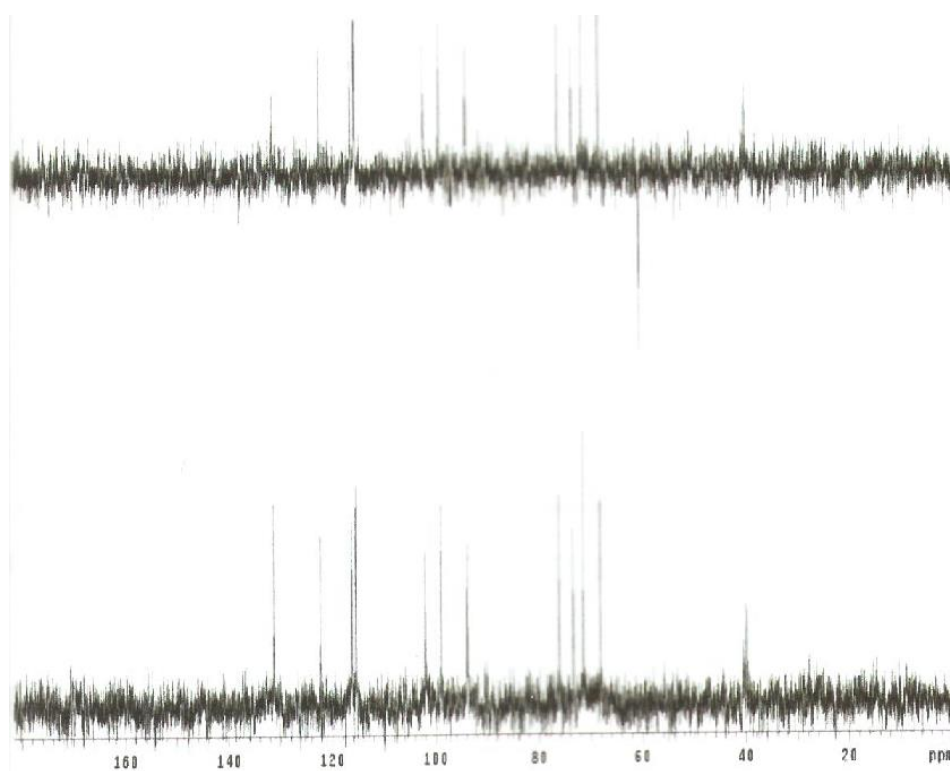


Figura 12: Espectro de DEPT (DMSO- d_6) de **AD-3** e **AD-4**.

As atribuições dos hidrogênios e carbonos de **AD-3** e **AD-4** foram baseadas nas correlações no espectro de HMQC (**Figura 13**), as quais são mostradas na **Tabela 4**.

Tabela 4: Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no espectro de HMQC para a mistura das substâncias **AD-3** e **AD-4**.

C	AD-3		AD-4	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
6	6,19	98,9 (CH)	6,20	98,9 (CH)
8	6,42	93,9 (CH)	6,39	93,7 (CH)
2'	8,06	131,3 (CH)	7,51	115,3 (CH)
3'	6,85	115,3 (CH)		
5'	6,85	115,3 (CH)	6,80	116,2 (CH)
6'	8,06	131,3 (CH)	7,66	122,2 (CH)
1''	5,39	101,9 (CH)	5,37	102,0 (CH)

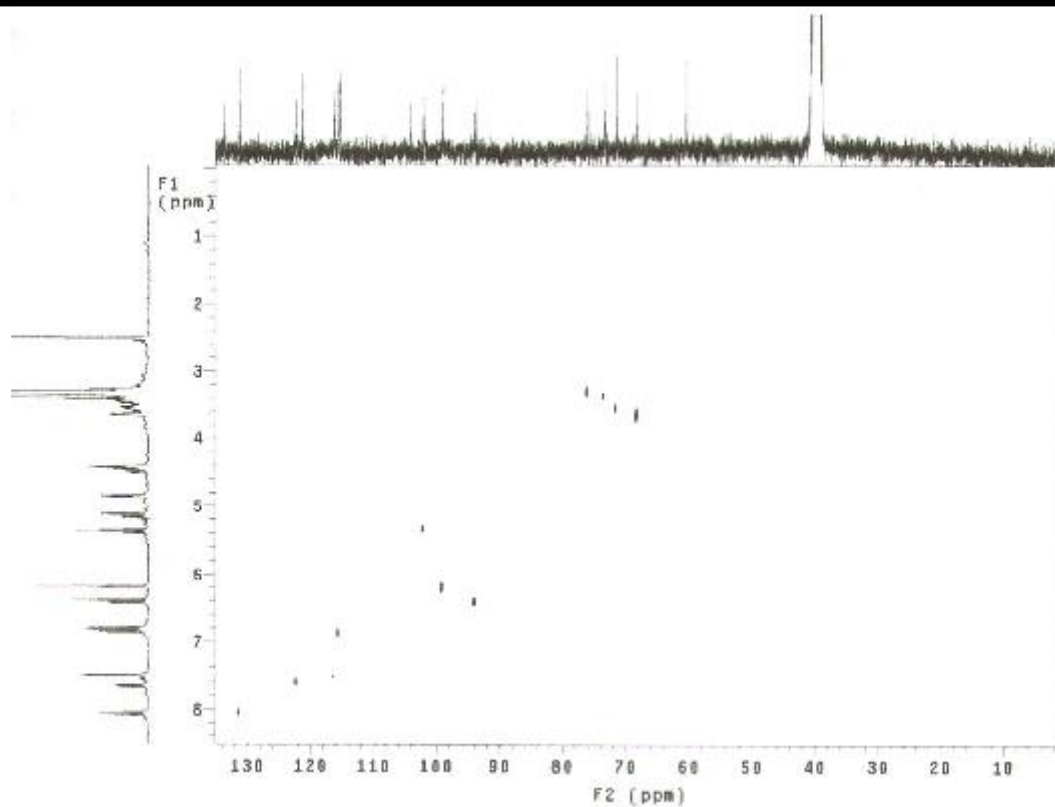


Figura 13: Espectro de HMQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$, DMSO- d_6) da mistura de **AD-3** e **AD-4**.

A concordância dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da mistura de **AD-3** e **AD-4** com os da literatura para o canferol 3-*O*- β -galactosídeo e da quercetina 3-*O*- β -galactosídeo, confirmaram as estruturas propostas (**Tabela 5**).

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (δ , 300,06/ 75,5 MHz, mult., J em Hz, DMSO- d_6) para as substâncias **AD-4** e para o canferol 3-*O*- β -galactosídeo (LU & FOO, 1999) e da **AD-3** e para a quercetina 3-*O*- β -galactosídeo (BENINI et al., 1992) (300,06/ 75,5 MHz, DMSO- d_6).

C	Substância 3		Quercetina 3- <i>O</i> - β -galactosídeo		Substância 4		Canferol 3- <i>O</i> - β -galactosídeo	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		156,5		156,2		156,5		156,2
3		133,7		133,4		133,4		133,7
4		177,8		177,4		177,7		177,4
5		161,5		161,1		161,5		161,2
6	6,20 (d,J=2,1Hz)	98,9	6,18 (d,J=1,9Hz)	98,6	6,19 (d,J=2,1Hz)	98,9	6,19 (d,J=1,9Hz)	98,8
7		164,4		164,2		164,4		164,5
8	6,42 (d,J=2,1Hz)	93,7	6,38 (d,J=1,9Hz)	93,4	6,39 (d,J=2,1Hz)	94,8	6,42 (d,J=1,9Hz)	93,7
9		156,5		156,2		156,5		156,4
10		104,2		103,8		104,2		103,8
1'		121,1		121,0		121,2		120,9
2'	7,51 (d, J=2,4Hz)	116,2	7,52 (d,J=2,2Hz)	115,1	8,06 (d,J=8,7Hz)	131,3	8,06 (d,J=8,7Hz)	130,8
3'		145,1		144,7	6,85 (d,J=8,7Hz)	115,3	6,89 (d, J=8,5 Hz)	115,1
4'		148,7		148,4		160,2		159,9
5'		115,3		115,9	6,85 (d,J=8,7Hz)	115,3	6,89 (d,J=8,5Hz)	115,1
6'		122,2		121,9	8,06 (d,J=8,7Hz)	131,3	8,06 (d,J=8,7Hz)	130,8
1''	5,36 (d,J=7,5Hz)	102,0	5,35 (d,J=7,6Hz)	101,8	5,40 (d,J=7,8Hz)	101,9	5,39 (d,J=7,6Hz)	101,5
2''		71,4		71,2		71,4		71,7
3''		73,4		73,2		73,3		73,1
4''		68,2		67,9		68,2		67,8
5''		76		75,7		76,1		75,7
6''		60		60,1		60,4		60,2

4.1.4 Substância AD-5

A substância **AD-5** isolada da fração hidrometanólica, conforme procedimento descrito anteriormente, ainda encontra-se em fase de elucidação estrutural, devido a pouca quantidade de amostra, verificando possível presença de outro flavonóide.

4.2 Resultados biológicos

4.2.1 Avaliação antioxidante

O extrato metanólico, as frações e o composto **AD-2** isolado de *A. dioica* exibiram atividade antioxidante. Inicialmente, avaliou-se o extrato metanólico (**EAD**), que apresentou significativa atividade com IC₅₀ de 17,84 mg/mL. De acordo com a **Tabela 6**, pode-se observar potente atividade para a fração acetato de etila (**FAE**) (IC₅₀ de 8,53 mg/mL), fração hidrometanólica (**FHM**) (IC₅₀ de 10,57 mg/mL) e o composto isolado **AD-2** (IC₅₀ de 1,02 mg/mL) quando comparados com o padrão **BHT** (IC₅₀ de 16,8 mg/mL).

Tabela 6. Atividade antioxidante DPPH (IC₅₀) para extrato metanólico, frações e composto isolado de *A. dioica*.

Amostra	IC ₅₀ µg/mL
Extrato Metanólico	17.84
Fração Hexânica	101.66
Fração Clorofórmio	98.35
Fração Acetato de Etila	8.53
Fração Hidrometanólica	10.57
Quercetina 3-O-β-galactosídeo	1.02
BHT^a	16.8

^aBHT (butilhidroxitolueno) utilizado como controle positivo.

Os flavonóides são componentes de extrema importância para o tratamento de várias doenças devido sua potente natureza antioxidante. Alguns autores relatam que os flavonóides como a rutina (quercetina-3-rutinosídeo) e quercetina mostraram atividade antioxidante (DRYDEN et al., 2006; MIDDLETON, 1998). A atividade antioxidante de flavonóides tem sido relacionada com o número e a posição dos grupos hidroxila livre, que poderia atuar por sua capacidade de doação de hidrogênio (COTELLE et al., 1992; MORA et al., 1990). Dependem especialmente um OH livre na posição C-3, um OH

livre na posição C-4, uma ligação dupla entre C-2 e C-3 e um agrupamento *O*-dihidróxi no anel B. O composto isolado possui estas características com exceção da ausência de um OH livre na posição C-3.

4.2.2 Toxicidade

Os resultados para toxicidade para o extrato metanólico e as frações hexânica, acetato de etila, clorofórmio e hidrometanólica de *A. dioica* apresentaram elevada toxicidade frente à *A. salina* com concentração letal (CL₅₀) inferior a 100 µg/mL (**Tabela 7**).

Tabela 7. Teste de toxicidade do extrato metanólico e frações de *A. dioica* frente à *Artemia salina*.

<i>Annona dioica</i>	Toxicidade de <i>Artemia salina</i>
	(µg/mL)
	CL ₅₀
Extrato metanólico (EAD)	2,82
Fração Hexânica (FH)	2,90
Fração Acetato de Etila (FAE)	2,56
Fração Clorofórmio (FCHCl₃)	2,00
Fração Hidrometanólica (FHM)	2,71

Estudos experimentais mostram que para uma determinada droga, sua CL₅₀ referente a toxicidade frente à *Artemia salina* é dez vezes maior do que sua dose efetiva (DE₅₀) obtida para a citotoxicidade frente às linhagens celulares de tumores sólidos.

Os resultados são semelhantes aos de Pimenta et al., (2003) que, ao avaliarem frações de *Annona* também observaram toxicidade frente ao microcrustáceo utilizando o Lapachol como controle positivo (**Tabela 8**).

Tabela 8. Atividade larvicida frente à *Artemia salina* com alguns extratos e frações de plantas da família Annonaceae.

	Extratos e frações testadas	CL ₅₀ em µg/mL (95% intervalo de confiança)
1	Sementes de <i>A. crassiflora</i>	23.85 (2.93 < CL < 44.78)
2	Sementes de <i>A. crassiflora</i>	754.8 (675.5 < CL < 834.6)
3	Folhas de <i>A. crassiflora</i>	622.1 (540 < CL < 703.6)
4	Folhas de <i>A. crassiflora</i>	ND ¹
5	Casca de <i>A. crassiflora</i>	1.29 (0.70 < CL < 1.87)
6	Casca de <i>A. crassiflora</i>	22.09 (9.75 < CL < 34.44)
7	Casca de <i>A. crassiflora</i>	28.50 (26.27 < CL < 30.70)
8	Folhas de <i>A. crassiflora</i>	21.72 (16.78 < CL < 26.67)
9	Folhas de <i>A. crassiflora</i>	2.73 (2.24 < CL < 3.22)
10	Sementes de <i>A. nutans</i>	0.20 (0.19 < CL < 0.60)
11	Sementes de <i>A. nutans</i>	1.42 (1.14 < CL < 1.69)
12	Sementes de <i>A. nutans</i>	0.47 (0.35 < CL < 0.58)
13	Sementes de <i>A. nutans</i>	1333 (954.4 < CL < 1714)
14	Casca de <i>A. hypoglauca</i>	ND ¹
15	Casca de <i>A. hypoglauca</i>	76.78 (13.88 < CL < 139.7)
16	Casca de <i>A. hypoglauca</i>	27.76 (17.16 < CL < 45.28)
17	Folhas de <i>A. cherimola</i>	NT
18	Folhas de <i>A. cherimola</i>	0.88 (-27.09 < CL < 28.85)
19	Lapachol	68.09 (57.25 < CL < 79.17)

ND¹ = CL > 500 µg/mL. NT = Não testado.

Fonte: Pimenta et al., 2003.

Os resultados para extrato metanólico e frações de *A. dioica*, são indicativos para a atividade antitumoral devido sua alta toxicidade frente a *A. salina*. O uso do microcrustáceo serve como uma ferramenta útil para um estudo preliminar biomonitorado dos extratos e frações e, é sugestivo como triagem da atividade farmacológica, sendo assim, é necessário um aprofundamento de estudos químico, farmacológico e toxicológico para que o uso popular desta planta seja seguro.

4.3.3 Antitumoral

A **Figura 14** apresenta os valores de **IC₅₀** (concentração que inibe 50% do crescimento celular), **IC₁₀₀** (concentração que inibe 100% do crescimento celular) e **LC₅₀** (concentração letal) das linhagens celulares frente ao extrato metanólico de *A. dioica*.

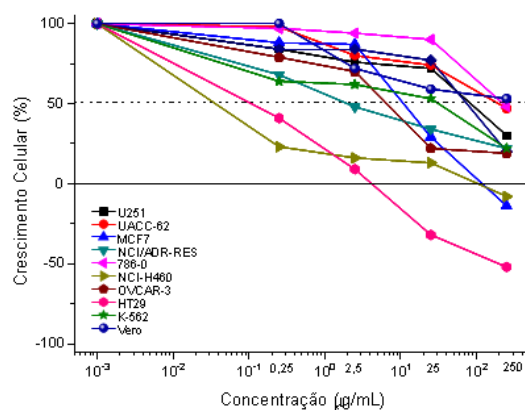


Figura 14. Avaliação antitumoral de **EAD** de *A. dioica* frente a dez linhagens celulares.

A avaliação da atividade antitumoral do extrato metanólico foi significativa para quatro linhagens de células com concentrações inferiores a 6,4 µg/mL, sendo altamente ativo frente às células de pulmão (**NCI-H460**) com **IC₅₀** de 0,03 µg/mL, cólon (**HT-29**) com **IC₅₀** de 0,10 µg/mL, mama resistente (**NCI/ADR-RES**) com **IC₅₀** 1,95 e ovário (**OVCAR-3**) com **IC₅₀** de 6,38 µg/mL, apresentando concentração dose-dependente. Por outro lado, as células de mama (**MCF7**) e leucemia (**K-562**) apresentaram moderada atividade com valores de **IC₅₀** de 11,10 µg/mL e 31,13 µg/mL, respectivamente. O extrato metanólico não inibiu as linhagens celulares de melanoma (**UACC-62**), vero (**VERO**), próstata (**U251**) e rim (**786-0**) com **IC₅₀** > 100 µg/mL (**Tabela 9**).

Tabela 9. Avaliação da atividade antitumoral (valores de IC₅₀, IC₁₀₀ e LC₅₀ em µg/mL) para extrato metanólico de *A. dioica* e doxorrubicina.

Linhagens	Extrato metanólico			Doxorrubicina		
	IC ₅₀	IC ₁₀₀	LC ₅₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀	LC ₅₀
Próstata (U251)	83,47	-	-	5,07	23,45	-
Melanoma (UACC-62)	> 100	-	-	0,06	0,86	-
Mama (MCF-7)	11,10	> 100	-	0,14	24,52	-
Mama Resistente (NCI/ADR-RES)	1,95	-	-	1,74	23,92	-
Rim (786-0)	> 100	-	-	0,22	1,51	-
Pulmão (NCI-H460)	0,03	> 100	-	0,05	-	-
Ovário (OVCAR-3)	6,38	-	-	0,30	1,72	-
Cólon (HT-29)	0,10	4,10	> 100	2,12	7,31	20,86
Leucemia (K-562)	31,13	-	-	0,90	-	-
Vero (VERO)	-	-	-	1,40	11,36	-

O câncer de pulmão se tornou uma doença neoplásica comum e a mais mortal em todo o mundo. É o tipo de câncer mais frequente e sua incidência tem aumentado em torno de 0,5% ao ano, principalmente entre as mulheres (ZAMBONI, 2000), seguido do câncer de mama, cólon e ovário.

Os resultados obtidos pelo extrato metanólico de *A. dioica* evidenciaram seletividade para quatro linhagens de células tumorais, uma vez que um extrato bruto é considerado promissor ao apresentar IC₅₀ inferior a 30 µg/mL, tornando-se uma alternativa viável para o tratamento de alguns tipos de câncer, considerando também a necessidade de estudos mais aprofundados para demonstrar os compostos responsáveis pela atividade e seu mecanismo de ação.

5 CONCLUSÕES

O estudo permitiu o isolamento de flavonóides glicosilados e um sitosterol como:

- 3-*O*- β -glucopiranosil sitosterol (**AD-1**);
- Quercetina 3-*O*- β -galactosídeo (**AD-2**);
- Mistura de quercetina 3-*O*- β -galactosídeo (**AD-3**) e canferol 3-*O*- β -galactosídeo (**AD-4**).

O extrato metanólico e as frações acetato de etila, hidrometanólica e o composto **AD-2** foram altamente ativos na inibição da formação de radicais livres, frente o método de DPPH.

O extrato metanólico apresentou potente atividade antitumoral para linhagens de células tumorais de pulmão, cólon, mama resistente e ovário, com concentrações inferiores a 6,4 $\mu\text{g/mL}$.

O extrato metanólico e as frações hexano, acetato de etila, clorofórmio e hidrometanólica apresentaram elevada toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

Os compostos isolados, a atividade antioxidante e antitumoral são relatados pela primeira vez nesta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HAMMADSAHIB, K. I.; HOLLINGWORTH, R. M.; McGOVREN, J. P.; HUI, Y. H.; McLAUGHLIN, J. L. Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenins. **Life Sciences**, v. 53, n. 14, p. 1113-1120, 1993.
- ALALI, F. Q.; LIU, X-X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Embrapa – CPAC, Planaltina, Distrito Federal, 1998.
- ARRIAGA, F. J.; RUMBERO, E.; VAZQUEZ, P. Two triterpene glycosides from *Isertia haenkeana*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 209-213, 1990.
- BARAHONA, M. V.; SANZ-BARRERA, F.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Acute toxicity of organic solvents on *Artemia salina*. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 5, p. 766-77, 1994.
- BARAHONA, M. V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* to several phenolic compounds. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 2, p. 271-27, 1996.
- BARROSO, G. M.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. *Sistemática das Angiospermas do Brasil*. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. v. 1, 309 p.
- BENINI, B.; CHULIA, A. J.; KAOUADJI, M.; THOMASSIN, F. Flavonoid glycosides from *Erica cinerea*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 2483-2486, 1992.
- BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, E.E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 2, p. 269-303, 2005.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; & BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, J. M. 2004. Annonaceae. In: SMITH N.; MORI S. A.; HENDERSON A.; STEVENSON D. W.; HEALD S. V. (Eds.). **Flowering Plants of the Neotropics**. Princeton: Princeton University Press. p. 18-20.
- CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; CHIU, H. F.; WU, M. J.; WU, Y. Aromin-A, an Annonaceous acetogenin from *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 3, p. 429-433, 1999.
- CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; PAN, W. B.; WU, Y. Four alkaloids from *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 7, p. 753-757, 2001.

COELHO, M. B.; DE SOUZA, I. A.; FREIRE, M. G. M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M. L. R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, v. 48, p. 529-35, 2006.

COELHO, M. B.; FREIRE, M. G. M.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, M. L. R. Purification and characterization of a lectin from *Annona coriacea* seeds. **Protein and Peptide Letters**, v. 10, p. 165-73, 2003.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P. A Pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 2, p. 292-294, 2006.

COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; HÉNICHART, J. P.; CATTEAU, J. P.; GAYDOU, E.; WALLET, J. C. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, n. 3, p. 211-219, 1992.

DE MESQUITA, M. L.; DE PAULA, J. E.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439-445, 2009.

DRYDEN, G. W.; SONG, M.; McCLAIN, C. Polyphenols and gastrointestinal diseases. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 22, p. 165-170, 2006.

FAGUNDES, F. A.; OLIVEIRA, L. B.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 24-9, 2005.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. Pp.229-245. In: C.M.O. Simões; E.P. Schenkel; G. Gosmann; J.C.P.Mello; L.A. Mentz & P.R. Petrovick (eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a ed. Porto Alegre, Ed. UFRGS, 2003.

FORMAGIO, A. S. N.; MASETTO, T. E.; BALDIVIA, D. S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; PEREIRA, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010.

GONÇALVES, M. A.; LARA, T. A.; PIMENTA L. P. S. Alcalóides oxaporfínicos da madeira de *Annona crassiflora* Mart. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2009, Águas de Lindóia. **Anais Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2009, v. 29., CD-ROM.

GONZALEZ, T. D. **Catálogo de Plantas Mediciniais usadas no Paraguay**. Ed. Comuneros, Asunción, 1992.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCAR, 2003. 152p. – Série de textos da Escola de Verão em Química, v. 4.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUDSON, B. J. F. Food antioxidants. New York: **Elsevier Science Publishers LTD**, 1990.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, K. H. S.; COLE, J. R. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria acuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, v. 47, p. 3151-3153, 1982.

KOTAKE, Y.; OHTA, S. MPP+ analogs acting on mitochondria and inducing neurodegeneration. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2507-2516, 2003.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Application of various chemical methods to the determination of the antioxidative activity of fruit pulp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAKO, J.; TRENERRY, V. C.; WAHIQVIST, M.; WATTANAPENPAIBOON, N. Phytochemical flavonols, carotenoids and antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1727-1741, 2006.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The Phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783, 1982.

LIU, X. X.; ALALI, F. Q.; PILARINOU, E.; McLAUGHLIN, J. L. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*, **Phytochemistry**, v. 50, p. 815-821, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.

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

LU, Y., FOO, L. Y. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**, v. 65, p. 1-8, 1999.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. & RAINER, H. Annonaceae of eastern and south-eastern Brazil (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo & Rio de Janeiro). **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 61-94, 2002/01.

MATO GROSSO DO SUL. (1990). Secretaria do Planejamento e Coordenação Geral. *Atlas Multireferencial*. Campo Grande, 28p.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica experimental**. Ceará, Fortaleza: Coleção Ciência – EUFC, p. 128, 1988.

MIDDLETON, E. Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 439, p.175-182, 1998.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GROODICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human cell lines. **Journal of National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MORA, A.; PAYA, M.; RIOS, J. L.; ALCARAZ, M. J. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of nonenzymic lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, p. 793-797, 1990.

NASCIMENTO, M. C. B. S. **Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades**. 2008. 197 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

NETO, A. L.; CASTRO, M. N. M.; TRINDADE, R. S.; RODRIGUES-DAS-DÔRES, R. G.; STEFANI, R.; NAGEM, T. J. Avaliação da bioatividade dos extratos em acetato de etila de folhas, capítulos florais e raízes de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray (Asteraceae, Helianthaceae). **Horticultura Brasileira**, v. 27, 2009.

PAULO, M. Q.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; MAIOR, R.; BARBOSA, R. C. B. B. C.; KAPLAH, M. A. Antimicrobial activity of benzyloisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D. C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 39-41, 1992.

PERFEITO, J. P.; SANTOS, M. L.; LÓPEZ, K. S. E.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 183-186, 2005.

PIMENTA, L. P. S. **Estudo químico bio-monitorado das sementes de *Annona crassiflora* objetivando o isolamento de acetogeninas tetra-hidrofurânicas**. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx – UFM. Tese de Doutorado, 1995.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; E SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v. 10, p. 209-212, 2003.

PITA, J. C. L. R. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do *Trachilobano-360* de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE)**. 2010. 103f.

Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos) – UFPB/ CCS/ LTF. João Pessoa.

POTT e POTT. **Plantas do Pantanal**, Brasília, EMBRAPA, p. 320, 1994.

QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A.; PAULO, M. Q.; FOURNET, A. Pseudoephedrine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 438-440, 1996.

SAHPAZ, S.; BORIES, C.; CORTES, D.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, p. 538-540, 1994.

SANTOS, D. Y. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SANTOS, L. A. R.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; PIMENTA, L. P. S. **Acetogeninas isoladas das sementes de *A. cornifolia* A. – St. Hill**. Sociedade Brasileira de Química. 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2007.

SANTOS, P. R. D.; MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dioica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 369-400, 2003.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre-Florianópolis. Editora/UFSC/Editora da UFRGS, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. rev. ampl. – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003.

SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; KAPLAN, M. A. C. Propriedades Analgésica e Antiinflamatória do Extrato Metanólico de Folhas de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, 2007.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. Academic Press: London, p. 71–133, 1990.

SULEIMAN, M. M.; DZENDA, T.; SANI, C. A. Antidiarrhoeal activity of the methanol stem-bark extract of *Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 125-130, 2008.

VEGA, M. R. G.; SOUZA, A. E.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* Leaves and their Effects in Ehrlich Carcinoma Cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1554-1559, 2007.

WANG, L. Q.; MIN, B. S.; LI, Y.; NAKAMURA, N.; QIN, G. W.; LI, C. J.; HATTORI, M. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 561-565, 2002.

WÉLÉ, A.; NDOYE, I.; ZHANG, Y.; BROUARD, J. P.; BODO, B. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2376, 2005.

YEN, G.; WU, J. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, v. 65, p. 375-379, 1999.

YU, J. G.; HU, X. E.; HO, D. K.; BEAN, M. F.; STEPHENS, R. E.; CASSADY, J. M.; BRINEN, L. S. & CLARDY, J. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 59, p. 1598-9, 1994.

YUAN, S. S.; CHANG, H. L.; YEH, Y. T.; KAO, Y. H.; UN, K. H.; WU, Y. C.; SU, J. H. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G 1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Sciences**, v. 72, p. 2853-2861, 2003.

ZAMBONI, M. Câncer de pulmão. **PneumoAtual**. Ago. 2000.