



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ANDREINA GOMES DE ANDRADE LARANJEIRA

**PERFIL QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Annona glabra* L.
(ANNONACEAE)**

Boa Vista, RR

2016

ANDREINA GOMES DE ANDRADE LARANJEIRA

**PERFIL QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Annona glabra* L.
(ANNONACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Produtos naturais.

Orientador: Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa
Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Alves de Melo Filho.

Boa Vista, RR

2016

ANDREINA GOMES DE ANDRADE LARANJEIRA

**PERFIL QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E POTENCIAL
BIOLOGICO DO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Annona glabra* L.
(ANNONACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química-PPGQ da Universidade Federal de Roraima. Defendida em 12 de dezembro de 2016 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa
Orientador/ Departamento de Química/UFRR

Prof. Dr. Francisco das Chagas do Nascimento
Departamento de Química/UFRR

Prof. Dr. André Camargo de Oliveira
Coordenação de Química/UFRR

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para concluir mais uma etapa.

Ao meu esposo Dion Ribeiro, por estar ao meu lado me incentivando e por acreditar no meu potencial.

A minha família que pelo apoio, carinho e dedicação.

Ao meu orientador, professor Dr.Habdel Nasser Rocha da Costa pelo apoio e ensinamento durante estes anos e pela confiança no meu trabalho. Ao professor Dr. Antônio Alves de Melo Filho, pela co-orientação e sugestões para o aprimoramento do trabalho.

Aos técnicos do laboratório Pedro Rômulo e Cristina Melo pela colaboração na extração do óleo e sempre estiveram dispostos a ajudar e colaborar com a pesquisa.

A professora Dr^a Vany Ferraz do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais pela análise cromatográfica.

Ao laboratório de Biotecnologia e Bioensaios da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial professora Dr^a Jacqueline Aparecida Takahashi e Matheus Thomaz Nogueira Silva Lima, pelos bioensaios.

Aos professores, técnicos e funcionários do PPGQ pelo apoio e agradável convivência.

A CAPES pelo suporte financeiro dado aos programas de pós-graduação.

Aos meus amigos de mestrado Angela, Francisco, Gilmar, Graciliano, Regildo, Sandra, Ana Márcia, Wéllida, Luciana e Diana pela amizade, companheirismo e alegria contagiante.

Aos colegas do mestrado, doutorado e Iniciação científica do laboratório de química, pela amizade, pelo apoio e momento de descontrações durante todo período do curso.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Distribuição geográfica das espécies da família Annonaceae.....	16
Figura 02 -	Espécies de algumas frutas do gênero Annona.....	17
Figura 03 -	Planta da espécie <i>A. glabra</i> L.....	20
Figura 04 -	Flor de <i>A. glabra</i> L. iniciando sua abertura.....	21
Figura 05 -	Folhas de <i>A. glabra</i> L.....	21
Figura 06 -	Fruto verde de <i>A. glabra</i> L.....	22
Figura 07 -	Estrutura geral de um triacilglicerídeo.....	24
Figura 08 -	Estrutura química de alguns ácidos graxos.....	25
Figura 09 -	Diagrama esquemático de um cromatógrafo gasoso.....	28
Figura 10 -	Esquema do detector de Ionização de chamas.....	28
Figura 12 -	Inibidores da AchE.....	30
Figura 13 -	Esquema do ciclo da acetilcolina.....	33
Figura 14 -	Náuplio do crustáceo de <i>Artemia salina</i>	34
Figura 15 -	Cistos de <i>Artemia salina</i>	35
Figura 16 -	Estrutura química do radical DPPH.....	36
Figura 17 -	Reação entre um radical livre DPPH e um antioxidante.....	37
Figura 18 -	Exsicata de <i>Annona glabra</i> L.....	40
Figura 19 -	(a)Sementes secas(b) Multiprocessador doméstico (c)Sementes trituradas e peneiradas.	41
Figura 20 -	Extração do óleo da semente de <i>A. glabra</i> L. por solvente (hexano) utilizando aparelho soxhlet.	41
Figura 21 -	Aparelho evaporador rotativo.....	42
Figura 22 -	(a) Frascos com amostras de óleo (b) Amostras de óleo em Banho Maria (c) Frascos das amostras recobertos com papel alumínio.	43
Figura 23 -	Modelo e distribuição das amostras e controle nas placas utilizadas para o teste de sensibilidade antibacteriana.	46
Figura 24 -	Aquário contendo cistos de <i>Artemia salina</i> submetida em um período de 24 horas.	49
Figura 25 -	Óleo de <i>Annona glabra</i> L.....	53
Figura 25 -	Cromatograma dos ácidos graxos metilados obtidos mediante CG para óleo de <i>A. glabra</i> L.	55
Figura 27 -	Curva da quercetina.....	63

Figura 28 - Curva de calibração de DPPH para os valores de AA%..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Algumas espécies do gênero <i>Annona</i> e suas indicações medicinais.....	18
Tabela 02 - Características dos principais ácidos graxos presentes em gorduras.....	26
Tabela 03 - Rendimento obtido nas extrações realizadas.....	53
Tabela 04 - Rendimento das extrações dos óleos de sementes do gênero <i>Annona</i>	54
Tabela 05 - Composição percentual dos ácidos graxos presentes na amostra <i>A.glabra L.</i>	56
Tabela 06 - Resultados de inibição bacteriana do óleo de <i>A. glabra L.</i>	57
Tabela 07 - Contagem dos náuplios sobreviventes.....	60
Tabela 08 - Dados da atividade frente à <i>Artemia salina</i> para o óleo de <i>A.glabra L.</i>	61
Tabela 09 - Valores da concentração para diferentes valores de % AA.....	63
Tabela 10 - Valores encontrados das amostras de óleo de <i>A.glabra L.</i> e quercetina.....	64

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ω	Ômega
Ω-3	Ácido linolênico
Ω-6	Ácido linoleico
Ω-9	Ácido oleico
%	Porcentagem
µg	Microgramas
µl	Microlitro
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
AGS	Ácidos Graxos Saturados
AGI	Ácidos Graxos insaturados
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCI	Acetylthiocholine iodide
BF ₃	Trifluoreto de Boro
°C	Graus Celsius
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CG	Cromatografia Gasosa
CG-FID	Cromatografia gasosa - Detector por Ionização de Chama
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	5,5 – ditiobis-2-nitrobenzóico
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O	Água
IBRAF	Instituto Brasileiro de frutas
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
m	metro

mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPGQ	Programa de Pós-graduação em Química
pH	Potencial Hidrogeniônico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRR	Universidade Federal de Roraima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 FAMÍLIA ANNONACEAE	15
1.2. GÊNERO ANNONA	17
1.3 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE <i>ANNONA GLABRA L.</i>	19
1.4 SEMENTE DE ANNONA GLABRA L.	23
1.5 ÓLEOS E GORDURAS.....	24
1.6 ÁCIDOS GRAXOS	25
1.7 CROMATOGRAFIA GASOSA	28
1.8 ENSAIOS BIOLÓGICOS	29
1.8.1 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS.....	29
1.8.2 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (ACHE)	32
1.8.2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	32
1.8.2.2 AÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.....	33
1.8.3 TESTE DE TOXICIDADE FRENTE Á ARTEMIA SALINA	34
1.8.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	40
3.2 PREPARAÇÃO E PESAGEM.....	41
3.3 EXTRAÇÃO COM SOXHLET	41
3.4 CÁLCULO DO RENDIMENTO DO ÓLEO FIXO DA SEMENTE DE ANNONA GLABRA	43
3.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE ANNONA GLABRA POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	43
3.5.1 HIDRÓLISE	43
3.5.2 METILAÇÃO DE ÓLEOS.....	44
3.6 MÉTODOS DE ANÁLISE:	44
3.6.1 CROMATOGRAFIA GASOSA.....	44
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA	44

3.7.1	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIBACTERIANA.....	45
3.7.1.1	PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO AGAR BRAIN HEART INFUSION (BHI)	45
3.7.1.2	PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	45
3.7.1.3	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	45
3.7.1.4	TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS AMOSTRAS.....	46
3.8	ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	47
3.8.1	PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO TRIS/HCL PH 8 (50MM):.....	47
3.8.2	PREPARO DA SOLUÇÃO ENZIMA (1000U/mL):.....	47
3.8.3	PREPARO DA SOLUÇÃO ENZIMA NA CONCENTRAÇÃO 0,222 U/ML.....	47
3.8.4	PREPARO DA SOLUÇÃO TRABALHO	47
3.8.5	PREPARO DOS REAGENTES	48
3.8.6	TESTE DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DE ACETILCOLINESTERASE DAS AMOSTRAS.....	48
3.9	DETERMINAÇÃO DA TOXIDADE FRENTE À <i>ARTEMIA SALINA</i>	49
3.9.1	PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO SALINA	49
3.9.2	PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PARA O BIOENSAIO.....	50
3.9.3	REALIZAÇÃO DOS TESTES	50
3.9.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	51
3.10.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE <i>A. GLABRA L.</i>	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.1	RENDIMENTOS DO ÓLEO DA SEMENTE DE <i>A. GLABRA L.</i>	53
4.2	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE <i>ANNONA GLABRA</i> POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	54
4.3	TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	57
4.4	TESTES DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DE ACETILCOLINESTERASE.....	59
4.5	TESTE DE TOXICIDADE GERAL FRENTE À <i>ARTEMIA SALINA</i>	59
4.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DA <i>A. GLABRA.</i>	62
5	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas pelos homens desde os primórdios da civilização, para o tratamento de vários tipos de doenças, o uso destas plantas servem tanto para prevenção ou cura, utilizadas sob forma de chás ou extratos e este hábito sempre existiu na história da humanidade (MORAES; SANTANA,2001).

A utilização de plantas medicinais na recuperação da saúde tem crescido desde da forma mais simples de tratamento, como infusões, emplastros, elixires, etc, até as formas mais requintadas (LORENZI;MATOS,2002).

Diversas propriedades terapêuticas das plantas são descritas pela população, que em sua maioria são confirmadas nos estudos científicos, assim comprovando a importância da pesquisa farmacológica. O desenvolvimento de diversos medicamentos foi propiciado por tais propriedades, obtidos por síntese a partir de molécula protótipo ou através de isolamento alguma vezes biomonitorado (MACIEL et al, 2002; HOSTETTMANN et al, 2003).

Fármacos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87% das doenças humanas, podendo ser usados tais como antibacteriana, anticoagulante, antiparasitária, imunossupressoras e anticancerígenas (BRANDÃO et al.,2010).

Embora, seja de grande importância a conferida às plantas, a exploração do potencial ainda é muito baixa. Segundo estimativas o número de espécies superiores pode chegar a 500.000, sendo que desta, apenas 15 a 17% foram investigadas quanto ao seu potencial medicinal. O conhecimento das propriedades terapêuticas é indispensável para a transformação da planta medicinal em um produto fitoterápico. Com isso, pesquisas com plantas medicinais tem sido e continuam a ser considerada uma opção importante na busca de novas drogas (BARROS 2008; BASTO 2014).

No Brasil a variedade de climas e regiões geográficas é propícia para o desenvolvimento de floras diversificadas. Existem nas plantas uma variedade de constituintes e muitos deles são bastante tóxicos, estudos mostram que os efeitos adversos de agentes fitoterápicos são menos frequentes se comparados com as de drogas sintéticas (CALIXTO, 2000).

Os estudos aprofundados das plantas medicinais são fundamentais para assegurar a qualidade e eficácia de seus extratos, através de testes farmacognóstico e toxicológicos em animais e logo em seguida a análise eficácia e segurança no homem (MELLO; PETROVICK, 2000).

Óleos e gorduras vegetais são muito utilizados pela indústria farmacêutica e alimentícia e estão sujeitos a tratamentos térmicos durante seu processamento. Esse fato tem exigido o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de avaliar se as condições de processamento são compatíveis com a estabilidade térmica e oxidativa e conseqüentemente com a qualidade destes óleos e gorduras (FARIA et al., 2002).

Diversos autores estudaram a estabilidade térmica de óleos vegetais e determinaram algumas propriedades físicas através da análise térmica (CAVALCANTI et al., 2012; GARCIA et al., 2007; FARIA et al., 2002). Segundo Garcia et al. (2007) os métodos termoanalíticos apresentam vantagens pois são rápidos, precisos e necessitam de uma pequena quantidade de amostra.

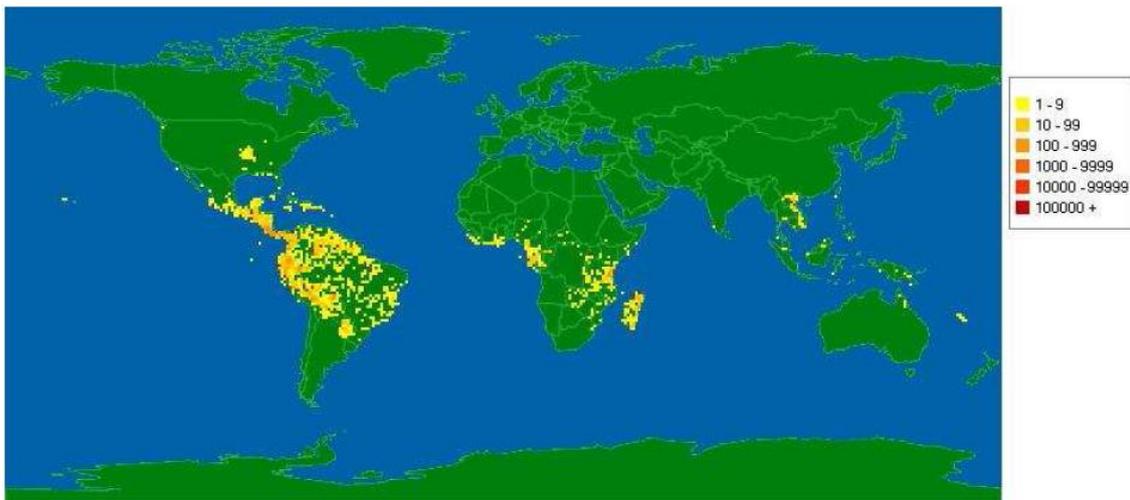
Devido à importância de conhecer as propriedades da semente de *Annona glabra* para que se possa utilizá-la, esse trabalho tem por finalidade avaliar as potencialidades de utilização do óleo extraído da semente de *Annona glabra*. Para tanto, realizou-se a extração do óleo da semente, determinando e quantificando os ácidos graxos onde foram avaliadas as atividades biológicas.

1.1 FAMÍLIA ANNONACEAE

A família annonaceae é muito diversa, ela possui o maior número de espécies entre as Magnoliales, constituída por aproximadamente 135 gêneros e 2.500 espécies identificadas, espalhadas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (figura 1) aparecendo como árvores aromáticas, arvoreta ou lianas (CHATROU et al.,2004).

No Brasil existem cerca de 30 gêneros e aproximadamente 260 espécies, grande parte ocorrendo em florestas com alguns representantes em áreas abertas (MAAS et al.,2007), os gêneros mais comuns são *Annona*, *Guatteria*, *Xylopia* e *Rollinia*.

Figura 1. Distribuição geográfica das espécies da família Annonaceae no mundo.



Fonte: CRUZ (2011)

A annonaceae possui algumas características para a sua identificação, são o odor forte exalado quando o tronco é cortado, presença de fibras longas e resistentes na casca do caule. As folhas são dísticas alternas, simples, sem estípulas e margem inteira. As flores são isoladas ou reunidas em inflorescências, hemicíclicas, hermafroditas, diclamídeas, com perianto diferenciado no cálice e corola, em geral são trímeras e carnosas, estames numerosos, dispostos de formas espiraladas, ovário súpero com numerosos carpelos apocárpicos com um a muitos óvulos (JOLY,2002).

Os frutos são apocárpicos ou sincárpicos, mas sempre do tipo baga. Apresentam uma ou muitas sementes, com camadas envoltórias carnudas e suculentas, formando um endosperma colorido e nutritivo que envolve e protege o embrião, além disso ainda são oleosos (JOLY, 2002).

O principal valor econômico desta família é fornecimentos dos frutos, pois além de serem comestíveis possuem propriedades nutricionais que são consumidos in natura e servem para preparação de sucos e sobremesas, algumas espécies são cultivadas e comercializadas no Brasil e entre elas estão, *A.squamosa* (fruta do conde), *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa) (LAGE,2011; KESSLER, 1993).

Muitas partes dos frutos são utilizadas na medicina popular. Várias espécies de annonáceae possuem várias atividades biológicas entre eles são: antimicrobiana, antitumoral, pesticidas e antimalárica (ZENG et al., 1996; SANTOS et al.,2007).

1.2 GÊNERO

O nome *Annona* deriva do latim e significa “colheita anual” (LIZANA;REGINATO,1990).O gênero *Annona* possui mais de 140 espécies tropicais nativas, no Brasil são conhecidas popularmente por fruta-do-conde, pinha, graviola, beribá e cabeça de negro, todas exóticas. As espécies mais comuns no Brasil são *A. muricata*, *A. cherimola*, *A. coriácea*, *A. reticulata* e *A. squamosa*, conforme mostra a figura 2 (DI STASI ; HIRUMA-LIMA 2002).

Figura 2. Espécies de algumas frutas do gênero *Annona*



Fonte: <https://mcientifica.com.br/plantas/annona-sp>

Economicamente, as espécies de *annona* tem grande importância como fonte de fruto comestível, as produções de seus frutos despertam um interesse comercial, pois contêm propriedades nutricionais, onde são utilizadas na forma de sucos ou sorvetes. Além disso, algumas espécies são utilizadas no paisagismo por terem aparência elegante e podem ser usadas na arborização urbana (LORENZI; MATOS,2002).

Estudos etnobotânico de várias espécies do gênero *annonna* tem trazido diversos dados da medicina tradicional como mostra a (Tabela 1).

Tabela 1. Algumas espécies do gênero *Annona* e suas indicações medicinais.

Espécie	Indicação	Parte da planta	Referência
<i>A. coriacea</i>	Diarreia crônica Emenagogo	Sementes e Folhas	BRAGA, 1976. GEMTCHUJNICO V, 1976.
<i>A. crassiflora</i>	Ferimentos Picadas de cobra	Sementes	SANTOS et al.,1994. LORENZI, 1998.
<i>A. cherimola</i>	Inseticida e Antiparasitária	Sementes	KIM et al.,2001.
<i>A. dioica</i>	Reumatismo Antidiarréia	Frutas Sementes	SANTOS et al.,2003.
<i>A. Montana</i>	Gripes Resfriados Insônia	Folhas	MOOTO et al., 2000. PRANCE,1975. TOLMIE, 1975.
<i>A. Squamosa</i>	Estomacal Contusas Sinapismo Inseticidas	Sementes e Folhas	BRAGA, 1976. GEMTCHUJNICO V, 1976.
<i>A.tenuiflora</i>	Dores de cabeça Tonturas Hipotensão	Folhas	DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002.
<i>A.reticulada</i>	Anti-térmico Antidiarréica	Sementes	BRAGA, 1976.

Continuação da tabela 1. Algumas espécies do gênero *Annona* e suas indicações medicinais.

<i>A. purpúrea</i>	Febres Resfriados Desinteria	Fruta Casca e Sementes	CHANG et al.,1998.
<i>A. senegalensis</i>	Antidiarréica Problemas respiratório	Folhas Cascas e Raiz	ZENG et al., 1996.
<i>A. spinescens</i>	Diarréia Emenagogo	Sementes e folhas	BRAGA, 1976.
<i>A. palustris</i>	Vermífugo	Folhas e Frutos	GEMTCHUJNICO V,1976.
<i>A. muricata</i>	Rematismo Anti-térmica Diurético Sedativo Adstringente Antiparasitária	Sementes Folhas Frutos e Raiz	BRAGA, 1976. GEMTCHUJNICO V, 1976. DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002 PRANCE,1975.
<i>A. haematantha</i>	Anti-térmica Antidiarréica	Folhas	GEMTCHUJNICO V,1976.

Fonte: CRUZ (2011)

O estudo das espécies do gênero *Annona* tem crescido, pois apresentam diversas atividades farmacológicas, são realizados isolamento e caracterização de várias classes de substâncias químicas, principalmente as acetogeninas que possui uma potente ação anti-neoplásica, citotóxica, pesticida, vermícida, antimicrobiana, imunossupressora, antimalárica e abortiva (ZAFRA et al.,1996;LEBOEUF et al.,1982).

1.3 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE *Annona glabra* L.

A *Annona glabra* L. é conhecida no Brasil como araticum do brejo, araticum-bravo ou araticunzeiro, é uma árvore de pequeno porte, semidecídua, encontrada em

todo território brasileiro, principalmente nas áreas costeiras e alcança aproximadamente 12 a 15 metros de altura, possui normalmente tronco único (figura3), suas sementes germinam em grupos (SIEBRA, 2007).

Sua classificação taxonômica:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Magnoliales

Família: Annonaceae

Gênero: *Annona*

Espécie: *A. glabra*

Figura 3. Planta da espécie *A. glabra*



Foto: Habel Nasser da Costa

Crescem naturalmente nas Americas do Norte, Sul e Central além do oeste africano, em regiões alagadas, salobras ou não. Seu crescimento ocorre em habitats que estão periodicamente ou permanentemente inundados, ou seja, ao longo de rios, margens de lagos e em regiões salobras próximas ao litoral (CROAT, 1978).

As flores são muito atrativas, geralmente com 2 a 3 cm de diâmetro, variando de amarelo pálido a creme, com três pétalas maiores externas encouraçadas e três pétalas pequenas internas (figura 4) (PROTECTION, 2004).

Figura 4. Flor de *A. glabra* iniciando sua abertura.



Foto: Habel Nasser Rocha da Costa.

As folhas possuem de 7 a 12 cm de comprimento, pecíolo cilíndrico, lâmina oblonga, cartácea, base obtusa, ápice acuminado, margem plana, com 9 a 13 pares de nervuras secundárias (figura 5). A maturidade reprodutiva é atingida após aproximadamente dois anos, quando se inicia a floração e a produção de frutos (SIEBRA,2007).

Figura 5. Folhas de *A. glabra* L.



Foto: Habel Nasser Rocha da Costa.

O fruto é esférico, com cerca de 5 a 15 cm de diâmetro (figura 6), naturalmente verde, o qual, após a queda, torna-se amarelado, em seguida escurecendo. Possui pouco mais de 100 sementes, de aspecto semelhante aos da abóbora, com aproximadamente 1 cm de comprimento.

Figura 6. Fruto verde de *A. glabra* L.



Foto: Habel Nasser Rocha da Costa

No Brasil, os frutos caem entre os meses de março e abril, permanecendo viáveis por alguns meses em água doce ou salobra. Para que ocorra a germinação, a semente necessita de ambiente alagadiço ou úmido. Uma vez estabelecida a germinação, a planta pode sobreviver em altos níveis de salinidade, possuindo, na fase adulta, considerável tolerância a ambientes salinos (PROTECTION, 2004).

1.4 SEMENTE DE *ANNONA GLABRA*

As sementes de *A.glabra L.* possui a cor castanha clara são achatados (figura 7) e germinam em 40 a 60 dias com 95% de germinação.

Figura 7. Sementes de *Annona glabra L.*



Fonte: Autor

Nos últimos anos sementes de frutas da família Anonácea estão sendo estudadas por possuir diversas classes de substâncias com atividades químicas e farmacológicas, principalmente no que se refere às acetogeninas (CHEN et al., 2012a; CHEN et al., 2012b).

Segundo Santos, Pimenta e Boaventura (2007) essas substâncias naturais bioativas apresentam importantes atividades biológicas tais como: citotóxica, antitumoral, pesticida, vermicida, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e antimalárica.

Yang et al. (2009) verificou que o teor total de acetogenina foi maior nas sementes de *A. squamosa* do que em *A. glabra L.* e outras três espécies (*A. de graviroleira*, *A. reticulados* e *A. Bullata*).

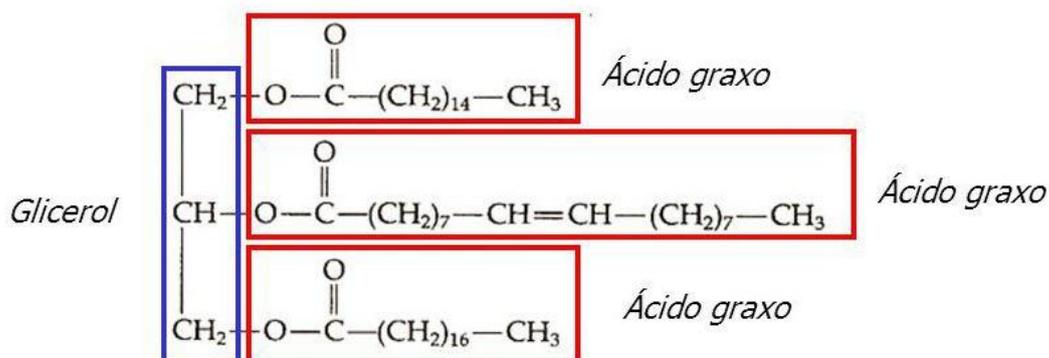
Os estudos relacionados à semente de *A. glabra L.* são sempre relacionados às acetogeninas, não tendo sido encontrados na literatura estudos com relação à caracterização e quantificação dos ácidos graxos presentes no óleo extraído da semente da fruta.

1.5 ÓLEOS E GORDURAS

Óleos e gorduras vegetais são produtos constituídos principalmente de glicerídeos de ácidos graxos de espécies vegetais, podendo conter pequenas quantidades de outros lipídeos como fosfolipídios, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres naturalmente presentes no óleo ou na gordura (ANVISA RDC nº 270,2005).

Óleos e gorduras são substâncias classificadas como lipídeos, sendo encontradas em tecidos animais ou vegetais. São constituídos por uma mistura de diversos compostos químicos sendo o mais importante os ácidos graxos e derivados, como mono, di, tri-acilglicerídeos e fosfatídeos (RAMALHO; JORGE, 2006). Os triacilglicerídeos são ésteres formados de glicerol e três ácidos graxos (figura 7). Eles são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos tais como clorofórmio, benzeno e hexano, à temperatura ambiente podem ser gorduras, quando sólidos e, quando líquidos, são óleos (FARIA et al., 2002).

Figura 7. Estrutura geral de um triacilglicerídeo.

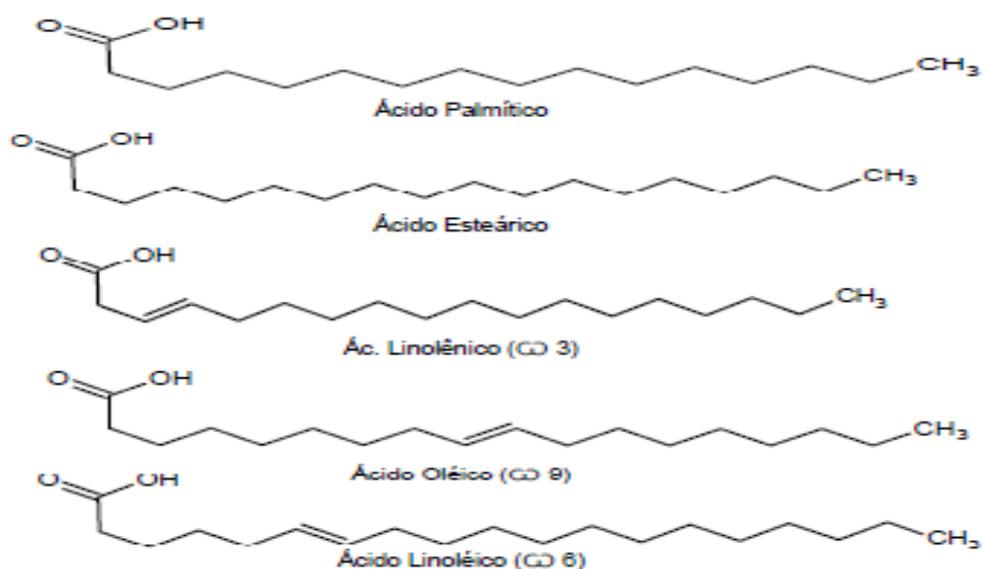


Além dos triacilgliceróis, os óleos gorduras podem apresentar outros constituintes químicos em menores quantidades: esteróis (β -sitosterol, campesterol e estigmasterol), cerídeos (palmitato de cetila), hidrocarbonetos incolores (esqualeno), carotenoides, tocoferóis, lactonas e metilcetonas. Os carotenoides (β -caroteno) dão a coloração amarelada ou avermelhada característica dos óleos. Os tocoferóis agem como antioxidantes, impedindo a rancidez oxidativa. As lactonas e metilcetonas conferem odor ao óleo. Já os esteróis, os cerídeos e os hidrocarbonetos incolores não influenciam as propriedades organolépticas dos óleos e gorduras (MORETTO ; FETT, 1998).

1.6 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos possuem longas cadeias alifáticas de átomos de carbono ligados a hidrogênios, possuindo um grupo carboxila (-COOH) em uma das extremidades da cadeia (Figura 8). Podem ocorrer na natureza como substâncias livres ou esterificadas a maior parte com glicerol, formando os glicerídeos (MOYNA; HEINZEN, 2007).

Figura 8. Estrutura química de alguns ácidos graxos.



Fonte: LIMA (2009)

Os ácidos graxos podem ser classificados como saturados ou insaturados, dependendo da ausência ou presença de ligações duplas (carbono-carbono). Os saturados não possuem ligações duplas entre carbonos; os monoinsaturados possuem uma única ligação dupla entre carbonos e poli-insaturados possuem mais de uma ligação dupla entre carbonos (SALEM, 1999; MORETTO; FETT, 1998).

Os ácidos graxos saturados (AGS) são predominantemente encontrados em carne, ovos, queijos, leite, manteiga, óleo de coco, palma e em vegetais hidrogenados (GÓMEZ, 2003).

Os ácidos graxos monoinsaturados são encontrados na maioria das gorduras animais, aves, carnes de vaca e cordeiro e também em azeitonas, sementes e nozes, sendo o mais comum o ácido oleico (GARCIA, 2006).

Dos ácidos graxos poli-insaturados, o mais importante da família ômega-6 é o ácido linoleico, encontrado em maior ou menor abundância em óleos vegetais como os de girassol, milho, soja e algodão. É precursor do ácido araquidônico (ômega-6), no qual é transformado no organismo jovem, através de processo metabólico que permite o alongamento da cadeia de carbono e a dessaturação adequada. (GÓMEZ, 2003).

Da família ômega-3 o mais importante é o ácido linoleico, encontrados em sementes oleaginosas, por alongamento e dessaturação são gerados os ácidos eicopentaenóico e Docosahexaenóico. Os ácidos ômega-6 e 3 são considerados essenciais por serem necessários para a saúde uma vez que não são biossintetizados pelos animais e o homem, sendo adquirido através da dieta (GÓMEZ, 2003). Os principais ácidos saturados e insaturados presentes em óleos e gorduras na Tabela 2.

Tabela 2. Características dos principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras.

Nomenclatura Usual	Nomenclatura Oficial	C/I	Fórmula	PF (°C)
Ácido Butírico	Ácido Butanóico	4 : 0	CH ₃ - (CH ₂) ₂ - COOH	- 5,3
Ácido Capróico	Ácido Hexanóico	6 : 0	CH ₃ - (CH ₂) ₄ - COOH	-3,2
Ácido Caprílico	Ácido Octanóico	8 : 0	CH ₃ - (CH ₂) ₆ - COOH	16,5

Continuação da tabela 2. Características dos principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras.

Ácido Cáprico	Ácido Decanóico	10 : 0	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_8 - \text{COOH}$	31,0
Ácido Láurico	Ácido Dodecanóico	12 : 0	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{COOH}$	45,0
Ácido Mirístico	Ácido Tetradecanóico	14 : 0	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{12} - \text{COOH}$	54,0
Ácido Palmítico	Ácido Hexadecanóico	16 : 0	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{COOH}$	63,0
Ácido Esteárico	Ácido Octodecanóico	18 : 0	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{16} - \text{COOH}$	70,0
Ácido Araquídico	Ácido Eicosanóico	20 : 0	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{18} - \text{COOH}$	76,1
Ácido Behênico	Ácido Docosanoico	22 : 0	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{20} - \text{COOH}$	80,0
Ácido Palmitoléico	Cis-9-Hexadecenóico	16:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$	32,0
Ácido Oléico (Ω-9)	9-Octadecenóico	18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	4,0
Ácido Linoléico (Ω-6)	9-12-Octadecadienóico	18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	- 5,0
Ácido Linolênico (Ω-3)	9,12,15-Octadecatrienóico	18:3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	-11,0

C / I: Carbonos e insaturações

Fonte: SANTOS (2010)

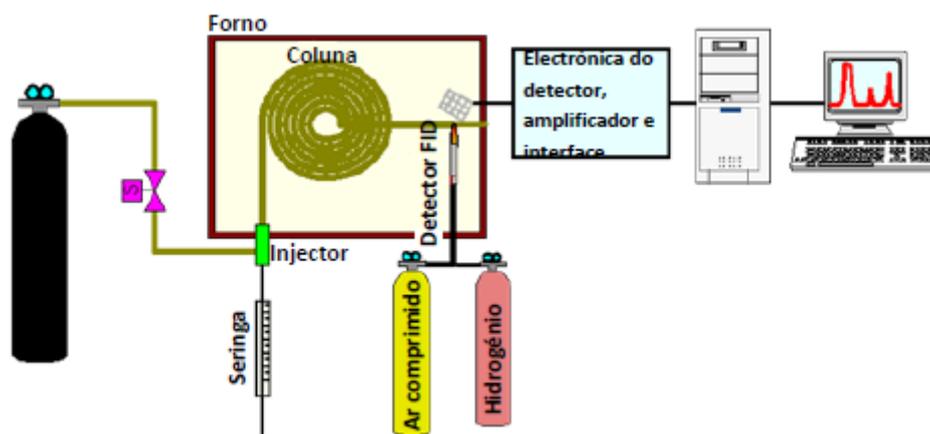
O ponto de fusão aumenta com o número de átomos de carbono e diminui com o número de instauração de ácidos graxos que compõe óleo ou gorduras. A presença de duplas ligações na cadeia faz com que haja uma modificação espacial na cadeia carbonada promovendo seu dobramento no plano o que confere um arranjo mais fraco entre as moléculas o que permite uma dissociação mais fácil, conferindo o estado físico mais liquefeito em relação ao ácido graxo saturado de números de carbono correspondente (LEÃO, 2009).

1.7 CROMATOGRAFIA GASOSA

É um método físico-químico de separação dos componentes em duas fases, que estão em íntimo contato. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS et al., 2006).

As substâncias separadas saem das colunas dissolvidas no gás de arraste e passam por um detector, um dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluido. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa o que possibilita a análise quantitativa (figura 9) (SKOOG et al., 2002).

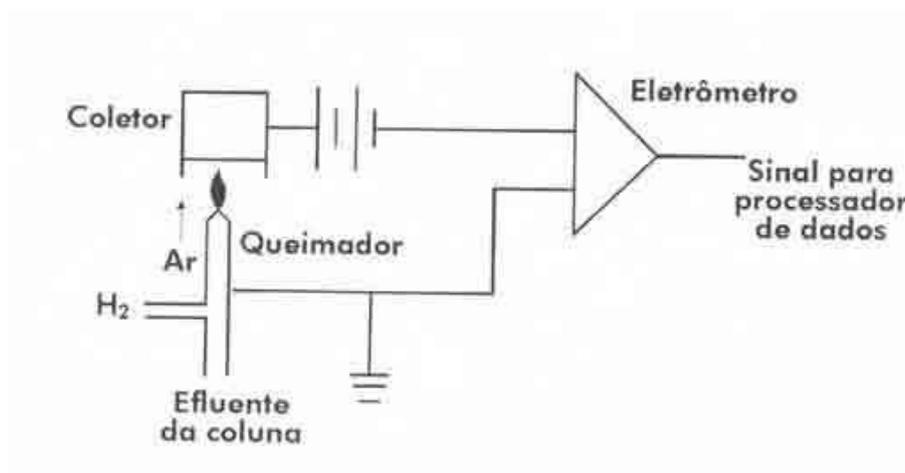
Figura 9. Diagrama esquemático de um cromatógrafo gasoso.



Fonte: KVASNICOVÁ ; BALINOVÁ (2006).

O detector de ionização em chamas (FID- flame ionization detector) é a técnica mais usada e mais aplicável em cromatografia gasosa. Esse detector (figura 10) é bastante utilizado devido a sua alta sensibilidade, largo intervalo de resposta e baixo nível de ruídos, robustez e de fácil utilização (SKOOG, 2009).

Figura 10. Esquema do detector de Ionização de chamas.



Fonte: FLUMIGNAN (2005).

No detector, o efluente da coluna é dirigido para um local entre o queimador com uma pequena chama de (ar/hidrogênio) e um eletrodo localizado acima da chama, que serve para coletar íons e elétrons, então é aplicada a uma corrente elétrica. A corrente resultante é medida com um pico amperímetro e os sinais de detecção são plotados em um gráfico onde a área abaixo da curva corresponde à concentração do composto na amostra. O detector de ionização exibe uma alta sensibilidade, uma alta linearidade de resposta e um baixo ruído, sendo ideal para a quantificação de substâncias (COLLINS, 2006).

1.8 ENSAIOS BIOLÓGICOS

1.8.1 Atividade de inibição de bactérias

A busca por tratamentos a base de fitoterápicos intensificou-se nas últimas décadas. O Brasil apresenta uma extensa e diversificada flora, sendo grande o número

de pesquisadores que tem contribuído para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas. No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (SILVA, 2013; YUNES et al., 2001).

Os antibióticos são produtos metabólicos naturais de fungos e bactérias capazes de impedirem o crescimento, ou de destruírem micro-organismos (MADIGAN et al., 2010).

Praticamente todas as classes de antibióticos usadas terapêuticamente até hoje foram descobertas entre as décadas de 1940-1950, conhecida como a “Era de Ouro dos Antibióticos” e proveniente da triagem de produtos naturais microbianos (BÉRDY, 2005).

A euforia da descoberta dos primeiros antibióticos e a crença de que no futuro não existiriam mais doenças infecciosas foram esmorecendo, uma vez que a complexidade das reações químicas das bactérias foi menosprezada, assim como o desenvolvimento de mecanismos para sua sobrevivência (UJVARI, 2003).

Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, a exposição aos antibacterianos desencadeou resistência bacteriana, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos. A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (CUNICO et al., 2004; DUARTE, 2006).

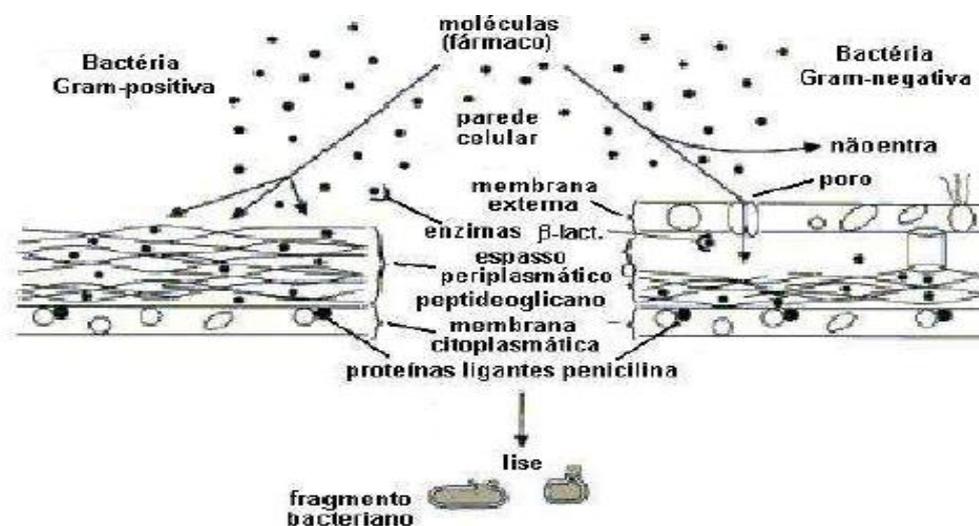
Atualmente o mau e excessivo uso dos antibióticos, o uso de doses inferiores a que é sugerida em manuais terapêuticos, assim como condições de higiene precárias, o aumento de pacientes imune comprometidos e a lentidão para o diagnóstico das infecções bacterianas têm favorecido o aumento das resistências microbianas não só nos hospitais, como também na comunidade, podendo atingir inclusive indivíduos saudáveis (FERREIRA et al., 2008).

As bactérias podem ser divididas em Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com a constituição da parede celular (figura 11), e o que as diferencia são as propriedades de permeabilidade e os componentes de superfície (SCHAECHTER *et al.*, 2002). Nas bactérias Gram-positivas, a parede consiste de muitas camadas de peptidoglicana, formando uma estrutura espessa e rígida, e contém ácidos teicóicos (formados a partir de glicerol e ribitol) (TORTORA *et al.*, 2005).

Em contrapartida, a parede de bactérias Gram-negativas é mais complexa que a das Gram-positivas, sendo formada de poucas camadas de peptidoglicanas e uma membrana externa, sendo esta formada por uma dupla camada lipídica: uma camada interna composta de fosfolipídeos e uma externa contendo lipopolisacarídeos e proteínas (TORTORA *et al.*, 2005).

Os agentes antimicrobianos se difundem com mais facilidade através da parede celular das Gram positivas, porém devem atravessar os canais de porinas nas Gram negativas (BARON; FINELGOLD, 1990).

Figura 11. Parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas



Fonte: BARON (2005)

Em relação à resistência, a bactéria continua proliferando, mantendo a mesma velocidade de crescimento mesmo ao ser tratada com o antibiótico. Na tolerância, o crescimento é inibido, mas o número de bactérias viáveis não sofre alteração por longo período. Assim, a bactéria desenvolve defesa apenas contra o efeito bactericida do antibiótico onde, o sucesso terapêutico somente será alcançado quando a concentração do antibiótico alcançar o valor da concentração mínima inibitória (CMI), definida como a menor concentração do antibiótico capaz de matar 99,9% das bactérias presentes. Finalmente, na persistência, uma pequena fração da população bacteriana, submetida ao tratamento, não sofre o efeito bactericida do antibiótico, independentemente de seu mecanismo de ação (JACOBY, 2005; ANDERSON, 2005).

Apesar da maioria dos antibióticos existentes atualmente no mercado ser de origem sintética, a pesquisa de produtos naturais voltou a ser objeto de estudo científico. Entre as principais ferramentas na busca de novos modelos moleculares estão a informação de como as plantas são utilizadas por diferentes grupos étnicos e o estudo farmacológico das preparações utilizadas (MAIA, 2008).

As novas estratégias da pesquisa em produtos naturais microbianos, envolvendo a busca de substâncias em micro-organismos e a utilização de ferramentas genômicas para o acesso a novos produtos naturais, podem acelerar o processo de descoberta de novos antibióticos, extremamente importantes num cenário de rápido desenvolvimento de resistência pelas bactérias aos agentes terapêuticos disponíveis (GUIMARÃES et al., 2010).

1.8.2 Atividade de inibição da Enzima Acetilcolinesterase (AChE)

1.8.2.1 Doença de Alzheimer

Falhas cognitivas, tais, como, prejuízo de aprendizagem e memória são frequentemente observadas no envelhecimento normal e nos estados patológicos relacionados com a terceira idade, incluindo a depressão e doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (JELLINGER,2006; AMARAL et al.2010).

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, que atinge primeiramente a memória, a capacidade de raciocínio e a comunicação. O quadro de sinais e sintomas dessa doença está associado à redução de neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina (BERGMANN et al., 1997).

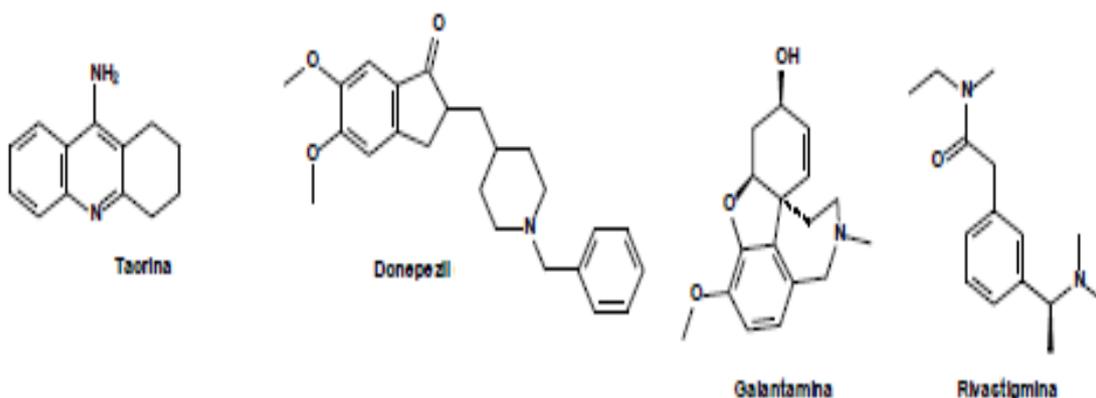
Trata-se de uma progressiva desordem demencial que pode vir a ser detectada clinicamente somente em sua fase final. Um diagnóstico definitivo baseado em informações clínicas é muito difícil (BRAAK et al., 1999).

A depressão é um dos sintomas encontrados nos portadores da doença de Alzheimer, para isso, um dos processos para aliviar o sintoma dessa doença é através de inibidores da acetilcolinesterase. Para o tratamento dessa patologia é necessária o uso de medicamentos, alvo principal de grandes pesquisas nos últimos 10 anos (HEINRICH E TEOH, 2004; HERNANDEZ *et al.*, 2010).

1.8.2.2 Ação da enzima Acetilcolinesterase

Os inibidores da AChE são capazes de inibirem a enzima responsável pela degradação de AChE e diminuir os sintomas cognitivos da DA. Estes foram os primeiros fármacos desenvolvidos a partir de estudos fisiopatológicos, os quais apresentavam a diminuição dos níveis de acetilcolina como principal causa etiológica da DA. Desta forma tacrina, donepezil, galantamina e rivastigmina (figura 12) constituem exemplos de iAChE disponibilizados no mercado farmacêutico desde o início da década de 90. (LEON et al., 2011; GROSSBERG, 2003).

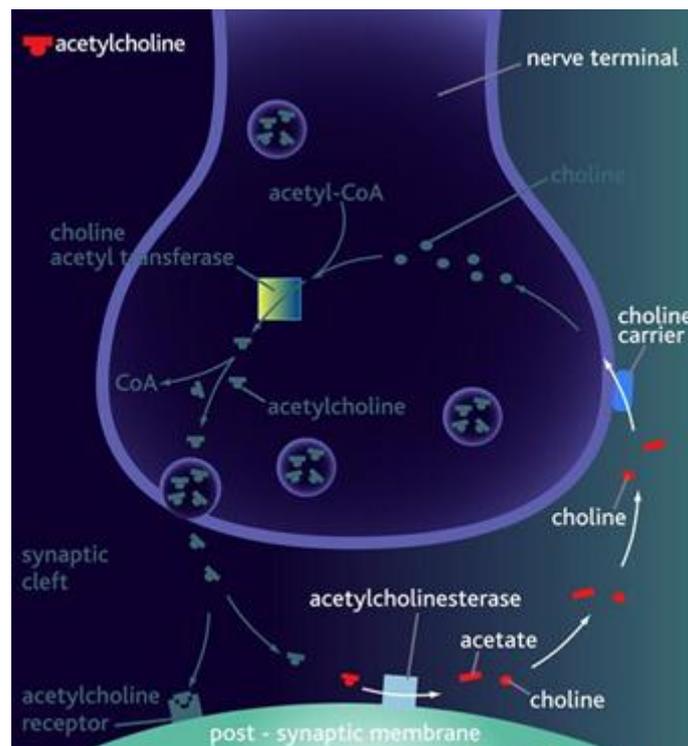
Figura 12. Inibidores da AchE



Fonte: RAMOS (2014)

A AchE é uma enzima regulatória responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, sendo esta uma função chave na regulação da transmissão dos impulsos nervosos (figura 13) que se iniba, geralmente leva rapidamente à morte do organismo (ALBUQUERQUE et al.,2006; PATOCKA et al.,2005).

Figura 13. Esquema do ciclo da acetilcolina.



Fonte: ASSIS (2011)

É possível observar o papel da acetilcolinesterase desativando o excesso desse neurotransmissor. Colina e acetato são liberados na fenda sináptica e a Colina é reabsorvida pelo neurônio, onde a acetilcolina é resintetizada pela ação da enzima Colina acetil-transferase. O acetato atravessa a barreira hemato-encefálica e é metabolizado em outros tecidos.

Sabe-se que uma das consequências da doença de Alzheimer é a redução do neurotransmissor acetilcolina (ACh). É a partir dessa redução de ACh, que se adotou a estratégia para a busca de novos fármacos que apresentem a capacidade de retardar o desenvolvimento ou os sintomas dessa doença, principalmente, aprimorando a função colinérgica. O aumento da acetilcolina no organismo pode ocorrer através da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (MINETT ; BERTOLUCCI, 2000).

1.8.3 Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*

Apesar das plantas possuírem várias utilidades terapêuticas, que são conhecidos popularmente pelas pessoas, o ser humano desconhece o fato de que elas podem

apresentar toxicidade tanto para o homem quanto para os animais (RODRIGUES et al., 2010).

A partir de 1982, iniciou-se o emprego de *Artemia salina* no monitoramento de extratos de plantas ou substâncias puras, com vistas à detecção da presença de compostos citotóxicos (MEYER, 1982). Atualmente este organismo pode ser considerado como um indicador confiável quanto à toxicidade de substâncias que se encontram nos extratos orgânicos testados ou substâncias puras (SANTOS, 2010).

Artemia salina é um pequeno crustáceo (figura 14) e é caracterizado por se adaptar a uma ampla variação de salinidade e temperatura do meio no qual está inserida. Possui curto ciclo de vida, alta adaptação a condições ambientais adversas, alta fecundidade, reprodução por partenogênese, pequeno tamanho corporal e são consumidores de uma ampla variedade de nutrientes (filtradores não seletivos). Aliados a uma distribuição cosmopolita, esses fatores de adaptação resultam em altas densidades populacionais, tornando esses organismos bons indicadores de contaminação ambiental (BARAHONA; SÁNCHEZ FORTÚN, 1999; NUNES et al., 2006).

Figura 14. Náuplio do crustáceo de *Artemia salina*.



Fonte: MANTOVANELLI (2013)

Por ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas (ANDRIOLLI, 2007).

As *Artemias salina* produzem cistos (figura 15), que são metabolicamente inativos e não se desenvolvem se forem mantidos secos. Depois de imerso em água do mar, os cistos, de formato bicôncavo, tornam-se esféricos, e dentro da casca, um embrião retoma as atividades metabólicas. Uma vez hidratado, o embrião que está dentro do cisto se ativa e após algumas horas, as membranas rompem-se e nasce uma

larva (náuplio) livre nadante. É neste estágio do seu ciclo de vida que a *Artemia* é utilizada nos testes de toxicidade (EPA, 2002).

Figura 15. Cistos de *artemia salina*



Fonte: Autor

O teste de toxicidade de uma substância a partir da *Artemia* é rápido, de baixo custo e requer pequena quantidade de amostra. O efeito tóxico avaliado neste bioensaio consiste na perda da capacidade de movimentação das larvas, após 48 horas de incubação com as amostras a serem testadas. Para que os resultados do teste sejam confiáveis, é necessário que as larvas sejam mantidas sob as condições ótimas de crescimento, como temperatura entre 25 e 35°C, salinidade de 35% e pH ligeiramente alcalino, em torno de 8,0 (MEYER, 1982).

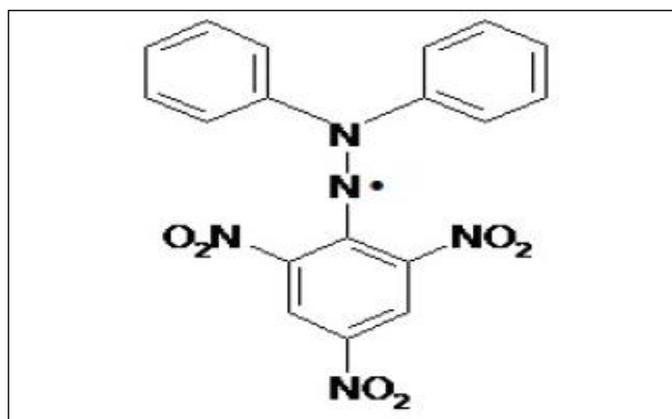
1.8.4 Atividade antioxidante

Devido a enorme diversidade química existente, vários ensaios vêm sendo desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras, os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. (MELO et al., 2010).

Uma ampla definição de antioxidante é "qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz" (SIES; STAHL, 1995).

Em 1922, Goldschmidt e Renn descobriram um radical livre estável de cor violeta, que atualmente tem sido usado como reagente colorimétrico para processos de oxi-redução. (IONITA, 2005). O DPPH (figura 16) pode ser mantido indefinidamente com pouca decomposição porque ele não reage com o oxigênio. O método provou ser bastante útil em série de investigações, tais como a determinação das propriedades antioxidantes de aminas, fenóis ou compostos naturais (vitaminas, extratos vegetais, medicamentos) (VEDANA, 2008).

Figura 16. Estrutura química do radical DPPH



Fonte: OLIVEIRA (2015)

As vantagens do método DPPH são:

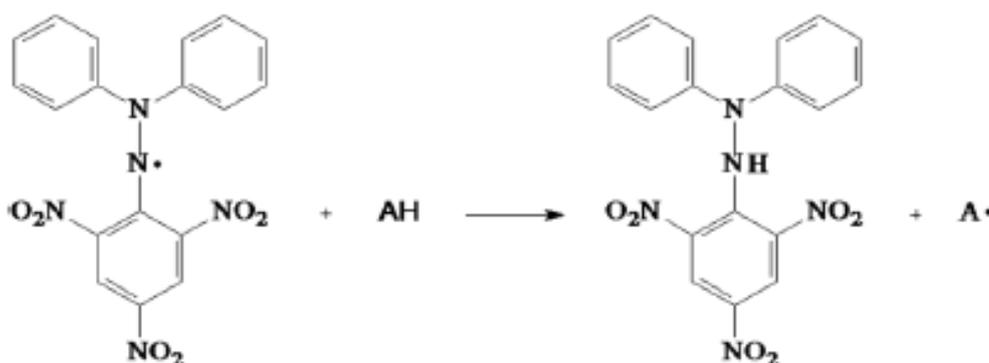
- avaliar uma grande quantidade de amostras em um período curto de tempo e rapidamente;
- um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado;
- permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol (DI MAMBRO et al., 2005).

O método consiste em avaliar a atividade sequestradora do DPPH, que é um radical estável, de coloração púrpura e absorve em um comprimento de onda de 515-520 nm, que em presença de antioxidante doadores de hidrogênio, é reduzido, formando 2,2-difenilpicril-hidrazina, de coloração amarela, com consequentes desaparecimentos da banda de absorção, sendo essa monitorada pelo decréscimo da absorbância. O desaparecimento da coloração é resultante descoloração e estequiometricamente

proporcional ao grau de redução, e o DPPH restante, medido depois de certo tempo, é inversamente proporcional a atividade de captura do radical pelo antioxidante (OLIVEIRA et al. 2009; SOUSA, et al.,2007).

O ensaio da captura de radicais de radicais de DPPH, desenvolvido por Blois (1958) e adaptado por Brand-Willians (1995), tem por base a redução do radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), que ao fixar um hidrogênio removido do antioxidante (AH) em estudo, leva uma diminuição da absorbância, permitindo calcular após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do radical DPPH (figura 17).

Figura 17. Reação entre um radical livre DPPH e um antioxidante



Fonte: REZENDE (2010)

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. Este método pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em um curto período de tempo. Portanto, este método tem sido uma ferramenta útil para avaliar a capacidade antioxidante de frutos (BORGUINI, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o perfil químico, atividade antioxidante e atividade biológica do óleo da semente de *Annona glabra L.*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o óleo da semente *A. glabra L.* utilizando o método de extração Soxhlet e determinar o rendimento.
- Determinar e quantificar os ácidos graxos majoritários através da cromatografia gasosa.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo da semente *A. glabra L.*
- Avaliar o potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE).
- Avaliar a toxicidade do óleo da semente *A. glabra L.* através do teste frente à *Artemia salina*.
- Avaliar a ação antioxidante pelo método de captura do radical livre estável DPPH.

Figura 19. (a) Sementes secas (b) Multiprocessador doméstico (c) Sementes trituradas e peneiradas



Fonte: Autor

3.3 Extração com Soxhlet

Foram colocadas cerca de 30 g em um cartucho de papel de filtro e levado ao extrator de Soxhlet acoplado a uma manta aquecedora (figura 20).

Figura 20. Extração do óleo da semente de *A. glabra* L. por solvente (hexano) utilizando o aparelho soxhlet.



Fonte: Autor

Em seguida foi adicionado o solvente na parte superior do aparelho para entrar em contato com o material contendo o óleo a ser extraído. O sistema foi aquecido a 70 °C, temperatura de ebulição do solvente, o solvente liberado da extração, ao atingir seu ponto de ebulição, entra em contato com a parede fria do condensador aclopado, fica líquido e retorna para o material a extrair. Este processo durou aproximadamente cerca de 3 horas, desligou-se a manta aquecedora e aguardou-se aproximadamente 40 minutos para resfriar o hexano. O material extraído, coletado do balão, foi levado ao evaporador rotativo para separação do solvente por evaporação conforme a (figura 21)

Figura 21. Aparelho Evaporador rotativo.



Fonte: Autor

O óleo foi armazenado em frasco de âmbar e levado em banho maria a 70 °C para retirar os traços do hexano residuais do óleo da semente de *Annona glabra* e em seguida foi pesado e os frascos foram recobertos com papel alumínio para evitar oxidação como mostra a (figura 22)

Figura 22. (a) Frascos com amostras de óleo (b) Amostras de óleo em Banho Maria (c) Frascos das amostras recobertos com papel alumínio



Fonte: Autor

3.4 Cálculo do rendimento do óleo fixo da semente de *Annona glabra*

Para calcular o rendimento do óleo foi utilizado a equação seguinte:

$$R\% = P2/P1 * 100$$

Onde:

P1: peso da amostra (material triturado)

P2 : peso do óleo após a retirada dos traços de hexano

3.5 Determinação da composição química do óleo de *annona glabra* por cromatografia gasosa

3.5.1 Hidrólise

Dissolveu-se, em tubo criogênico de 2 ml, ~12 mg da amostra de óleo em 100 ul de uma solução de etanol (95%)/ hidróxido de potássio 1mol/l (5%). Após agitação em vórtex por 10 s, o óleo foi hidrolisado em um forno de microondas doméstico (Panasonic Piccolo), à potência de 80 W (Potencia 2), durante 5 minutos. Após

resfriamento, adicionou-se 400µl de ácido clorídrico a 20%, uma ponta de espátula de NaCl (~20mg) e 600 µl de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 s e repouso por 5 min, uma alíquota de 300µl da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos de microcentrífuga e seco por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres. (Adaptado de W. W. Christie, Gas Chromatography and Lipids, 1989, Pergamon Press).

3.5.2 Metilação de óleos

Posteriormente, os ácidos graxos livres foram metiladas com 100 µl BF₃ / metanol (14%) por aquecimento durante 10 minutos em banho de água a 60°C. Diluídas em 400 µl de metanol e analisados por Cromatografia Gasosa.

3.6 Métodos de análise:

3.6.1 Cromatografia Gasosa

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Gás HP7820A (Agilent) equipado com detector por ionização de chamas. Programa de aquisição de dados EZChrom Elite Compact (Agilent). Utilizou-se uma coluna SP-2560 30m x 0,25mm x 0,20µm (SUPELCO) com gradiente de temperatura: 80°C, 0min, 7°C/min até 240°C; injetor (split de 1/50) a 250°C e detector a 260°C. Hidrogênio como gás de arraste (3.0 ml/min) e volume de injeção de 1µl. A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados FAME C14-C22 (Supelco cat no 18917).

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os testes de sensibilidade antibacteriana e atividade anticolinesterásica foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi.

3.7.1 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIBACTERIANA

3.7.1.1 Preparação do meio de cultivo Agar Brain Heart Infusion (BHI)

Para o preparo do meio de cultivo, dissolveu-se 3,4 g de Agar Brain Heart Infusion (BHI) em 200 mL de água destilada. Homogeneizou-se e autoclavou a solução por 15 min a 121°C.

3.7.1.2 Preparação do inóculo

Para realizar o teste, foram utilizadas bactérias Gram Negativas: *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311); e bactérias Gram Positivas: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, USA).

Foi preparado um pré-inóculo no qual as bactérias estocadas foram inoculadas em tubos de ensaios contendo 3,0 mL de meio de cultura BHI previamente esterilizados, em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 24 h, depois deste tempo e com o auxílio de uma micropipeta, 500 µL do pré-inóculo foram transferidos para erlenmeyer contendo 40 mL de água destilada estéril. O inóculo foi padronizado no intervalo de transmitância 74-75% para bactérias em espectrofotômetro, a 600 nm. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar próximo ao bico de Bünsen.

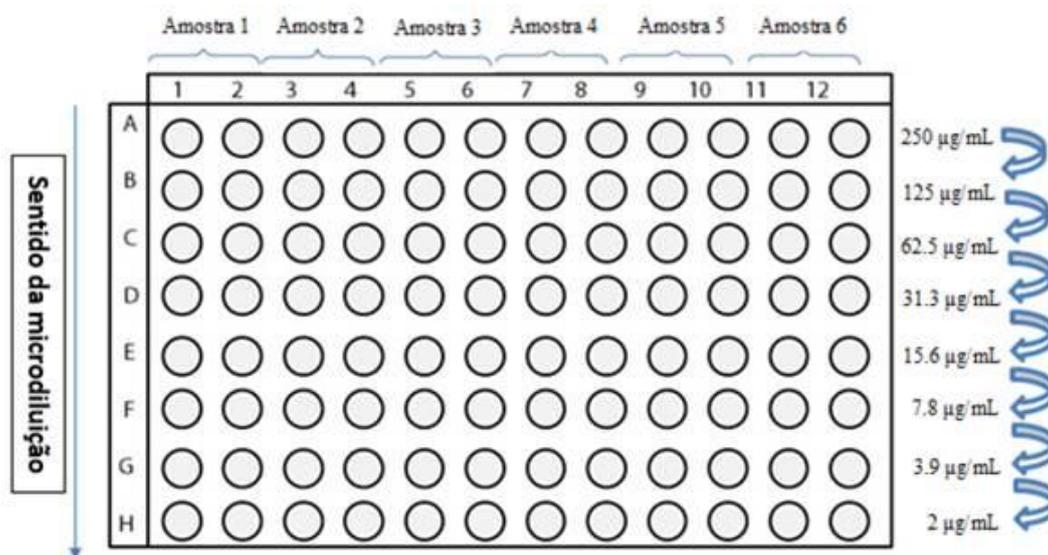
3.7.1.3 Preparação das amostras

As amostras foram pesadas, transferida para frascos tipo *ependorf* e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução com concentração de 50 mg/mL. Após ser homogeneizada em misturador vortex, pipetou-se 20 µL desta solução para um frasco *ependorf*, contendo 1980 µL de meio de cultura BHI afim de se obter uma solução final de 250 µg/mL. O antibiótico Ampicilina foi preparado seguindo o mesmo procedimento, sendo que a concentração utilizada de 12,5 mg/mL.

3.7.1.4 Teste de atividade antibacteriana das amostras

Os testes foram realizados em placas de 96 micropoços, em duplicata. Para realizar as diluições, foi adicionado 200 μL da solução da amostra a ser testada (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em meio BHI) por toda a fila A (Figura 23) do teste e do controle da amostra. Nas filas B à H, foi adicionado 100 μL de meio BHI. Foram realizadas diluições seriadas na placa da seguinte maneira: 100 μL de amostra foi retirada de cada poço da fila A e transferido para a fila B. Este foi homogeneizado com os 100 μL de meio BHI que já estavam nestes poços, e 100 μL desta nova solução foi transferido para a fila C, assim sucessivamente até a fila H. Foi desprezado os 100 μL finais. Ao final, as filas de A à H possuíam soluções de amostra na concentração de 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Figura 23 - Modelo e distribuição das amostras e controles nas placas utilizadas para o Teste de sensibilidade antibacteriana.



Fonte: MOZOMBITE (2016)

Os controles foram realizados da mesma maneira que o ensaio:

Controle de qualidade do ensaio:

Substitui-se a solução-trabalho pelo antibiótico

- 100 μL de solução de Ampicilina (12,5 mg/mL em meio BHI)

- 100 μ L de inóculo

Branco:

Aqui não se adicionou o inóculo.

- 100 μ L de solução da amostra em meio BHI- 100 μ L de água destilada estéril

Controle de crescimento do micro-organismo:

Aqui verifica-se a viabilidade celular

- 100 μ L de meio BHI
- 100 μ L de inóculo

Controle de esterilidade do meio de cultura:

- 100 μ L de meio BHI
- 100 μ L de água destilada estéril

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C e posteriormente, após 24 h foram realizadas leitura em leitor de placa de Elisa (492 nm), encerrando o teste.

3.8 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

3.8.1 Preparo da solução tampão Tris/HCl pH 8 (50mM):

Para preparar uma solução de 25 mL de Tris/HCl, pesou-se 398,08 mg do sal Utrapure Tris Hydrochloride e adicionou-se 25 mL de água destilada. Conferiu-se o pH em 8.

3.8.2 Preparo da solução enzima (1000U/mL):

Diluiu-se 0,77 mg da enzima no volume de 500 μ L da solução tampão Tris/HCl pH 8,0 no próprio frasco da enzima, para adquirir uma solução de concentração de 1000U/mL.

Deixou-se a enzima em solução por 20 minutos e depois, sob agitação, por um período de 10 a 15 minutos.

3.8.3 Preparo da solução enzima na concentração 0,222 U/mL

Adicionou-se 1 μ L da solução estoque (1000 U/mL) em 4,5 mL da solução Tris/HCl (50mM). Depois agregou-se albumina sérica bovina 0,1% (p/v): 4,5 mg.

3.8.4 Preparo da solução trabalho

Preparou-se uma solução do extrato em tampão Tris/HCl, DMSO, ou solvente adequado, na concentração 10 mg/mL.

3.8.5 Preparo dos reagentes

Solução de ATCI (15mM): Preparou-se 1 mL de solução, pesou-se 4,08 mg de iodeto de acetilcolina e dissolveu-se em 1 mL de água destilada.

Solução de DTNB (3mM): Pesou-se 2,38 mg de DTNB e dissolveu-se em 2 ml de solução tampão Tris/HCl pH 8. Adicionou-se 11,69 mg de NaCl (0,1M) e 8,132 mg de MgCl₂.6H₂O à solução.

3.8.6 Teste de atividade inibitória de acetilcolinesterase das amostras

O teste de atividade inibitória dos extratos estudados sobre a enzima acetilcolinesterase foi conduzido com base no método espectrofotométrico de Ellman, modificado por Rhee et al. (2001), em microplacas de 96 poços. Eserina e galantamina foram utilizadas como inibidores padrão (10 mg/mL) e como controle negativo foi realizado o ensaio sem a presença de inibidor. Os testes foram realizados em triplicata. Em cada poço foram dispensados 25 µL de iodeto de acetilcolina (15 mM); 125 µL de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB); 50 µL de tampão tris-HCl pH8 0,1% p/v de albumina sérica bovina e 25 µL de extrato (10 mg/mL) solubilizados em Tween/DMSO/30%. A leitura das placas foi realizada em 405 nm por 9 vezes em um período de 10 minutos. Logo após a primeira leitura foi adicionado 25 µL da enzima acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus*, Sigma Aldrich)(0,222U/mL) e realizada 9 leituras em um período de 10 min em 405 nm. A interferência da hidrólise espontânea do substrato foi corrigida a partir da subtração da média da absorbância medida antes da adição da enzima. A porcentagem de inibição da enzima foi calculada a partir da seguinte fórmula matemática:

$$\% \text{ inibição} = [(C-A) \times 100] / C$$

Onde:

C = controle contendo enzima e substrato

A = ensaio contendo o extrato, enzima e substrato

3.9 DETERMINAÇÃO DA TOXIDADE FRENTE À ARTEMIA SALINA

Metodologia empregada

A toxicidade sobre *Artemia salina* realizou-se através da metodologia adaptada de Mayer et al (1982).

3.9.1 Preparação da Solução Salina

Em um aquário que se utilizou como incubadora, foi adicionada uma solução salina artificial (40g de sal grossa em 1L de água destilada). Ajustando o pH entre 8 e 9 com uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 a 10%). A incubadora foi iluminada artificialmente com uma lâmpada fluorescente com aeração. Em um dos lados da incubadora, foram colocados aproximadamente 100 mg de ovos de *Artemia salina*. Parte do sistema foi coberto com papel alumínio (Figura 24) para que os organismos ao nascerem, permanecessem isolados em um dos lados do aquário devido à diferencia de iluminação. Os náuplios foram atraídos pela iluminação depois da eclosão facilitando a separação destes e das cascas dos cistos. Durante a incubação, a temperatura foi mantida em torno de 25°C e a eclosão dos ovos foram monitoradas a cada 12 horas sendo verificada no período de 48 horas.

Figura 24. Aquário contendo cistos de *Artemia salina* submetido um período de 24 horas.



Fonte: Autor

3.9.2 Preparação de Soluções para o Bioensaio

O tempo de exposição (24h) partiu de uma solução de 25 mL contendo 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ da amostra, solubilizada em Tween 80 a 1% e completados com água salina.

A partir da primeira solução, pipetou-se volumes de 12,5 mL a tubos contendo 1 mL de uma solução de Tween 80 a 1% em solução salina e completados com 10 mL de solução salina, para obter a concentração de 500 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. As demais soluções de concentração inferior (250 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram obtidas conforme já descrito, e utilizando a seguinte equação respectivamente:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

3.9.3 Realização dos testes

Após o período de incubação de 24 horas, 10 organismos (náuplios de *Artemia salina*), foram selecionados e expostos nos tubos de ensaios com as diferentes concentrações diluídas.

Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração. Utilizou-se uma solução salina sem extrato como controle positivo também em triplicata, que foi submetido ao mesmo procedimento experimental que os grupos tratados com as amostras em estudo para efeitos comparativos da influência do veículo utilizado sobre a resposta das larvas de *A. salina*.

Este sistema foi incubado em temperatura ambiente por 24 horas, sem aeração sendo os frascos mantidos sob iluminação.

Após o período de 24 horas de incubação foi contados o número de larvas mortas e vivas em cada frasco, através da visualização macroscópica e os valores registrados em formulário.

3.9.4 Avaliação da toxicidade

Decorrido o tempo de 24 e 48 horas realizou-se a contagem do número de náuplios vivos e mortos/imobilizados. Foi calculada a probabilidade de mortalidade de acordo com a fórmula:

$$\text{Probabilidade de Mortalidade (\%)} = \frac{r}{n} \times 100, \text{ onde:}$$

r = número de artemias mortas;

n = número de artemias totais no tubo de ensaio.

Os valores em porcentagem da probabilidade de mortalidade foram corrigidos levando-se em consideração a porcentagem de mortalidade no teste controle negativo de acordo com a Fórmula de Abbot (ABBOT, 1925).

Fórmula de Abbot

$$\% \text{ Probabilidade de Mortalidade} = \frac{100 \times (\%T - \%C)}{100\% - \%C}, \text{ onde:}$$

$$100\% - \%C$$

%T- representa a mortalidade de artemias testadas com a amostra de interesse;

%C- a mortalidade de artemias utilizadas no controle.

Na interpretação dos resultados foi determinada a Concentração Letal 50% CL₅₀.

3.9.5 Cálculo da CL₅₀

Para a obtenção da CL₅₀ no teste de avaliação de toxicidade utilizou-se uma curva de calibração. Considerou-se após os cálculos, baixa toxicidade quando a CL₅₀ for superior a 500 µg.mL⁻¹; moderada para CL₅₀ entre 100 a 500 µg.mL⁻¹ e muito tóxico quando a CL₅₀ foi inferior a 100 µg.mL⁻¹ (AMARANTE, 2010).

3.10 Determinação da atividade antioxidante do óleo de *A. glabra L.*

A metodologia consiste na medida da extinção da absorção do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DDPH) em 515 nm (MIRANDA; FRAGA, 2006). A determinação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata por método de espectrofotometria de absorção molecular UV-visível. A técnica consistiu na incubação por 10 minutos de 500 µL de uma solução metanólica de DPPH 0,1 mM com 500 µL de soluções contendo concentrações crescentes de óleo fixo (500; 1000; 1500; 2000; 2500 µg.mL⁻¹) em metanol.

Procedeu-se da mesma forma para a preparação da solução denominada controle, porém substituindo-se 500 µL da amostra em 500 µL de solvente metanol. Para a solução denominada “branco”, foi utilizado solvente etanol. O percentual de captação do radical DDPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA %)

$$AA \% = \frac{Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}}$$

Analisa-se as amostras em espectrofotômetro de absorção molecular UV-Visível em comprimento de onda de 515 nm com objetivo de avaliar a absorbância das diferentes concentrações das amostras e anotar os resultados. Depois a avaliação pode ser calculada a concentração de óleo necessária para capturar 50 % do radical livre DDPH (IC₅₀) por análise de regressão linear (CARBONARI, 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimentos do óleo da semente de *A. glabra L.*

O óleo da semente de *A. glabra L.* obteve uma coloração amarelo claro como pode ser observado na (figura 25), logo após a obtenção do óleo, foi possível calcular seu rendimento. Como foram realizadas três extrações, para melhor entendimento os dados serão mostrados na tabela 3.

Figura 25. Óleo de *Annona glabra L.*



Fonte: Autor

Tabela 3 - Rendimento obtido nas extrações realizadas

Extrações	Peso do material para a realização da extração (g)	Peso da amostra do óleo extraído (g)	Rendimento (%)
1^a	30,24	10,23	33,82
2^a	30,22	10,15	33,59
3^a	30,23	10,20	33,75
Média			33,72

Podemos observar na tabela 3, o rendimento do óleo fixo da semente de *A. glabra L.* foi de 33,72%. Não foi encontrado na literatura rendimentos de óleos da semente da espécie *A. glabra L.*

Tabela 4 – Comparação do rendimento das extrações dos óleos de sementes do gênero *Annona*.

Espécies	Rendimento (%)	Autores
<i>A. Cherimola</i>	22,4	Branco et. Al., 2010
<i>A. Sylvática</i>	20,5	Benites et al., 2015
<i>A. Muricata</i>	22,05	Fontana et.al, 1998

Segundo a tabela 3, o teor de óleo obtido neste trabalho foi de 33,72% enquanto que Branco et al.,(2010), Benites et. Al.,(2015) e Fontana et. Al., (1998) obtiveram um rendimento inferior com 22,4%, 20,5% e 22,5%, utilizando o extrator de sohxlet com solvente etanol de outras espécies de *Annonas* na tabela 4.

4.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE ANNONA GLABRA POR CROMATOGRAFIA GASOSA

A (figura 25) mostra o cromatograma das áreas de picos e tempo de retenção do padrão (suplico 37) do óleo de semente de *A. glabra L.*, a tabela 5 mostra os ácidos graxos encontrados, composição, tempo de retenção, (%) resultados e área dos picos.

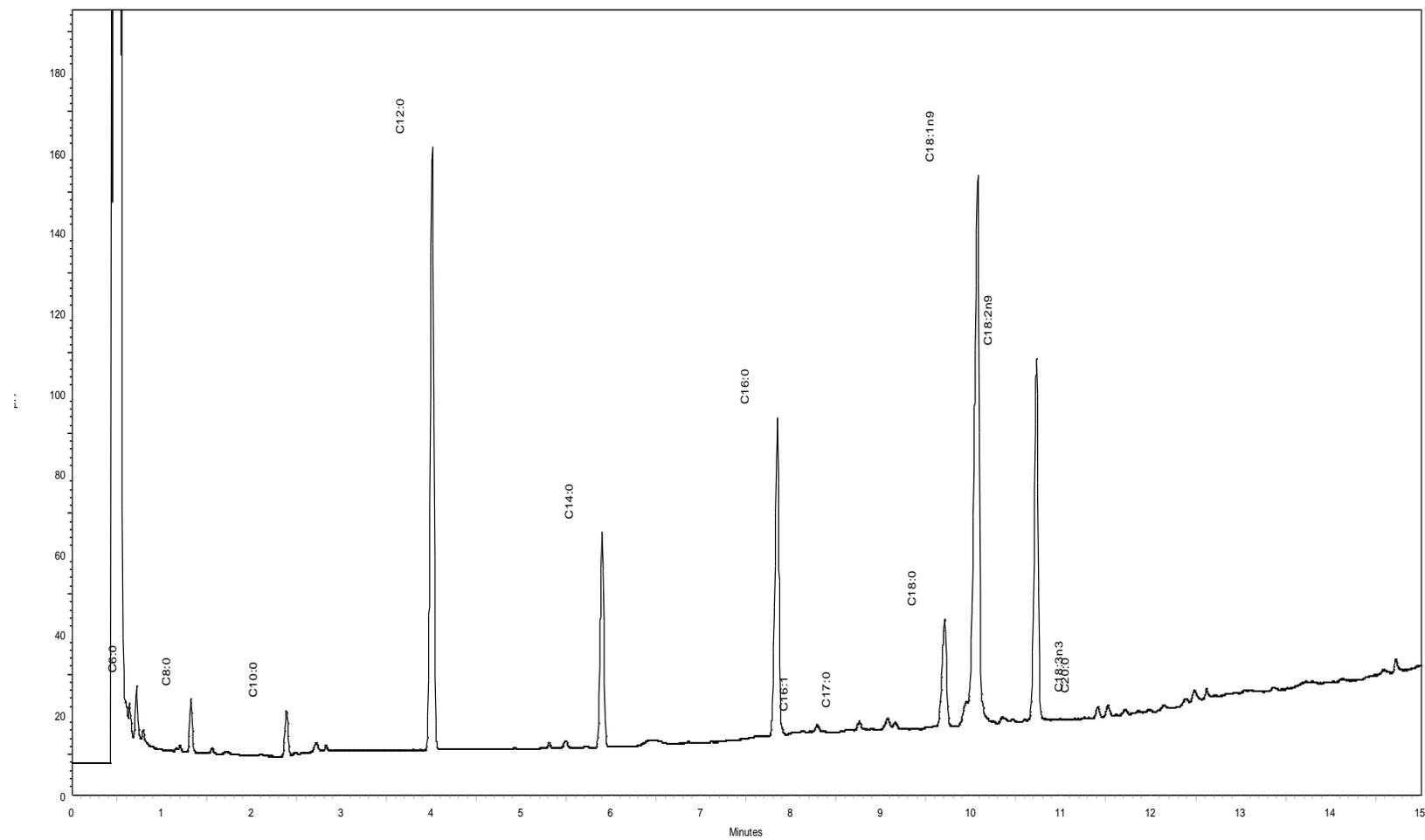
Figura 25 – Cromatograma dos ácidos graxos metilados obtidos mediante CG para óleo de *A. glabra* L.

Tabela 5 - Composição percentual dos ácidos graxos presentes na amostra *A. glabra L.*

Ácido graxo	Composição	Tempo de Retenção	Área	%
Ácido Capróico	C6:0	0.72	144047	0.98
Ácido Caprílico	C8:0	1.324	202145	1.37
Ácido Cáprico	C10:0	2.387	203952	1.39
Ácido Láurico	C12:0	4.01	3161172	21.49
Ácido Mirístico	C14:0	5.897	1132543	7.70
Ácido Palmítico	C16:0	7.849	1901469	12.92
Ácido Palmitoléico	C16:1	8.287	109775	0.75
Ácido Margárico	C17:0	8.757	55957	0.38
Ácido Esteárico	C18:0	9.709	765421	5.20
Ácido Oleico	C18:1n9	10.078	4258030	28.94
Ácido Linoleico	C18:2n9	10.732	2126338	14.45
Ácido Araquídico	C20:0	11.408	57044	0.39
Ácido Alfanolênico	C18:3n3	11.523	63998	0.43

O perfil dos ácidos graxos encontrados no óleo da semente de *A. glabra L.* está descrito na tabela, onde pode-se observar um total de 13 ácidos graxos.

O óleo da semente de *A. glabra L.* apresentou um teor de aproximadamente 52,25% de ácidos graxos saturados e 44,14% de ácidos graxos insaturados, tendo uma razão de ácidos graxos saturados/insaturados de 1,18, portanto os ácidos graxos saturados encontram-se em maior quantidade.

Os ácidos graxos insaturados encontrados em maior concentração foram o ácido oleico com 28,94% e o ácido linoleico com 14,45%. Os ácidos graxos saturados predominantes encontrados nas amostras foram ácido láurico com 21,49% e ácido palmítico com 12,92%.

ENSAIOS BIOLÓGICOS

Ensaio biológico segundo a ANVISA (1988), “são procedimentos destinados a avaliar o potencial de princípios ativos contidos nas matérias-primas e preparações farmacopéias, através do uso de reagentes biológicos tais como: Micro-organismos, Animais, Fluidos e órgãos isolados de animais”.

4.3 TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

O óleo da semente de *A. glabra L.* foi avaliado quanto ao seu potencial de inibição do desenvolvimento bacteriano “in vitro” dos seguintes microrganismos: Gram negativas *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) e *Citrobacter freundii* (ATCC8090). Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778). Os valores da porcentagem de inibição da amostra sobre os microrganismos utilizados encontram-se na tabela 6.

Tabela 6. Resultados de inibição bacteriana do óleo de *A. glabra L.*

% De inibição de crescimento								
Microorganismos	(250 µg mL ⁻¹)	(125 µg mL ⁻¹)	(62.5 µg mL ⁻¹)	(31.25 µg mL ⁻¹)	(15.62 µg mL ⁻¹)	(7.81 µg mL ⁻¹)	(3.90 µg mL ⁻¹)	(1.95 µg mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> (+)	75,98	72,02	70,43	70,22	69,02	63,17	67,16	57,97
<i>B.Cereus</i> (+)	76,13	76,05	75,72	72,55	58,15	46,77	45,34	47,17
<i>C. freudii</i> (-)	53,70	40,95	28,68	29,67	13,54	17,71	15,87	20,65
<i>S. typhimurium</i> (-)	52,33	41,42	41,92	23,53	29,53	20,95	19,31	15,77

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (MIC) (OSTROSKY, et al.,2008). Além de ser considerado o padrão para determinar o parâmetro de sensibilidade a antimicrobianos, a MIC também é

utilizada para avaliar o desempenho de todos os outros testes de sensibilidade (ANDREWS, 2001).

Em relação à atividade antibacteriana, não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores (DUARTE, 2006). Aligianis et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição – MIC- até (0,50 mg/mL); inibição moderada – MIC entre (0,6-1,50 mg/mL) e como fraca inibição – MIC acima de (1,50 mg/mL).

Através dos ensaios da atividade antimicrobiana, verificou-se atividade no óleo da semente de *A. glabra L.*, e foi comparado os resultados obtidos conforme a classificação de Duarte (2006) e Aligianis et al. (2001), onde os resultados do óleo da semente de *A. glabra L.* mostraram atividades fortes à fracas com valores de 0,02 à 2,5 mg/mL.

Ao analisar os microrganismos testados, as bactérias Gram-positivas apresentaram inibição forte com valores entre 0,02 à 0,15 mg/mL, sendo que *S. aureus* foi inibida em todas as concentrações, já *B.Cereus* apresentou inibição até a concentração 15,62 mg/mL. Já as bactérias Gram-negativas apresentaram inibição fraca com valores de 2,5 mg/mL, sendo que *C.Freudii* e *S. typhimurium* foram inibidas apenas na concentração 250 mg/mL apresentando inibição (53,70% e 52,33%) respectivamente.

GUIMARÃES et al., (2010) afirmam que em decorrência da natureza complexa da parede celular das bactérias Gram-negativas, essas são mais resistentes à ação de antibióticos, que não são capazes de atravessar efetivamente a barreira lipídica da camada externa dessas bactérias.

De acordo com a literatura a espécie *A. glabra L.* apresentou atividade antimicrobiana com o extrato da casca do caule contra *Staphylococcus pyogenes* e *Pseudomonas pyocyanae*, os organismos testados apresentaram atividade moderada (PADMAJA,1995). E segundo Galvão (2015) observou atividade com extratos das folhas contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando forte atividade antimicrobiana.

Esta espécie tem recebido atenção de pesquisadores por ser utilizada na medicina popular como inseticida e antimicrobiano (CARVALHO et al.,2001).

4.4 TESTES DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DE ACETILCOLINESTERASE.

A avaliação quantitativa da inibição de acetilcolinesterase foi realizada pelo método de Ellman. Esse método é baseado na hidrólise de acetilcolina pela acetilcolinesterase, produzindo tiocolina que reage com DTNB, originando o composto 5-tio-2-nitro-benzoato, que apresenta coloração amarela.

A avaliação da atividade anticolinesterásica foi observada o potencial inibidor no óleo da semente de *A. glabra L.*, apresentando ($94,78 \pm 2,61$) de inibição.

Extratos vegetais que apresentam atividades de inibição maiores que 50% são descritos como potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase, e extratos com atividade de inibição entre 15 e 50% são descritos como de atividade baixa a moderada. Entretanto, atividades com inibição de 15% são consideradas como resultados falso-positivos. (POLICARPO,2007:ADSERSEN,2006: INGKANINAN,2003: TREVISAN,2003).

O óleo da semente *A. glabra L.* apresentou uma inibição de 94,78% onde é considerada potente inibidor, isso implica na abertura de novos estudos para isolar e caracterizar princípios ativos de acetilcolinesterase.

A pesquisa de novos compostos inibidores de Ache com uma ação prolongada, com maior potência e com menores riscos de efeitos adversos, ainda permanece com foco de diversos pesquisadores.

4.5 TESTE DE TOXICIDADE GERAL FRENTE À ARTEMIA SALINA

O bioensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, foi realizado com o óleo de *A. glabra L.*, o teste foi realizado em triplicata para todas as concentrações das amostras e para o teste branco [controle 1 (solução salina) e controle 2 (solução salina + DMSO)]. A contagem dos náuplios (tabela 7) sobreviventes foi realizada após 24 horas com auxílio de uma lupa e obtendo os seguintes resultados:

Tabela 7. Contagem dos náuplios sobreviventes.

	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		15,625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		Controle
	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
A	2	8	7	3	9	1	10	0	10	0	10	0	10	0	10
D	3	7	8	2	9	1	10	0	10	0	10	0	10	0	10
T	2	8	8	2	9	1	10	0	10	0	10	0	10	0	10
X	2,33	7,66	7,66	2,66	9	1	10	0	10	0	10	0	10	0	10

A= Amostra; D= Duplicata; T= Triplicata; X= Média; V=Vivos; M=Mortos.

Após a contagem do número de exemplares de *Artemia salina* vivos e mortos, realizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{M\%} = \frac{\text{Número de organismos mortos} \times 100}{\text{Número total de organismos no tubo}}$$

Os valores da mortalidade foram corrigidos utilizando a fórmula de Abbott, fórmula abaixo (LUCENA,2012).

$$\text{MC} = \frac{(\text{mortalidade nos frascos teste [\%]} - \text{mortalidade no frasco controle [\%]}) \times 100}{(100\% - \text{mortalidade no frasco controle [\%]})}$$

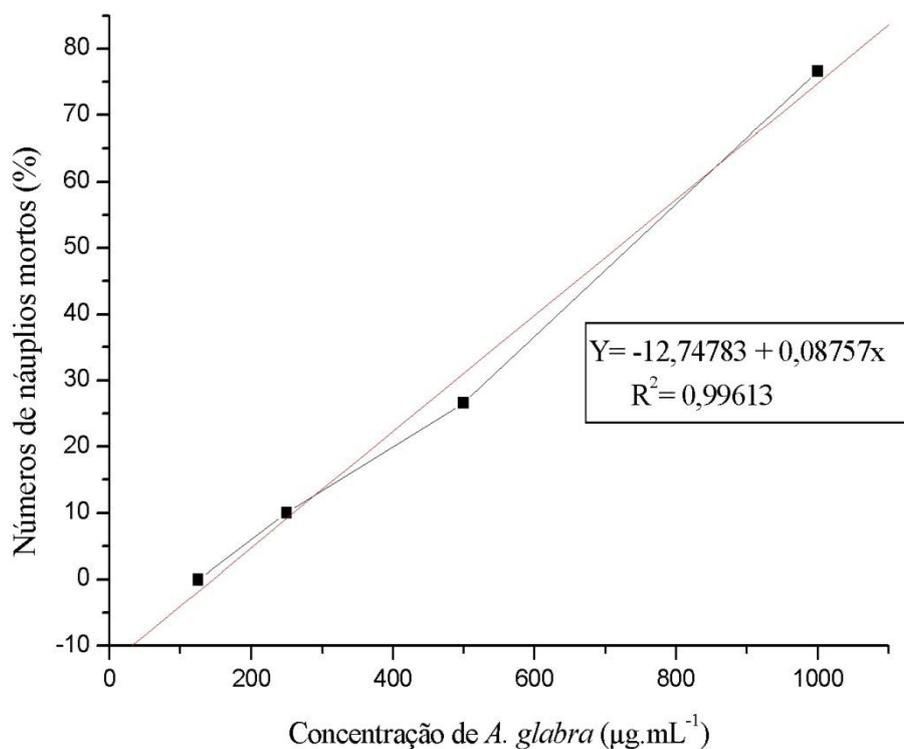
MC* = mortalidade corrigida

Após a realização dos cálculos, considerar de baixa toxicidade quando a dose letal 50% (DL₅₀) for superior a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; moderada para DL₅₀ entre 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e muito tóxico quando DL₅₀ for inferior a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LUCENA,2012). Resultados na tabela 8.

Tabela 8 – Dados da atividade frente à *Artemia salina* para o óleo de *A. glabra L.*

Concentrações	(% de mortalidade)
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	76,6
500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	26,6
250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	10
125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0
Controle 1	0
Controle 2	0

Para o óleo de *A. glabra L.* o valor obtido foi 76,6% para a concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o valor é de 26,6% de mortalidade, figura 26 .

Figura 26. Curva de atividade frente à *Artemia salina* com o óleo de *A. glabra L.*

Fonte: Autor

Utilizando a fórmula da regressão linear $Y=A+BX$, podemos calcular a DL_{50} para o óleo de *A. glabra* onde:

$Y=50$	$A= -12,74783$	$B= 0,99613$
$Y=A + BX$		
$50 = -12,74783 + 0,99613x$		
Logo temos que $X = 716,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$		

Pelas análises dos dados, pode-se verificar que o óleo de *A. glabra L.* não apresenta letalidade frente á *Artemia salina*, sendo considerada de baixa toxicidade (DL_{50} superior a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) tendo sido encontrados os valores de DL_{50} de $716,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os controles feitos com o solvente DMSO não apresentou nenhuma influência sobre os resultados, pois nenhuma larva morreu na presença de DMSO, do mesmo modo que o controle realizado com água salgada.

A literatura não relata estudos semelhantes para o óleo da semente de *A. glabra L.* No entanto Siebra (2007) realizou o teste com *Artemia salina* para o extrato de *A. glabra* encontrando um valor de $CL_{50} > 100 \mu\text{g. mL}^{-1}$, logo a amostra testada não apresentou toxicidade frente ao teste realizado.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DA A. GLABRA.

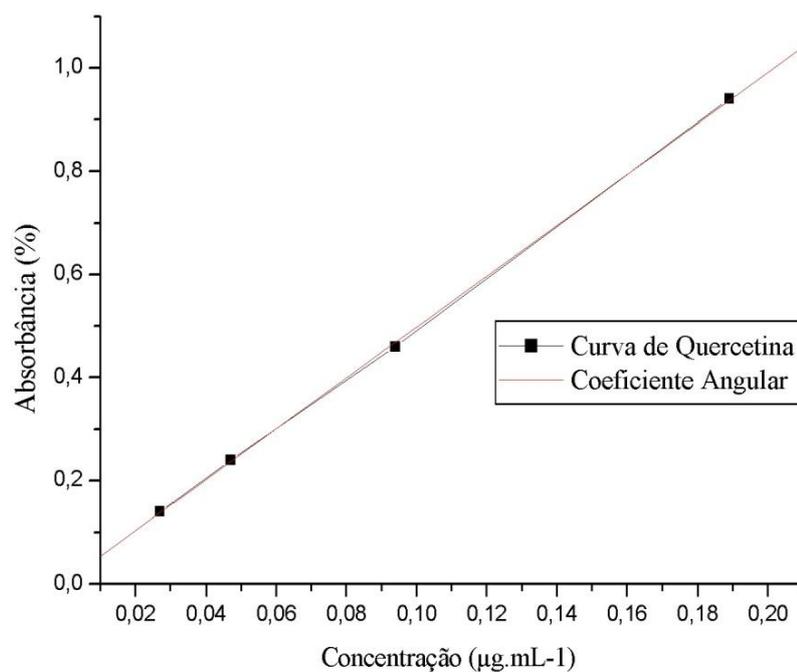
A Atividade Antioxidante é expressa por CE_{50} (concentração efetiva, que elimina 50% dos radicais livres) indica o quanto a amostra é antioxidante, isto é, quanto menor o valor da CE_{50} mais ativa é a amostra (ALPIOVEZZA et al., 2012; LOCATELLI et al., 2009). Os resultados da atividade antioxidante do óleo da semente de *A. glabra* estão expressos na tabela 9.

Tabela 9. Valores da concentração para diferentes valores de % AA

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	(AA %)
500	4,31
1500	10,23
2500	17,51
5000	30,1
10000	52,0

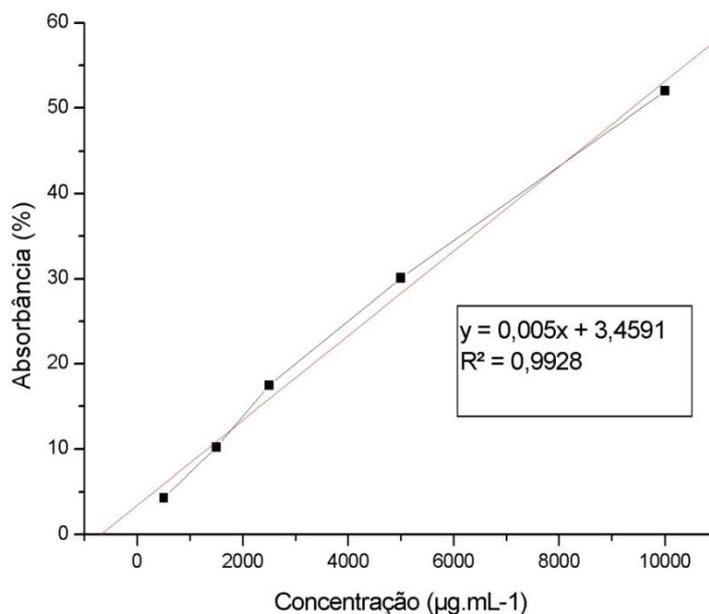
Como podemos observar, a tabela mostra os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do óleo essencial em diferentes concentrações. Os resultados demonstram que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente com a concentração. A partir das concentrações e dos valores de absorbância do óleo foi construído gráfico (figura 27).

Figura 27 – Curva da quercetina



Fonte: Autor

Figura 28. Curva de calibração de DDPH para os diferentes valores de AA %



Fonte: Autor

Foi utilizado o software Origin 6.0, o que possibilitou a determinação da equação da reta ($Y = A + BX$). Através desta equação, pode-se encontrar a concentração efetiva (CE_{50}) para cada amostra testada, (tabela 10).

Tabela 10. Valores encontrados das amostras de óleo de *A. glabra L.* e quercetina.

AMOSTRAS	A	B	Y	$CE_{50}(\mu\text{g.mL}^{-1})$	R
Óleo de <i>A. glabra L.</i>	3,4591	0,005	50	9308,13	0,9928
Quercetina	0,0049	4,9316	50	10,14	0,9997

Utilizando a fórmula da regressão linear ($Y = A + Bx$), pode-se encontrar $CE_{50} = 9308,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde apresenta um valor muito alto em comparação com o controle positivo empregado (quercetina = $10,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Então, considerando os valores do teste realizado, a amostra do óleo da semente *A. glabra* não demonstrou potencial para ser utilizado como antioxidante, ou seja, os valores encontrados para o CE_{50} é muito acima se comparado com o valor padrão da quercetina.

Silva et al. (2008) determinou a atividade antioxidante da semente de *A. glabra*, pelo método do DPPH, que se baseia na redução da molécula do radical livre DPPH (CE₅₀), e apresentou atividade moderada.

CONCLUSÃO

O presente trabalho alcançou seu objetivo, ampliando o estudo da espécie *A. glabra L.* através da composição química e atividade biológica.

O óleo da semente de *A. glabra L.* foi extraído utilizando o aparelho soxhlet, apresentou um rendimento de 33,72% foi considerado um bom rendimento comparando com a literatura do mesmo gênero, porém até o momento não foram encontrados estudos com o óleo da mesma espécie.

A análise cromatográfica da composição dos ácidos graxos foi realizada em CG, encontrando um total de 13 ácidos graxos diferentes. Os óleos apresentam altas quantidades de ácidos oleicos, láurico, linoleico e palmítico.

Os resultados da atividade antibacteriana mostraram que o óleo da semente de *A. glabra* foi mais significativo nas bactérias Gram positivas *S. aureus* e *B.Cereus* apresentando uma variação MIC (Mínima Concentração Inibitória) de 57,97% a 76,98%, já para as bactérias Gram negativa *C. freudii* e *S. typhimurium*, a variação MIC foi de 15,77% a 53,70%.

O óleo da semente de *A. glabra L.* apresenta 94,78% de inibição, considerado potente na enzima acetilcolinesterase, sendo este um valor promissor na abertura de novos estudos.

No teste de toxicidade do óleo da semente de *A. glabra L.*, não foi verificado uma grande quantidade de óbitos de *Artemia salina*, sendo considerado de baixa toxicidade (DL_{50} superior a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) tendo sido encontrados os valores de DL_{50} de $716,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

No teste antioxidante por sequestros de radicais livres, usando DPPH (1,1 - difenil-2-picril-hidrazila) foi observado que o óleo da semente de *A. glabra L.* não demonstrou potencial para ser utilizado como antioxidante com o $CE_{50} = 9308,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentando um valor muito alto em relação a quercetina.

Este trabalho contribuiu para ampliação do conhecimento científico fornecendo dados sobre a espécie *A. glabra L.* e outros trabalhos deverão ser realizados para a complementação destes estudos e aplicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18,p. 265-266, 1925.

ALBUQUERQUE, E. X.; PEREIRA, E. F.; ARACAVA, Y.; FAWCETT, W. P.; OLIVEIRA, M.; RANDALL, W. R.; ADLER, M. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.35, 13220-13225, 2006.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two Origanum species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ALPIOVEZZA, A.R; PINTO, M.S; GONÇALVES, I. D.; BARBOSA, A. P.; ARAÚJO, F.R.C.; MENDONÇA, S.; MARCUCCI, M.C.; MARQUES, L.C. Avaliação farmacognóstica da droga vegetal flores de jasmim. **Revista Fitos**, v.7, n.4, 2012.

AMARA, G.; SAADA, W.; BEN, N. S.; BEN, H. A. Cholinesterase inhibitors and depression in the elderly, **L'Encephale**, v.36, n.1, p.77-81, 2010.

ANDERSON K.L. Is bacterial resistance to antibiotic an appropriate example of evolutionary change? **Creation Research Society Quarterly Journal**, v.41, p. 318-326, 2005.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.5-16, 2001.

ANDRIOLLI, A.C. Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe (III) utilizando Artemia salina. **Health and Environment Journal**, v. 8, n. 2, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005 (D.O.U de 22/12/2000). Aprova o Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/82d8d2804a9b68849647d64600696f00/RDC_n_270.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 de junho de 2016.

BARON, E.J; FINEGOLD,S.M.Bailey & Scott's- **Diagnostic microbiology** , 8 ed The C.V Mosby Co: St. Louis,1990.

BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bioguiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de Lippia Alba (MILL.)**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, RS, p.162, 2008.

BASTOS, S.R.L. ***Croton nummularius Baill.* (Euphorbiaceae): Composição química, atividade biológica, antioxidante e toxicidade preliminar dos óleos essenciais**. Dissertação (Mestrado em bioquímica e fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, PE, p.46, 2014.

BARAHONA, M. V.; SÁNCHEZ-FOTÚAN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, v. 104, p. 469-476,1999.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n.1, p. 1-26 2005.

BERGMANN, B.R.; COSTA, S.S; MORAES, V.L.G. Brazilian medicinal plants: a rich source of immunomodulatory substances. **Natural Products Research in Brazil**, v. 49, p. 395-402, 1997.

BORGUINI, R. G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo,2006.

BRAAK.E; GRIFFING.K; ARAI.K; BOHL.J; BRATZKE.H; BRAAK.H
Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v.249, n.3, p.14-22. , 1999.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste especialmente do ceará**. Fortaleza: ESAM, p.540,1976.

BRANCO, P. C.; CASTILHO, P. C.; ROSA, M. F.; FERREIRA, J. Characterization of *Annona cherimola* mill. seed oil from Madeira island: a possible biodiesel feedstock. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 4, p. 429-436, 2010.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, p. 1359-1369, 2010.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol**, v.33, p.179-189, 2000.

CARBONARI, K.A. **Avaliação do Potencial Antioxidante** (In vitro e In vivo) e **Anti-inflamatório** de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CARVALHO, J.; E.; U.; NASCIMENTO, W.; M.; O.; MULLER, C.; H. Tolerância de sementes de Araticum-do-brejo (*Annona glabra*) ao dessecamento e ao congelamento. **Rev, Bras. Frutic.** v. 23, n. I, p. 179-182, abril 2001.

CAVALCANTI, M. T.; BORA, P.S; CARVAJAL, J. C. L.; FLORENTINO, E. R.; SILVA, F. L. H. Análise térmica e perfil de ácidos graxos do óleo das amêndoas de faveleira (*Cnidoscylus phyllacanthus* Pax. & K. Hoffm) com e sem espinho. **Revista Verde**, v. 7, n. 4, p. 154-162, out-dez, 2012.

CHANG, F.R.; WEI, J.L.; TENG, C.M.; WU, Y.C. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. **Phytochemistry**, v.49, n.7, p. 2015-2018, 1998.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J.M. In: *Annonaceae* (Soursop Family): Smith N. et al. (eds). Flowering Plants of the Geotropism. **New York Botanical Garden**, p.18-20, 2004.

CHEN, Y.; CHEN, J.; LI, X. Monoetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p.33-36, 2012.

CHEN, Y.; CHEN, J.; WANG, Y.; XU, S.; LI, X. Six cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* seeds. **Food Chemistry**, v. 135, p. 960–966, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora UNICAMP, p. 453, 2006.

CROAT, T. **Flora of Barro Colorado Island**. Stanford University Press: California, p.943, 1978.

CRUZ, P.E.O. **Estudos fitoquímicos e investigação das atividades antioxidantes, antimicrobiana e larvicida das cascas de *Annona salzmannii*** (Mestrado em Química) Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2011.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 14, p. 97-103, 2004.

DI MAMBRO, V. M.; MARQUELE, F. D.; FONSECA, M. J. V. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetics & Toiletries**, v. 17, n. 4, p. 74-78, 2005.

DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica**. Ed. UNESP, p. 60-65, 2002.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7, p.1-16, 2006.

EPA – U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. EPA-821-R-02-012. Office of Water . Washington DC, 2002.

FARIA, E. A.; LELES, M. I. G.; IONASHIRO, M.; ZUPPA, T. O.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, v. 27, p. 111-119, 2002.

FERREIRA, M.V.C.; PAES, V.R; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos, **Rev.med.**(São Paulo), v.87, p.272-276, 2008.

FLUMIGNAN, D.L. **Caracterização da qualidade e interpretação das propriedades físicas químicas de gasolinas C brasileiras através da cromatografia gasosa e métodos quimiométricos.** Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara- São Paulo, p.18, 2005.

FONTANA, J. D.; PASSOS, M.; BARON, M.; NOSEDA, M.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E.; VILEGAS, J.; POMÍIO, A. B.; VITALE, A.; WEBBER, A. C.; MAUL, A. A.; PERES, W. A.; FOERSTER, L. A. Selective polarity-and adsorptionguided extraction/purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. *In*: Finkelstein, M.; Davison, B. H. (Eds.). **Biotechnology for Fuels and Chemicals.** Colorado: Humana Press, p. 67-76, 1998.

GALLARDO, T; ARAGON; R.; TORMO, J.R.; BLAZQUEZ, M.A.; ZAFRA-POLO, M.C.; CORTES, D. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry, Oxford**, v.7, n.5, p.811- 816,1998.

GALVÃO, S. D. S. L. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de *Annona glabra* L.(Araticum).** Dissertação (Mestrado em Biologia)-Universidade Ceuma, São Luiz, p.82, 2015.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais.** Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, p.105, 2006.

GARCIA, C. C.; FRANCO, P. I. B. M.; ZUPPA, T. O.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; LELES, M. I. G. Thermal Stability Studies of some Cerrado Plant Oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, p. 645-648, 2007.

GEMTCHÚJNICOV, I.D. **Manual de taxonomia vegetal: Plantas de interesse econômico.** São Paulo-SP, ed. Agronômica Ceres, p.368, 1976.

GÓMEZ, M. E. D. B. **Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa.** 2003. 149 p. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos/Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2003.

GONZÁLEZ, M.E; NAVARRETE, A.; REYES, B.; CEDILLO, E.; HONG, E. Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. **Planta Médica**, v.67, n. 2, p. 136-141, 2001.

GROSSBERG, George T. Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Getting On and Staying On. **Current Therapeutic Research**, v. 64, n. 4, p. 216-235, 2003.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n.3, p.667-679,2010.

HEINRICH, M.; TEOH, H. L. Galanthamine from snowdrop – The development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 147–162, 2004.

HERNANDEZ, M.F.; FALÉ, P.L.V.; ARAÚJO, M.E.M.; SERRALHEIRO, M.L.M. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. **Food Chemistry**, v.120, p.1076-1082, 2010.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores, Ed. São Carlos: EDUFUSCAR, v.09, p. 60-61,2003.

IONITA, P. Is DPPH stable free radical a good scavenger for oxygen active species. **Chemical Papers**, v.59, n.1, p.11-16, 2005.

JACOBY G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p.120-26, 2005.

JELLINGER, K.A. Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly—an update. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 9, n.3, p. 61-70, 2006.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 13 eds. p. 286, 2002.

KIM, D. H.; MA, E.S.; SUK, K.D.; SON, J.K.; LEE, J.S.; WOO, M.H. Annonolin and annocherimolin, new cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. **Journal of Natural Products**, v.64, n.4, p. 502-506, 2001.

LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários das folhas de *Annona crasiflora* Mart. (Annonaceae)**. Dissertação em Química (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

LEÃO, S.L; **Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido nióico**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v.21, p. 2783-2813, 1982.

LEON, R.; GARCIA, A.G.; CONTELLES, J.M. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease. **Medicinal Research Reviews**, v. 33, n.1, p.139 –189, 2013.

LI, C.M.; TAN, N.H.; UM, Q.; ZENG, H.L.; HAO, X.J.; LIANG, H.L.; ZHOU, J. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. **Phytochemistry**, v.7, n.7, p.1293-1296, 1998.

LIZANA L. A.; REGINATO G. Cherimoya: Fruits of Tropical and Subtropical Origin: Composition, Properties and Uses. **Florida Science Source**, p. 131-148, 1990.

LOCATELLI, M.; GINDRO, R.; TRAVAGLIA, F.; COISSON, J.D.; RINALDI, M.; ARLORIO, M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data, **Food Chemistry**, v.114, n.3, p.889-897, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultura de plantas arbóreas no Brasil**. Ed. Plantarum, 2 ed. v.2, p. 352, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 60-63, 2002.

LUCENA, H. F. S. **Uma nova lignana e outros constituintes químicos de *Hypenia salzmanni* (Benth.) Harley (Lamiaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba/UFPB – João Pessoa, 2012.

MAAS, P. J.M.; MAAS, H.; MIRALHA, J.M.S.; JUNIKKA, L. **Flora da reserva Duck, Amazonas, Brasil: Annonaceae. Rodriguésia**, v.52, n. 80, p. 617-662, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v.25, n 3, p. 429-438,2002.

MADIGAN, M.T. **Microbiologia de Brock**, 12^a ed. São Paulo: Artmed, p.1128, 2010.

MAIA, C. N. **Análise fitoquímica e atividade antibacteriana “in vitro” de extratos de plantas do Cerrado**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, 2008.

MANTOVANELLI, L. **Atividade da fitoecdisona do ginseng brasileiro (Pafaffia paniculata) no controle da muda em Artemia salina**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia geral), Universidade de São Paulo, SP, p. 14, 2013.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm.**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

MELO, J.G.; ARAÚJO, T. A.; CASTRO, V.T.A.; CABRAL, D.L.; RODRIGUES, M.D.; NASCIMENTO, S.C. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n.12, p. 8534-8542, 2010.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., Mcl. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MINETT, T.S.C.; BERTOLUCCI, P.H.F. Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer. **Revista de Neurociências**, v. 8, p. 11-14, 2000.

MIRANDA, A.L.P.; FRAGA, C.A.M. Atividade Sequestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas. **Practical Studies for Medicinal Chemistry**. Genebra: IUPAC, 2006.

MOOTOO, B.S.; ALI, A.; KHAN, A.; REYNOLDS, W.F.; MCLEAN, S. Three novel monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.6, p. 807-811, 2000.

MORAES, M. E. A.; SANTANA, G. S. M. Aroeira do sertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas. **Funcap**, v. 3, p. 5-6, 2001.

MORETTO, E.; FETT, R. **Óleos e gorduras vegetais (processamento e análises)**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1986.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998.

MOYNA, P.; HEINZEN, H. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 435-466, 2007.

MOZOMBITE, D.M.S; **Avaliação química, físico-química e ensaio biológico do óleo da polpa de Inajá (Maximiliana maripa (Aubl.) Drud) Areaceae)** (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Roraima, Roraima, 2016.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; STAPPEN, G. V. Use the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v.144, p.453-462, 2006.

NUTRIÇÃO ANIMAL. **Resumo**, São Pedro, Brasil, 26 de novembro de 2010, p. 375-386.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Química nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OSTROSKY, E. A; MIZUMOTO, M. K; LIMA, E. L; KANEKO, T. M; NISHIKAWA, S. O; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e

determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18,n.2, p.301-307, 2008.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 48, n. 1, p. 21-24, 1995.

PATOCKA, J.; CABAL, J.; KUCA, K.; JUN, D. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. **J Appl Biomed**, v.3, p.91-99, 2005.

PRANCE, G.T. **Árvores de Manaus**. Manaus-AM.INPA. CNPq,1975.

PROTECTION, L. **Pond apple *Annona glabra* declared class 2. In Facts Sheets.** Department of Agriculture, Fisheries and Forestry Biosecurity Queensland Vol. 10, p.58,2014.

RAMALHO, V.C; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.,29, n.4, p. 755-760,2006.

RHEE, I. K.; MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R.; **Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity stainin.** Journal of Chromatography A, 915, 217, 2001.

RODRIGUES, E. ; DUARTE, A. J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 981-991, 2010.

SALDANHA, E. S. P. B.; GONZALES, E. **Enriquecimento de ácidos graxos na alimentação de poedeiras.** Pesquisa & Tecnologia, v. 9, n. 1, 2012.

SALEM Jr., N. Introduction to polyunsaturated fatty acids. **Backgrounder**, v.3, n.1, p.1-8, 1999.

SANTOS, L. A. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A. St – Hil, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 48-51, 2007.

SANTOS, L.P.; BOAVENTURA, M.A.; OLIVEIRA, A.B. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora*. **Química Nova**, v.17, n.5, p. 387-391,1994.

SANTOS, P.D.R.; MORAIS, A.A.; BRAZ-FILHO,R. Alkaloids from *Annona dioica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n.3, p. 396-400,2003.

SANTOS, R.A. **Avaliação das propriedades biológicas dos derivados sintéticos do β -sitosterol e triterpenos**. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

SCHAECHTER, M; ENGLEBERG, N. C; EISENSTEN, B. I; MEDOFF, G. *Microbiologia Mecanismos da Doença Infecciosa*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SIEBRA, C.A. **Atividades Biológicas de *Annona glabra* Linn., Annonaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, E.S. **Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Alternanthera brasiliana* L. Kuntze**. (Mestrado em recursos naturais) Universidade Federal do Vale de São Francisco, Petrolina,PE,2013.

SKOOG, D.A.; HOOLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, p.836, 2002.

SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.; ARAÚJO, D. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n.2 , p. 351-355, 2007.

TOLMIE, G. **Árvores de Manaus**. Manaus-AM.INPA, p.312,1975.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE; C. L. **Microbiologia**. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

UJAVARI, E. C. **A história e suas epidemias**: a convivência do homem com os microrganismos. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Senac Rio; São Paulo: Editora Senac, 2003.

VEDANA, M. I. S. **Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva**. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no brasil. **Química nova**, v.24, n.1, p. 147 – 152,2001.

ZAFRA, M.C.; GONZALES, M.C.; ESTORNELL, E. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex. **Phytochemistry**, v.42, n.2, p.253-271,1996.

ZENG, K.; WU, F.E.; OBERLIAS, N.H. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the a leaves of Annona muricata. **Journal of Natural Products**, v.59, n.11, p. 1035-1042, 1996.

ZENG, L., YE, Q., OBERLIES, N. H., SHI, G., CU, Z.-M., HE, K., & MCLAUGHLIN, J. L. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. **Natural Product Reports**, v. 13, p.275, 1996.