

Bioatividade de frações de sementes e pericarpo de *Annona squamosa* (Annonaceae) em *Aspergillus nidulans*

Bioactivity of seeds and pericarp fractions of sugar apple *Annona squamosa* (Annonaceae) in *Aspergillus nidulans*

Daniela Granella Gomes Guidoti¹ , David Teixeira Guidoti² , Adriano Lopes Romero³ , Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha⁴ .

As plantas são amplamente utilizadas na medicina popular e apresentam os chamados constituintes bioativos, produzidos sob a forma de metabólitos secundários, capazes de desencadear efeitos farmacológico ou toxicológico no homem e nos animais. *Annona squamosa*, conhecida popularmente como fruta-do-conde, é empregada pela população na cura de doenças; possui amplo espectro nutricional e representa uma excelente fonte de diversas classes de constituintes bioativos, como alcaloides, terpenos, taninos, compostos fenólicos e acetogeninas. Apesar das atividades biológicas já descritas para essa planta, é necessária a investigação de extratos e/ou isolados a fim de verificar a genotoxicidade de extratos de frações obtidas a partir de sementes e pericarpo de *A. squamosa* na germinação de conídios de *Aspergillus nidulans*, utilizando como parâmetro a estimativa de mortos e malformados. Os resultados indicaram que a fração acetato de etila do pericarpo apresentou, em menores concentrações (2,5 e 25 µg.mL⁻¹) efeitos pró-reparo, e antiapoptótico na maior concentração (250 µg.mL⁻¹). A fração metanólica do extrato do pericarpo demonstrou efeito apoptótico, também em menores concentrações e efeito genotóxico na maior concentração. Quanto ao extrato das sementes, a fração acetato de etila também indicou ativação de apoptose em todas as concentrações, enquanto a fração metanólica apresentou efeito pró-reparo. A diversidade de bioatividades de frações dessa planta reflete a presença de inúmeras classes de metabólitos secundários que poderão atuar benéficamente na saúde humana. Portanto, o presente trabalho contribui na escolha de frações para futuro isolamento e identificação química de metabólitos com potencial medicinal.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Metabólitos secundários. Apoptose. Reparo. Planta medicinal.

Plants are used in folk medicine and contain bioactive substances which are produced as secondary metabolites and may trigger pharmacological or toxicological effects on humans and animals. *Annona squamosa*, popularly known as sugar apple, is used to cure diseases; has a broad nutritional spectrum and is an excellent source of several bioactive substances, such as alkaloids, terpenes, tannins, phenolic compounds and acetogenins. Although its several biological activities have already been described, investigation on extracts and their isolates is required to verify the genotoxicity of fraction extracts obtained from seeds and pericarps of *A. squamosa* in germinating *Aspergillus nidulans* conidia by estimating dead and malformed conidia. Results indicated that the fraction ethyl acetate of pericarp caused pro-repair effects at low concentrations (2.5 and 25 µg.mL⁻¹) and anti-apoptotic effects at a higher concentration (250 µg.mL⁻¹). The methanol fraction of pericarp extract showed an apoptotic effect at low concentration and a genotoxic effect at a high concentration. The ethyl acetate seeds extract fraction also indicated the activation of apoptosis at all concentrations, whereas the methanol fraction revealed a pro-repair effect. The diversity of bioactivities of the plant's fractions indicated classes of secondary metabolites which may be beneficial to human health. Therefore, current the study contributes towards the choice of fractions for further isolation and the chemical identification of medicinal potential metabolites.

Keywords: Bioactive compounds. Secondary metabolites. Apoptosis. Repair. Medicinal plant.

Autor Correspondente:

Daniela Granella Gomes Guidoti

E-mail:

danielaguidoti@live.com

Declaração de Interesses:

Os autores certificam que não possuem implicação comercial ou associativa que represente conflito de interesses em relação ao manuscrito.

¹ Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

² Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Ituiutaba, Minas Gerais, Brasil.

³ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

⁴ Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

INTRODUÇÃO

Microrganismos, animais e plantas representam uma abundante fonte de produtos naturais. Particularmente, as plantas são empregadas tradicionalmente como remédios para inúmeras doenças em muitas regiões do mundo, como Ásia (1), África (2) e América do Sul (3).

O efeito curativo e/ou preventivo das plantas se deve à presença de componentes bioativos responsáveis por desencadear efeitos farmacológicos ou toxicológicos no homem e nos animais (4). Esses compostos, produzidos sob a forma de metabólitos secundários, desenvolvem um papel crucial na adaptação das plantas, permitindo que as mesmas respondam aos estímulos ambientais ou se defendam da ação de patógenos, herbívoros ou competidores (5).

De acordo com as vias biossintéticas, os metabólitos secundários podem ser agrupados em alcaloides, terpenóides e compostos fenólicos (5). Uma característica marcante desses compostos é a variedade de atividades biológicas desempenhadas por eles, como antiviral (6), antiparasitária (7), antibacteriana (8), antioxidante (9) e antitumoral (10).

Annona squamosa Linn. (Annonaceae), conhecida popularmente como fruta-do-conde, possui amplo espectro nutricional por constituir uma excelente fonte de componentes bioativos (11) como alcaloides, taninos, compostos fenólicos (12,13), acetogeninas e diterpenos (14). Sua utilização na medicina popular é extensa, com utilização de raízes (15), folhas, frutos e sementes (16).

O emprego pela população de diferentes partes dessa planta como medida preventiva e/ou curativa de doenças tem se justificado pelas atividades farmacológicas descritas para diferentes estruturas de *A. squamosa* como: antipirética, antiúlcera, antisséptica (17), quimiopreventiva (18), antidiabética (19), hepatoprotetora (20), antígenotóxica (21), anti-inflamatória, analgésica (22), antimicrobiana (23-25), anti-HIV (26) e antioxidante (25,27).

O monitoramento de bioatividades de frações e compostos isolados a partir de produtos naturais é feito por meio de ensaios biológicos (28). Essa investigação é necessária, pois, metabólitos secundários, a despeito de apresentarem efeitos benéficos para o organismo, podem desencadear algum efeito nocivo, especialmente para a saúde humana (29). Os testes buscam, entre outros fatores, por agentes que possam afetar os níveis fisiológico e molecular do organismo em estudo. Devido à universalidade do código genético, se o agente causar danos ao DNA, ele tem potencial para causar danos em qualquer tipo de célula, seja animal, vegetal ou microrganismo (30).

Nesse contexto, o emprego de *Aspergillus nidulans* como sistema biológico preliminar constitui uma alternativa eficaz por se tratar de célula eucariótica com mecanismos celulares e genéticos mais complexos que *Salmonella thyphimurium* (teste de Ames), fornecendo rápida triagem das atividades biológicas de agentes (31), como já realizados por outros pesquisadores (32-38). Além disso, segundo Fenech (39), a utilização de ensaios microbiológicos para avaliação de genotoxicidade é muito comum, uma vez que são sistemas rápidos, baratos e produzem resultados valiosos.

Apesar das inúmeras atividades biológicas descritas para *A. squamosa*, trabalhos com frações de pericarpo e sementes são escassos, principalmente quanto à atividade mutagênica e/ou antimutagênica. Além disso, ensaios preliminares devem ser realizados a fim de selecionar potenciais frações para posterior isolamento químico de compostos a serem empregados nas mais diversas áreas da saúde.

De acordo com Sousa (31), ensaios com *A. nidulans* são vantajosos pelo curto período de tempo de sua realização e por apresentar sensibilidade na detecção de efeitos genéticos induzidos por agentes ambientais, seja um componente isolado ou uma mistura heterogênea, como frações complexas de plantas, contribuindo no conhecimento da atuação de diferentes substâncias sobre o material genético.

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi verificar a genotoxicidade de frações obtidas a partir de sementes e pericarpo de *A. squamosa*, em conídios de *A. nidulans* em germinação, utilizando como parâmetro a estimativa de mortos e malformados.

METODOLOGIA

Material vegetal

Frutos maduros de *A. squamosa* L. (Annonaceae), provenientes da Estância Peluma, Fazenda Jagora, Fernandópolis, São Paulo, Brasil (20°25'47.0"S 50°19'50.1"W, 403 metros de altitude), foram coletados no verão, em janeiro de 2013. O clima da região é tropical semiúmido (classificação climática de Köppen-Geiger: Aw). Material testemunho foi identificado e depositado no herbário da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil sob registro HUEM 29903.

Extração química

Cascas (pericarpo) e sementes congeladas dos frutos in natura de *A. squamosa* (8 kg e 2,3 kg, respectivamente) foram trituradas em liquidificador doméstico e submetidas à extração exaustiva com acetato de etila (EtOAc), em temperatura ambiente (28 °C) por 14 dias, seguido de filtragem. Ambos os extratos foram concentrados, separadamente, em evaporador rotativo a 50 °C, obtendo-se 59,5 e 173 g de extrato bruto (EtOAc), respectivamente. Os extratos foram particionados, separadamente, em clorofórmio para obtenção da fase CHCl₃ e extrato aquoso. As fases CHCl₃ de cada fração foram concentradas e particionadas, separadamente, entre n-hexano e metanol, rendendo ao final 12,8 g e 23,1 g de fração metanólica de cascas e sementes, respectivamente.

Análise de genotoxicidade na germinação de conídios de *Aspergillus nidulans*

A linhagem utilizada para análise de germinação foi biA1methG1 de *A. nidulans* (biA1 requisito para biotina e methG1 requisito para metionina) com conídios verdes, crescimento e esporulação normais, cedida pela Universidade de Glasgow, Escócia. O crescimento da linhagem foi feito em meio completo (MC) sólido, preparado padrão (40,41), incubada a 37 °C por cinco dias.

Concentrações das frações

As frações foram diluídas em dimetilsulfóxido 0,5% (DMSO) para obter as concentrações 2,5, 25 e 250 µg mL⁻¹. A concentração final de DMSO não afeta a viabilidade celular. A padronização das concentrações foi determinada mediante ensaios de sobrevivência da linhagem biA1methG1 de *A. nidulans* e com base nas concentrações utilizadas nos testes de atividade antiproliferativa em linhagens celulares humanas tumorais e não tumorais, adotadas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas, São Paulo - CPQBA-UNICAMP.

Suspensão de conídios e tratamentos

Foram coletados conídios de colônias de cinco dias cultivadas em MC sólido a 37°C em Tween 80 (0,01%) e filtrados em lâ de vidro. Metade do volume filtrado foi submetido à irradiação com luz UV por dez segundos (0,24 mJ/cm²). Para cada concentração de cada fração foi feito um tubo com conídios irradiados e um tubo com conídios não irradiados. Para o controle negativo, foi utilizada água destilada e conídios não irradiados, além de controle com DMSO. Para o controle positivo, foi utilizada água destilada e conídios irradiados.

Ensaio de germinação: análise de conídios mortos e malformados

As suspensões de conídios (≈500 x 10⁴ esporos mL⁻¹) irradiados e não irradiados, tratados e controles foram inoculadas em MC líquido. Em seguida, 100 µL de suspensão de cada condição foram

transferidas para lâminas de microscopia acondicionadas em câmara úmida e incubados a 37 °C por sete horas.

Após o período de incubação, três lâminas de cada condição foram analisadas em microscópio óptico com aumento final de 200x, por meio de captura de imagem (Canon EOS Rebel 3TI), com adaptador SLR/DSLR NDPL-2 (2x), para microscópio binocular.

Em cada leitura, foram analisados, randomicamente, 200 conídios e calculadas as porcentagens de conídios germinados, mortos e malformados.

Análise estatística

Os resultados do ensaio de germinação foram submetidos à comparação de médias, utilizando como referência o erro padrão da média (EPM) (42), e analisados por meio de ANOVA (one-way).

Interpretação de resultados

O ensaio de germinação dos conídios de *A. nidulans* e sua interpretação foram realizados conforme Guidoti et al. (43). Neste ensaio, a estimativa de sobrevivência considera vivos, os conídios em botão e germinados; e mortos, apenas os conídios dormentes e embebidos; a estimativa de malformados, considera os conídios com morfologia e crescimento anormal do segundo tubo de germinação, conforme exemplos mostrados na Figura 1.

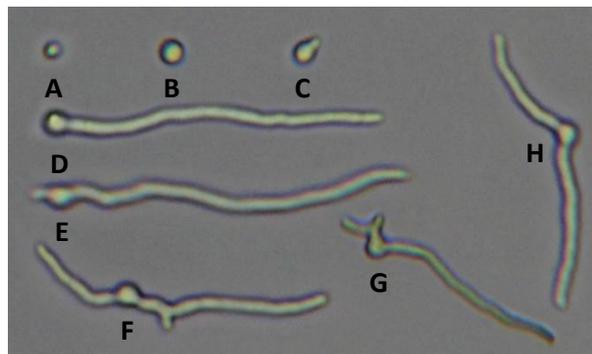


Figura 1 - Fases da germinação de conídios de *A. nidulans* e morfologia de malformados. Aumento de 100x com adaptador SLR/DSLR NDPL-2 (2x). A. Dormente; B. Embebido; C. Botão; D e E. Germinados; F, G e H. Malformados. Fonte: Guidoti et al. (43).

A interpretação dos resultados da análise de germinação de conídios de *A. nidulans* leva em consideração duas situações: (1) análise na ausência de irradiação UV para mutação espontânea e (2) análise na presença de irradiação UV para mutação induzida. Os resultados podem ser interpretados conforme possibilidades mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Interpretação dos resultados da análise de germinação de conídios de *Aspergillus nidulans*, conforme Guidoti et al. (43).

Resultado Observado	Indicação
↑ n.º mortos e mantém n.º de malformados	Substância citotóxica
↑ n.º mortos e ↑ n.º de malformados	Substância citogenotóxica
↑ n.º mortos e ↓ n.º de malformados	Substância pró-apoptótica
↓ n.º mortos e ↑ n.º de malformados	Substância anti-apoptótica
↓ n.º mortos e ↓ n.º de malformados	Substância pró-reparo

↑ = aumenta; ↓ = diminui.

A análise de conídios irradiados permite as mesmas conclusões quanto à citotoxicidade e genotoxicidade como descrito acima, desde que se compare o grupo tratado irradiado com o grupo controle positivo, também irradiado.

A proteção da substância-teste é evidenciada de duas formas: (1) no grupo não irradiado, comparado com o controle negativo, mostrando proteção pró-reparo ou pró-apoptose em relação à mutação espontânea; (2) no grupo irradiado, comparado com o controle positivo, mostrando proteção pró-reparo ou pró-apoptose em relação à mutação induzida pela luz UV. Assim, se os valores médios de sobrevivência do tratamento forem maiores que os do respectivo controle e os valores de malformados forem menores, a proteção indica pró-reparo. Se a sobrevivência do tratamento for menor que a do controle e os valores de malformados forem menores que os do controle a proteção indica pró-apoptose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após sete horas de exposição às frações acetato de etila e metanólica do pericarpo, foram realizadas a análise de cada condição de tratamento com auxílio de captura de imagem e calculadas as porcentagens de conídios mortos e malformados, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Porcentagem de conídios mortos e malformados de *Aspergillus nidulans* irradiados e não irradiados com UV (média \pm EPM), seguido de tratamento com as diferentes concentrações das frações acetato de etila e metanólica do pericarpo de *Annona squamosa*.

Concentração da fração acetato de etila ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mortalidade \pm EPM (%)	
	não irradiado	irradiado
0	1,5 \pm 0,3	10,4 \pm 0,2
2,5	1,2 \pm 0,2	9,1* \pm 0,2
25	1,0 \pm 0,3	8,2* \pm 0,1
250	1,3 \pm 0,2	8,3* \pm 0,2
DMSO 0,5%	1,4 \pm 0,2	-
Concentração da fração	Malformação \pm EPM (%)	
	não irradiado	irradiado
0	6,9 \pm 0,5	14,5 \pm 0,2
2,5	2,6* \pm 0,1	5,8* \pm 0,1
25	5,1* \pm 0,2	8,4* \pm 0,4
250	14,5* \pm 0,4	15,5 \pm 0,4
DMSO 0,5%	6,8 \pm 0,6	-
Concentração da fração	Mortalidade \pm EPM (%)	
	não irradiado	irradiado
0	0,8 \pm 0,2	6,4 \pm 0,6
2,5	0,6 \pm 0,1	6,2 \pm 0,4
25	1,3 \pm 0,2	7,9 \pm 0,4
250	2,9* \pm 0,6	8,2 \pm 0,4
DMSO 0,5%	0,8 \pm 0,2	-
Concentração da fração	Malformação \pm EPM (%)	
	não irradiado	irradiado
0	7,1 \pm 0,3	16,2 \pm 0,6
2,5	5,3* \pm 0,3	9,7* \pm 0,8
25	6,4 \pm 0,2	14,1* \pm 0,7
250	45,4* \pm 1,5	41,7* \pm 2,3
DMSO 0,5%	6,5 \pm 0,3	-

*Significativamente diferente dos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$).

A análise conjunta de mortos e malformados dos grupos não irradiado e irradiado permite inferir dados referentes à morte/sobrevivência e ocorrência/proteção de danos causados pela substância teste, levando em consideração as possibilidades descritas na Tabela 1.

Foi verificado no grupo não irradiado, para a fração acetato de etila do pericarpo que houve diminuição da porcentagem de conídios mortos, enquanto no grupo irradiado essa diminuição foi acentuadamente maior, estatisticamente significativa em todas as concentrações, com maior porcentagem de inibição na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em ambos os grupos (irradiado e não irradiado) (Figura 2).

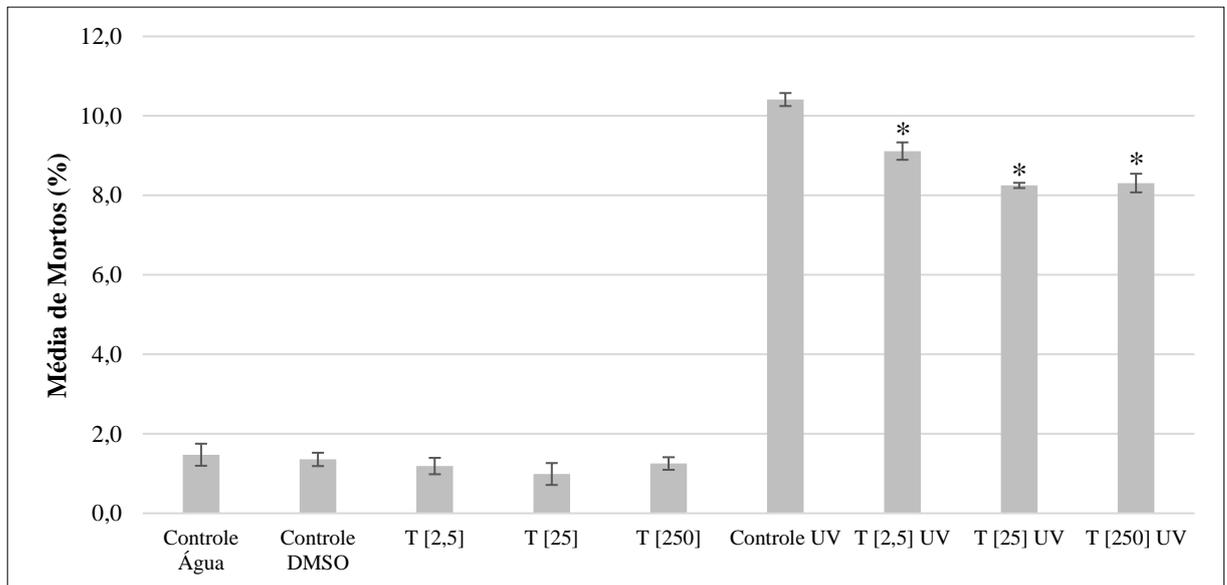


Figura 2 - Porcentagem de conídios mortos de *Aspergillus nidulans*, irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com diferentes concentrações da fração acetato de etila do pericarpo de *Annona squamosa*. *Significativamente diferente dos seus respectivos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$). T: tratamento; UV: ultravioleta; 2,5 microgramas; 25 microgramas; 250 microgramas.

Quanto à porcentagem de malformados, verifica-se que tanto no grupo não irradiado quanto irradiado houve acentuada diminuição nas concentrações de 2,5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, estatisticamente significativo para ambos. No entanto, na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, observa-se o efeito contrário, um aumento significativo de malformados em ambos os grupos, sendo equivalente ao controle positivo, com luz ultravioleta (Figura 3).

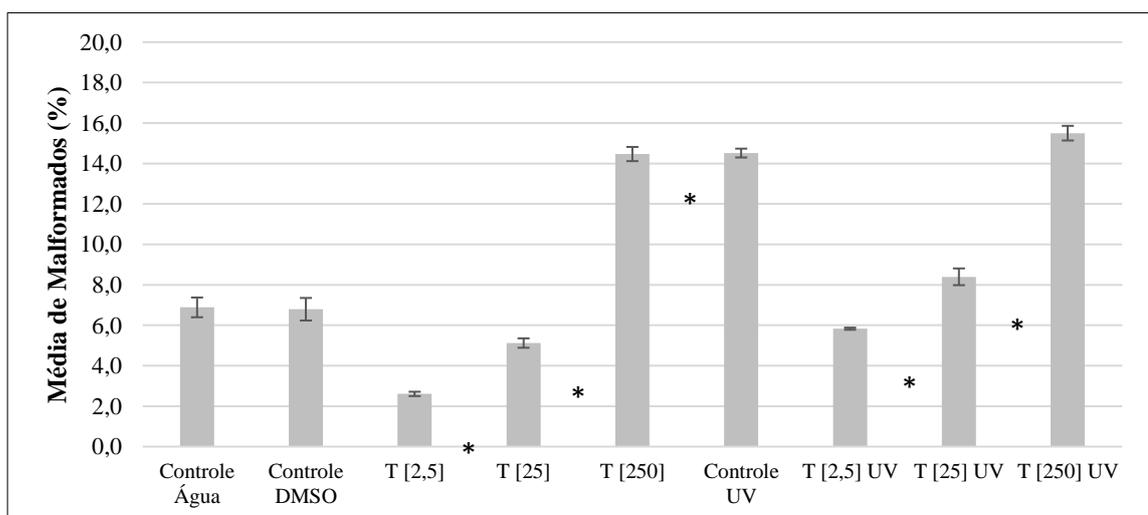


Figura 3 - Porcentagem de conídios malformados de *Aspergillus nidulans*, irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com diferentes concentrações da fração acetato de etila do pericarpo de *Annona squamosa*. *Significativamente diferente dos seus respectivos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$). T: tratamento; UV: ultravioleta; 2,5 microgramas; 25 microgramas; 250 microgramas.

Por outro lado, a fração metanólica do pericarpo levou ao aumento na porcentagem de conídios mortos (Figura 4). Apesar de estatisticamente significativo apenas no grupo não irradiado na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, verifica-se que o aumento ocorreu de forma dose dependente.

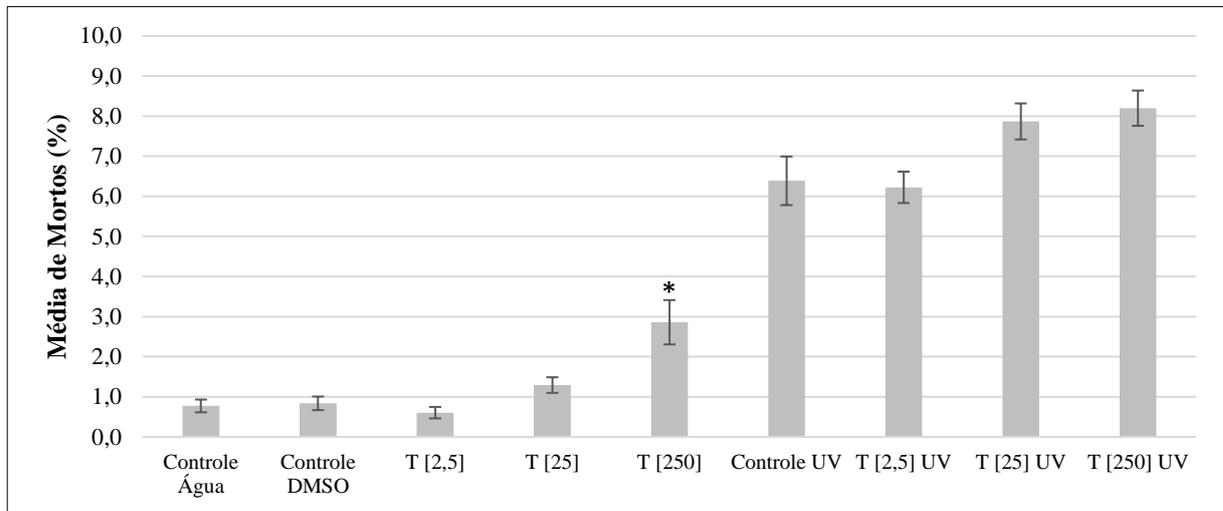


Figura 4 - Porcentagem de conídios mortos de *Aspergillus nidulans*, irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com diferentes concentrações da metanólica do pericarpo de *Annona squamosa*. *Significativamente diferente dos seus respectivos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$). T: tratamento; UV: ultravioleta; 2,5 microgramas; 25 microgramas; 250 microgramas.

A porcentagem de malformados, nas concentrações de 2,5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diminuiu em relação aos seus respectivos controles (Figura 5). No entanto, na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, houve também um aumento significativo de malformados, de forma semelhante ao ocorrido para a fração acetato de etila. Porém, na fração metanólica, a porcentagem de conídios mortos aumentou, diferentemente do que ocorreu na fração acetato de etila.

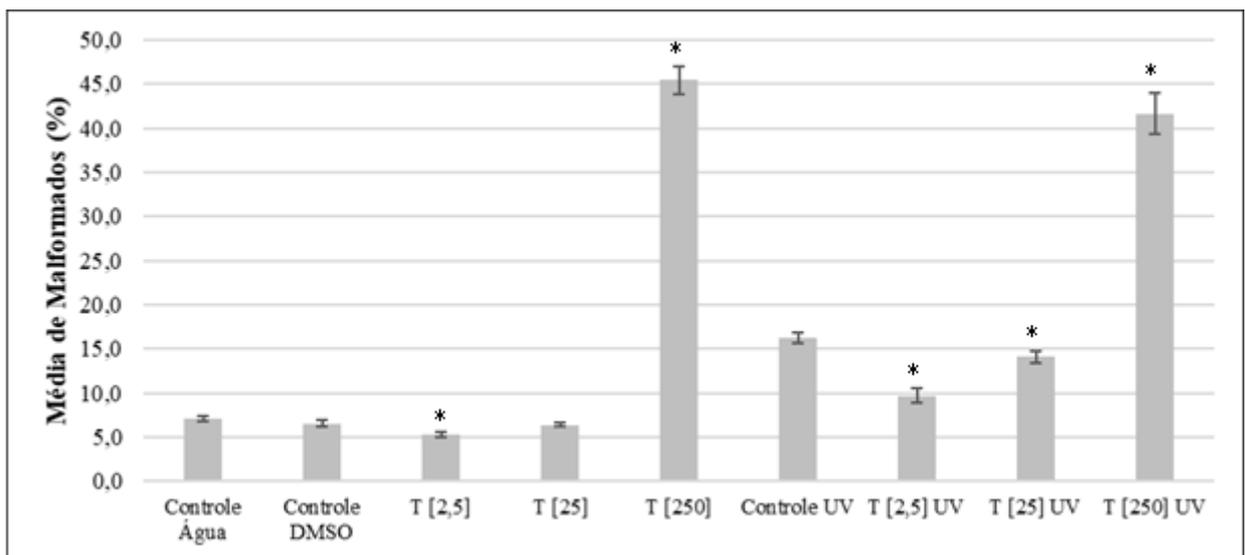


Figura 5 - Porcentagem de conídios malformados de *Aspergillus nidulans*, irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com diferentes concentrações da fração metanólica do pericarpo de *Annona squamosa*. *Significativamente diferente dos seus respectivos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$). T: tratamento; UV: ultravioleta; 2,5 microgramas; 25 microgramas; 250 microgramas.

A fração acetato de etila compreende um extrato bruto inicial, e por isso, contém uma mistura de muitos compostos bioativos que podem estar em quantidades diferentes, tornando sua bioatividade mais ou menos evidente. Por outro lado, a fração metanólica, mais purificada, pode conter compostos que estavam presentes na fração acetato de etila e não foram isolados na fração n-hexânica (dados não apresentados).

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam para o modo de ação dos componentes dessas frações. Alguns componentes da fração acetato de etila do pericarpo podem estar atuando de forma pró-reparo (nas menores concentrações 2,5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), uma vez que houve concomitante diminuição na porcentagem de conídios mortos e malformados nos dois grupos (não irradiado e irradiado). Por outro lado, na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, outros componentes da fração podem estar atuando de forma antiapoptótica, ou seja, impedindo a ocorrência de apoptose, pois a porcentagem de conídios malformados se apresentou elevada.

Nas menores concentrações da fração metanólica do pericarpo (2,5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), há um indicativo de indução de apoptose, isso porque nessas concentrações, houve aumento de conídios mortos com consequente diminuição de conídios malformados, o que significa que os conídios com mutações que não foram corrigidas, foram eliminados. No entanto, na maior concentração (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), devido ao aumento de conídios mortos e malformados, em ambos os grupos, há indicativo de que a fração metanólica do pericarpo possa conter compostos genotóxicos. Dessa forma, o efeito pró-apoptótico não pôde ser observado isoladamente.

A indicação de apoptose, no presente trabalho, foi observada também em trabalho anterior (44), em que foi isolado o ácido caurenóico a partir da fração metanólica do pericarpo de *A. squamosa*. Os autores verificaram que em todas as concentrações testadas (2,5, 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), houve aumento da porcentagem de conídios mortos e diminuição de malformados, indicando o possível mecanismo de ação por ativação de vias apoptóticas. Tal indicação foi constatada por Lizarte-Neto et al. (45), pois os resultados mostraram que o ácido caurenóico induziu a apoptose em linhagens celulares U87 (glioblastoma), através da supressão de genes antiapoptóticos (c-FLIP e miR-21) e expressão de genes apoptóticos (Fas, caspase-3 e caspase-8). Cavalcanti et al. (46) também demonstraram que o ácido caurenóico poderia interagir ou intercalar-se ao DNA, além de inibir a atividade da topoisomerase I e, conduzir a célula à apoptose.

Diversas classes de metabólitos secundários são encontradas em membros de Annonaceae (47). A presença de classes diferentes de compostos bioativos em frações de produtos naturais, torna esses extratos complexos e passíveis de diferentes bioatividades, que se complementam ou atuam de forma contrastante, como o observado nas frações acetato de etila e metanólica do pericarpo do presente trabalho. Esse duplo comportamento tem sido descrito, inclusive, para extratos de outras plantas como *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae). O pré-tratamento com extrato metanólico do caule da planta apresentou, em menor concentração, efeito protetor. Por outro lado, em concentrações maiores foi observado efeito genotóxico (48).

Resultados semelhantes já foram obtidos (49) para os extratos aquoso e etanólico do caule de *Himantanthus articulatus* (Apocynaceae). Os extratos apresentaram, em doses elevadas, aumento significativo de micronúcleos, enquanto em doses inferiores, esses mesmos extratos mostraram efeitos protetores contra danos no DNA induzidos por peróxido de hidrogênio, indicando significativo efeito antígeno-tóxico.

De forma similar, após sete horas de exposição às frações acetato de etila e metanólica de sementes, foram realizadas a análise de cada condição de tratamento e calculadas as porcentagens de conídios mortos e malformados, conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Porcentagem de conídios mortos e malformados de *Aspergillus nidulans* irradiados e não irradiados com UV (média±EPM), seguido de tratamento com as diferentes concentrações das frações acetato de etila e metanólica de sementes de *Annona squamosa*.

Concentração da fração acetato de etila ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mortalidade \pm EPM (%)	
	não irradiado	irradiado
0	0,8 \pm 0,1	15,9 \pm 0,5
2,5	1,7* \pm 0,2	18,8* \pm 0,6
25	2,1* \pm 0,0	20,5* \pm 0,6
250	1,4* \pm 0,1	18,5* \pm 0,7
DMSO 0,5%	0,7 \pm 0,1	-

Concentração da fração acetato de etila ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Malformação \pm EPM (%)	
	não irradiado	irradiado
0	6,1 \pm 0,8	12,0 \pm 0,3
2,5	4,7 \pm 0,3	6,1* \pm 0,3
25	3,4* \pm 0,1	4,1* \pm 0,3
250	5,3 \pm 0,4	6,4* \pm 0,4
DMSO 0,5%	6,0 \pm 0,2	-

Concentração da fração metanólica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mortalidade \pm EPM (%)	
	não irradiado	irradiado
0	1,2 \pm 0,1	15,4 \pm 0,2
2,5	0,9 \pm 0,2	8,6* \pm 0,8
25	0,8 \pm 0,2	7,3* \pm 0,2
250	1,0 \pm 0,3	11,5* \pm 0,6
DMSO 0,5%	1,0 \pm 0,1	-

Concentração da fração metanólica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Malformação \pm EPM (%)	
	não irradiado	irradiado
0	5,9 \pm 0,5	13,5 \pm 0,2
2,5	4,4 \pm 0,3	4,0* \pm 0,2
25	3,1* \pm 0,2	2,3* \pm 0,3
250	1,6* \pm 0,2	0,9* \pm 0,2
DMSO 0,5%	5,9 \pm 0,2	-

*Significativamente diferente dos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$).

Foi verificado aumento na porcentagem de conídios mortos nos grupos não irradiado e irradiado, estatisticamente significativo em todas as concentrações, em relação aos respectivos controles. A maior porcentagem de aumento foi verificada para a concentração 25 µg mL⁻¹, conforme Figura 6.

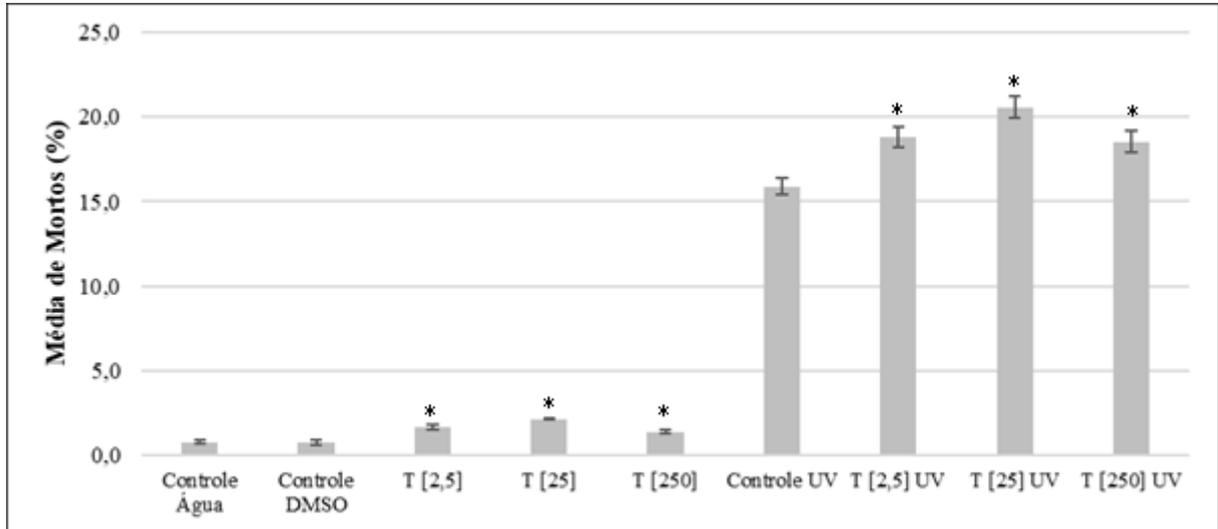


Figura 6 - Porcentagem de conídios mortos de *Aspergillus nidulans*, irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com diferentes concentrações da fração acetato de etila de sementes de *Annona squamosa*. *Significativamente diferente dos seus respectivos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$). T: tratamento; UV: ultravioleta; 2,5 microgramas; 25 microgramas; 250 microgramas.

Por outro lado, a porcentagem de conídios malformados diminuiu, em todas as concentrações, em ambos os grupos. A diminuição mais expressiva foi observada também na concentração de 25 µg mL⁻¹ do grupo irradiado (Figura 7).

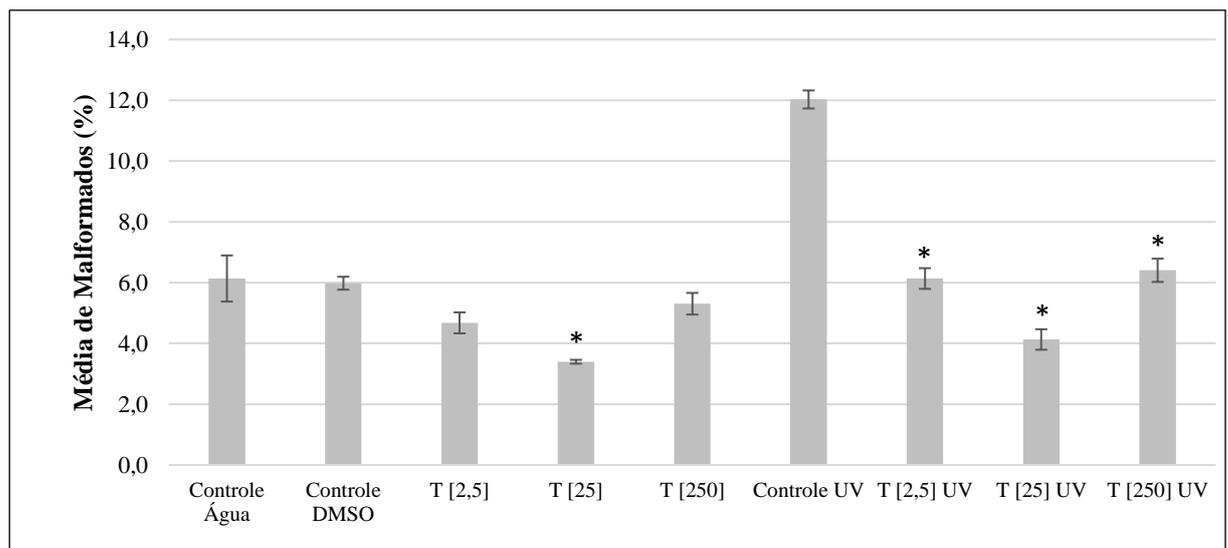


Figura 7 - Porcentagem de conídios malformados de *Aspergillus nidulans*, irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com diferentes concentrações da fração acetato de etila de sementes de *Annona squamosa*. *Significativamente diferente dos seus respectivos (ANOVA one-way, $p < 0,05$). T: tratamento; UV: ultravioleta; 2,5 microgramas; 25 microgramas; 250 microgramas.

A fração metanólica de sementes, por outro lado, diminuiu a porcentagem de conídios mortos em ambos os grupos com valores estatisticamente significativos para todas as concentrações do grupo irradiado (Figura 8).

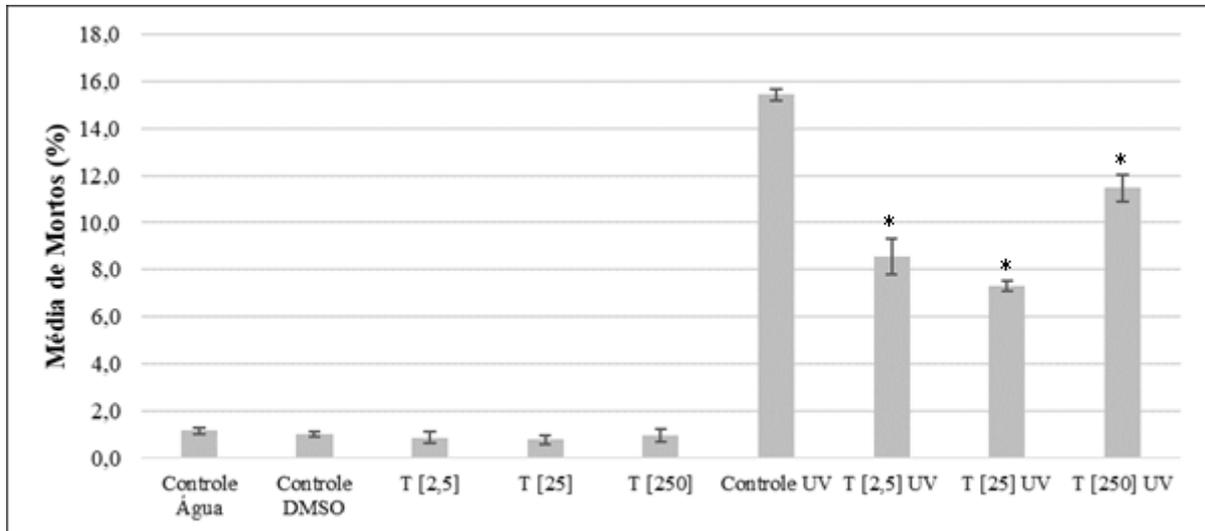


Figura 8 - Porcentagem de conídios mortos de *Aspergillus nidulans*, irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com diferentes concentrações da fração metanólica de sementes de *Annona squamosa*. *Significativamente diferente dos seus respectivos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$). T: tratamento; UV: ultravioleta; 2,5 microgramas; 25 microgramas; 250 microgramas.

A maior diminuição ocorreu em 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A porcentagem de conídios malformados também diminuiu, de forma dose dependente, em ambos os grupos. Nesse caso, a maior diminuição foi observada na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 9).

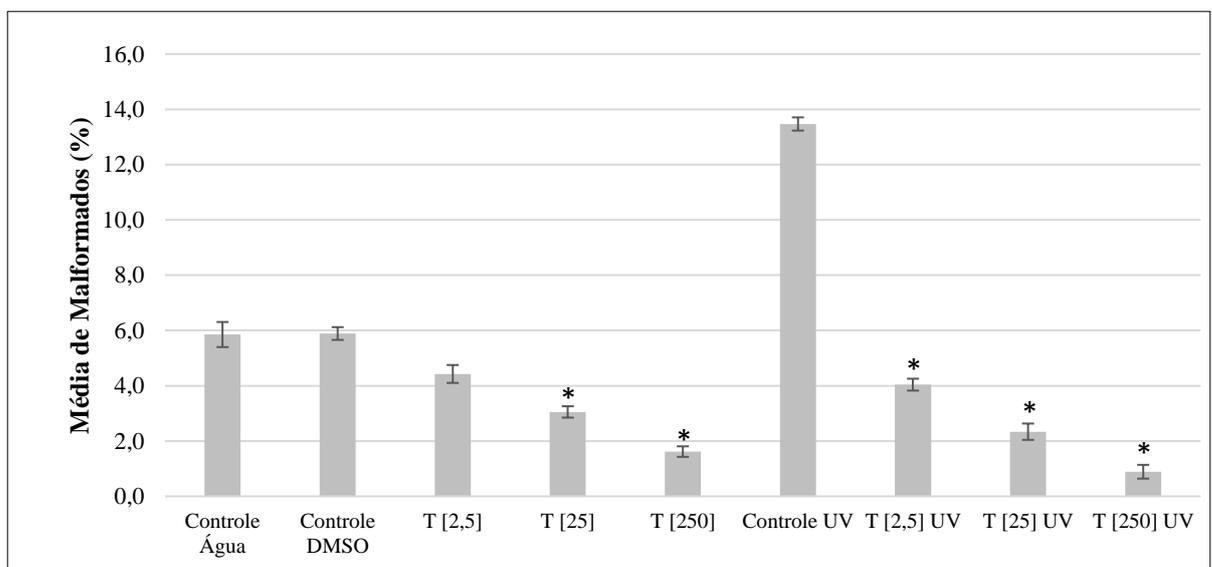


Figura 9 - Porcentagem de conídios malformados de *Aspergillus nidulans*, irradiados e não irradiados com UV, seguido de tratamento com diferentes concentrações da fração metanólica de sementes de *Annona squamosa*. *Significativamente diferente dos seus respectivos controles (ANOVA one-way, $p < 0,05$). T: tratamento; UV: ultravioleta; 2,5 microgramas; 25 microgramas; 250 microgramas.

Os resultados da fração acetato de etila de sementes indicam que há compostos atuando majoritariamente como pró-apoptóticos, uma vez que houve concomitante aumento de conídios mortos e diminuição de conídios malformados. Essa atividade pode estar relacionada com a presença de acetogeninas na fração acetato de etila de sementes, conforme mostrado por Yang et al. (50). Nesse trabalho, os autores demonstraram in vivo e in vitro que as acetogeninas isoladas dessa fração induziram apoptose, de forma dose dependente e aumentou a atividade das caspases 3, 8 e 9. Embora as acetogeninas exibam potente atividade contra células tumorais, o seu efeito sobre o crescimento de células não tumorais é mínimo. Assim, essas substâncias podem ser empregadas de forma seletiva sobre as células tumorais (51) e atuar como protetora de células normais, conforme demonstrado anteriormente (52), onde a acetogenina bulatacina, também presente em sementes de *Annona squamosa* (51), atuou inibindo seletivamente a NADH oxireductase da membrana plasmática de linhagens de células HeLa (carcinoma cervical humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana), deixando a NADH oxireductase da membrana plasmática de células de fígado (em ratos) ilesas.

Além de acetogeninas, outras classes de compostos bioativos também podem estar atuando, de forma sinérgica com as acetogeninas, como por exemplo o diterpeno caurânico isolado e identificado a partir do pericarpo (53), que por meio de ensaio bioguiado, constatou-se a presença desse composto na fração, posteriormente identificado como ácido caurenico, que induziu apoptose em linhagens HeLa e DLA.

A fração metanólica de sementes, por outro lado, pode estar atuando pela ativação de mecanismos de reparo, uma vez que houve concomitante diminuição da porcentagem de conídios mortos e malformados nos dois grupos (não irradiado e irradiado). Portanto, os compostos responsáveis por essa bioatividade, que estavam presentes inicialmente no extrato bruto inicial (acetato de etila), poderiam estar colaborando com a diminuição da porcentagem de conídios malformados demonstrado pela fração acetato de etila de sementes.

A. squamosa possui ampla gama de compostos bioativos que podem apresentar as mais diversas atividades biológicas, como a pró-reparo. Essa bioatividade pode estar ocorrendo, em parte, pela presença de compostos fenólicos como flavonoides, que atuam como antioxidantes. Os antioxidantes são capazes de impedir a ação dos radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, evitando sua ação sobre o DNA, mantendo a integridade celular (54). Além disso, podem atuar no reparo das lesões causadas pelos radicais livres, processo esse relacionado à remoção de danos do DNA e reconstituição das membranas celulares danificadas podendo até mesmo levar ao aumento da síntese de enzimas antioxidantes (55).

Esses antioxidantes, exógenos, são muito diversos, sendo frequentemente encontrados em fontes vegetais (56), como na fração metanólica de sementes (11). A proteção oferecida pelos antioxidantes é fundamental, uma vez que danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (57).

CONCLUSÃO

Considerando os tratamentos com frações de pericarpo e sementes de *A. squamosa* sobre conídios da linhagem bia1methG1 de *A. nidulans* em germinação ficou evidente que as frações possuem considerável bioatividade, em diferentes concentrações.

A fração acetato de etila do pericarpo demonstrou, em menores concentrações (2,5 e 25 µg mL⁻¹), efeito pró-reparo e antiapoptótico na maior concentração (250 µg mL⁻¹). Por outro lado, a fração

metanólica do pericarpo demonstrou efeito apoptótico, nas menores concentrações (2,5 e 25 µg mL⁻¹), e efeito genotóxico na maior concentração (250 µg mL⁻¹). Esse duplo comportamento, pode ser devido à presença de inúmeras classes de metabólitos secundários que estejam presentes em maior ou menor concentração, sobressaindo ou não sua bioatividade.

A fração acetato de etila das sementes, por outro lado, atuou de forma pró-apoptótica, em todas as concentrações, possivelmente, pela presença de acetogeninas que ativam o mecanismo de morte celular programada. De forma similar às menores concentrações da fração acetato de etila do pericarpo, a fração metanólica das sementes apresentou efeito pró-reparo, em todas as concentrações. Esse efeito, pode ser devido à presença de antioxidantes, como flavonoides, que atuam sobre os radicais livres, evitando ou corrigindo sua ação sobre o DNA.

Verifica-se, portanto, que frações do pericarpo e sementes de *A. squamosa* constituem uma rica fonte de compostos bioativos que reflete nas diferentes atividades farmacológicas descritas para essa planta, podendo ter múltiplas vias de ação no metabolismo celular.

Dessa forma, os resultados do presente trabalho enfatizam os dados da literatura científica quanto ao uso tradicional de *A. squamosa* no combate e/ou prevenção de doenças e colaboram na escolha de frações para *screening* fitoquímico e futuro isolamento e identificação de compostos com potencial medicinal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo financiamento; à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão, Paraná, pelo suporte técnico. Ao Dr. Renato de Mello-Silva do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, pela confirmação botânica do espécime utilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) DURAI PANDIYAN, V. AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Palyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 35-41, oct. 2006.
- (2) KHALID, H. ABDALLA, W. E.; ABDELGADIR, H.; OPATZ, T.; EFFERTH, T. Gems from traditional north-African medicine: medicinal and aromatic plants from Sudan. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 2, n. 3, p. 92-103, mar. 2012.
- (3) BOLZANI, V. S.; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAS JUNIOR, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, jul./aug. 2012.
- (4) BERNHOFT, A. A brief review on bioactive compounds in plants. In: BERNHOFT, A.A. (Ed.). **Bioactive compounds in plants** - benefits and risks for man and animals. Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters, 2010. 255p.
- (5) RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830p.
- (6) MAYER, A. M. S.; RODRIGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2003-4: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulante, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the

cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 145, n. 4, p. 553-581, may. 2007.

- (7) VEIGA-SANTOS, P.; ROCHA, K. J. P.; DOS SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; SILVA LAUTENSCHLAGER, S. O.; SUDATI, D. B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. Antitrypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia obtuse*. **Planta Medica**. v. 74, p. 122, jul. 2008.
- (8) KLADI, M.; VAGIAS, C.; STAVRI, M.; RAHMAN, M. M.; GIBBONS, S.; ROUSSIS, V. C₁₅ acetogenins with antistaphylococcal activity from red alga *Laurencia glandulifera*. **Phytochemistry Letters**. v. 1, n. 1, p. 31-36, apr. 2008.
- (9) SARMA, A.; KASHYAP, D.; SARMAH, P.; CHOUDHURY, S. S. Evaluation of antioxidant activity and nutraceutical property of *Annona squamosa* L. fruits found in Brahmaputra Valley agro-climatic condition. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5, p. 1151-1157, apr. 2015.
- (10) CHEN, Y.; XU, S. S.; CHEN, J. W.; WANG, Y.; XU, H. Q.; FAN, N. B.; LI, X. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenina compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 462-466, jul. 2012.
- (11) BHARDWAJ, A.; SATPATHY, G.; GUPTA, R. K. Preliminary screening of nutraceutical potential of *Annona squamosa*, an underutilized exotic fruit of India and its use as a valuable source in functional foods. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 2, p. 172-180, jun. 2014.
- (12) PANDEY, N.; BARVE, D. Phytochemical and pharmacological review on *Annona squamosa* (Linn.) **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 1404-1412, dec. 2011.
- (13) BIBA, V. S.; LAKSHMI, S.; DHANYA G. S.; REMANI, P. Phytochemical analysis of *Annona squamosa* seed extracts. **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 29-31, 2013.
- (14) PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M. Flora paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 281-293, apr./jun. 2004.
- (15) RAJ, D. S.; VENILLA, J. J.; AIYAVA, C.; PANNEERSELVAM. The hepatoprotective effect of alcoholic extract of *Annona squamosa* leaves on experimentally induced liver injury in swiss albino mice. **International Journal of Integrative Biology**, v. 5, n. 3, p.182-186, apr. 2009.
- (16) PARVIN, M. S.; ISLAM, M. E.; RAHMAN, M.; HAQUE, E. Toxicological evaluation of annotemoyin-1 isolated from *Annona squamosa* from long Evan's Rats. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 6, n. 18, p.1593-1596, 2003.
- (17) AKOLKAR, L. V.; KAKKAR, K. K.; CHAKRE, O. J. **Second Supplement to Glossary of Indian Medicinal Plants with Active Principles. Part I**. New Delhi: CSIR, 1992, p. 72.
- (18) SURESH, K.; MANOHARAN, S.; PANJAMURTHY, K.; KAVITHA, K. Chemopreventive and antilipidperoxidative efficiency of *Annona squamosa* bark extract. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 9, N. 14, p. 2600-2605, 2006.
- (19) KALEEM, M.; MEDHA, P.; AHMED, Q. U.; ASIF, M. A.; BANO, B. Beneficial effects of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Singapore Medical Journal**, v. 49, p. 800-804, 2008.

- (20) SALEEM, M. T. S.; CHRISTINA, A. J. M.; CHIDAMBARANATHAN, N.; RAVI, V.; GAUTHAMAN, K. Hepatoprotective activity of *Annona squamosa* Linn. on experimental animal model. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 1, p. 1-7, 2008.
- (21) SURESH, K.; MANOHARN, S.; BLESSY, D. Protective role of *Annona squamosa* Linn. bark extracts in DMBA induced genotoxicity. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 6, n. 3, p. 364-369, 2008.
- (22) CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 149-151, febr. 2010.
- (23) PADHI, L. P.; PANDA, S. K.; SATAPATHY, S. N.; DUTTA, S. K. *In vitro* evaluation of antibacterial potential of *Annona squamosa* L. and *Annona reticulata* L. from Similipal Biosphere Reserve, Orissa, India. **Journal of Agricultural Technology**, v. 7, n. 1, p. 133-142, 2011.
- (24) KOWSALYA, V.; BEHERA, P. R.; MARY, E. J.; ANUSHA, N.; BRINDHA, P. Preliminary phytochemical screening and antibacterial efficacy studies of *Annona squamosa* fruit. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, 286-288, 2014.
- (25) KALADHAR, D. S. V. G. K.; DUDDUKURI, G. R.; YARLA, N, S. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities from raw fruit peel crude extracts of *Annona squamosa* Linn. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, 1373-1380, 2015.
- (26) LISINA, K. V., PIRAMANAYAGAM, I. J. P. S. R. An *in silico* study on HIV-1 protease wild-type and mutant with inhibitors from *Annona squamosa*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, p. 1811-1818, 2014.
- (27) NANDHAKUMAR, E., INDUMATHI, P. *In vitro* antioxidant activities of methanol and aqueous extract of *Annona squamosa* (L.) fruit pulp. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, n. 3, p. 142-148, 2013.
- (28) NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.
- (29) GUAADAQUI, A.; BENAICHA, S.; ELMAJDOUB, N.; BELLAOUI, M.; HAMAL, A. What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 3, n. 3, p. 174-179, 2014.
- (30) SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre, 2003, 422p.
- (31) SOUSA, G. D.; ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, F. D.; MILLER, R. G.; ANJOAS, R. M. A.; POLI, P.; ZUCCHI, T. M. A. D. *Aspergillus nidulans* as a biological system to detect the genotoxic effects of mercury fumes on eukaryotes. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 404-413, 2009.
- (32) ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, F. D.; POLI, P.; MELO, I. S.; ZUCCHI, T. M. Short-term test adapted to detect the genotoxic effects of environmental volatile pollutants (benzene fumes) using the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 7, n. 6, p. 598-602, 2005.
- (33) MIYAMOTO, C. T.; SANT'ANNA, J. R.; FRANCO, C. C.; CASTRO-PRADO, M. A. Genotoxicity (mitotic recombination) of the cancer chemotherapeutic agents cisplatin and cytosine arabinoside in *Aspergillus nidulans*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 6, p. 1091-1095, 2007.

- (34) SALVADOR, M. J.; ZUCCHI, T. D.; SCHINOR, E. C.; DIAS, D. A.; ZUCCHI, O. L. A. D.; POLI, P.; ZUCCHI, T. M. A. D. Genotoxic potentials of natural products detected by a short-term test using diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **The Open Mycology Journal**, v. 2, p. 48-54, jul. 2008.
- (35) STOLL, L. B.; CREMONES, F. C. A.; PIRES, L. T. A.; ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, T. M. A. D. Induction of mitotic crossing-over in diploid strains of *Aspergillus nidulans* using low-dose X-rays. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 467-475, jun. 2008.
- (36) LELES, S. M.; LELES, S. M.; FACTORI, R.; ROCHA, C. L. M. S. *In situ* analysis of apoptosis in *Aspergillus nidulans* with ethidium bromide and acridine orange. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 2895-2901, 2013.
- (37) PALIOTO, G. F.; ROCHA, C. L. M. S. Avaliação da mutagenicidade de *Piper methysticum* no sistema *methG1* em *Aspergillus nidulans*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 347-351, 2013.
- (38) REIS, M. F.; Rocha, C. L. M. S. Análise citológica do efeito dos extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* sobre os ciclos de desenvolvimento de *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. **SaBios**, v. 9, p. 100, 2014.
- (39) FENECH, M. The *in vitro* Micronucleus Technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- (40) PONTECORVO, G.; ROPERT, A.; CHEMMONS, L. M.; MACDONALD, D.; BUFTON, W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.
- (41) CLUTTERBUCK, A. J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R.C. (Ed.). **Handbook of Genetics**. New York: Plenum Publishing, 1974, p. 447-510.
- (42) GRAVETTER, F. J.; WALLNAU, L. **Statistics for the Behavioral Sciences**. fourth ed. Wallingford: West Publishing Co, 1995, p. 12-28.
- (43) GUIDOTI, D. T.; GUIDOTI, D. G. G.; ROCHA, C. L. M. S. C. Vegetative development predictive parameters of mutagenesis and antimutagenesis in *Aspergillus nidulans*. **SaBios**, v. 15, n. 2, p. 16-25, mai/ago, 2020.
- (44) GUIDOTI, D. G. G.; GUIDOTI, D. T.; ROMERO, A. L.; GOIS, A. L. T.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; ROCHA, C. L. M. S. C. Kaurenolic acid from *Annona squamosa* L. exhibits antiproliferative effect on human tumor cell lines and induces apoptosis in *Aspergillus nidulans*. **Fitos**, v. 13, n. 2, p. 122-136, 2019.
- (45) LIZARTE-NETO, F. S.; TIRAPELLI, D. P. C.; AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; OLIVEIRA, F. M.; NOVAIS, P. C.; PERIA, F. M.; OLIVEIRA, H. F.; CARLOTTI JUNIOR, C. G.; TIRAPELLI, L. F. Kaurane diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 1, p. 71-78, 2013.
- (46) CAVALCANTI, B. C.; BEZERRA, D. P.; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; CÂMARA, C. A. G.; RAO, V. S.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 560-568, 2009.
- (47) SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, S. A. S. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopija langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1566-1570, 2009.

- (48) BARCELOS, G. R. M.; SHIMABUKURO, F.; MACIEL, M. M. A.; CÓLUS, M. S. Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells. **Toxicology In Vitro**, v. 21, N. 8, p. 1468-1475, 2007.
- (49) REBOUÇAS, S. O.; SILVA, J.; BERTONI, R. S.; DECKER, N.; SANTOS, M. S.; ROSSATTO, R. R.; CORRÊA, D. S.; FERRAZ, A. B. F. Assessment of the genotoxic and mutagenic properties of *Himatanthus articulatus* bark extracts used as phytotherapeutic drug in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 474-480, 2013.
- (50) YANG, R. M.; LI, W. M.; HU, W. J.; HUANG, W. H.; ZHU, C. Y.; YU, J. G.; ZHAO, X.; CAI, D. Y.; GAO, N. N. Anticancer effect of total annonaceous acetogenins on hepatocarcinoma. **The Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1-7, sept. 2014.
- (51) CHEN, Y.; CHEN, J. W.; LI, X. Cytotoxic bistetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 11, p. 2477-2481, oct. 2011.
- (52) DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Review**, v. 14, n. 2, p. 299-315, apr. 2015.
- (53) JOY, B.; REMANI, E. P. Antitumor constituents from *Annona squamosa* fruit pericarp. **Medical Chemical Research**, v. 17, n. 2-7, p. 345-355, febr. 2008.
- (54) ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 414-420, mar./abr. 2010.
- (55) LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE, M. A.; GUIMARÃES, P. L.; BATISTA, L. R.; NELSON, D. L. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 89, p. 523-528, set. 2012.
- (56) OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, apr. 2002.
- (57) POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 7, p. 9-16, 1998.

Recebido: 18 de maio de 2020

Aprovado: 12 de novembro de 2020



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.