



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**GABRIEL GUSMÃO GRISI ROCHA**

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FRAÇÕES, SUBFRAÇÕES E ANNONACINONA**  
**OBTIDOS DE SEMENTES DE *Annona muricata* L.**

**FORTALEZA-CE**

**2017**

**GABRIEL GUSMÃO GRISI ROCHA**

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FRAÇÕES, SUBFRAÇÕES E ANNONACINONA  
OBTIDOS DE SEMENTES DE *Annona muricata* L.**

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

**FORTALEZA-CE**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- R573a Rocha, Gabriel Gusmão Grisi.  
Atividade citotóxica das frações, subfrações e annonacinona obtidos de sementes de *Annona muricata* L. /  
Gabriel Gusmão Grisi Rocha. – 2017.  
91 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.
1. Acetogeninas. 2. Annonacinona. 3. Citotoxicidade. 4. *Annona muricata*. I. Título.

CDD 615.1

---

**GABRIEL GUSMÃO GRISI ROCHA**

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FRAÇÕES, SUBFRAÇÕES E ANNONACINONA  
OBTIDOS DE SEMENTES DE *Annona muricata* L.**

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof. Dr. Francisco Washington Araújo Barros Nepomuceno**  
**Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)**

**Aos meus pais, Anselmo e Cristina, família  
e amigos.**

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ser presença viva em minha vida, por me iluminar e conduzir sempre meus passos.

Aos meus pais, **Anselmo** e **Cristina**, meu porto seguro. Pelo amor e apoio incondicional para as realizações de meus sonhos.

À minha irmã, **Carolina**, por ser cúmplice e amiga.

À **Amanda Bernardo**, por todo amor, paciência, compreensão e apoio.

À minha família, primos e tios pela torcida e apoio constante.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes**, pela confiança em meu potencial e incentivo à pesquisa.

À **Adelânia Marinho**, por ser sempre tão querida e solícita.

À **Silvana Franca**, pelo carinho e suporte técnico, e sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao **Dr. Cláudio Costa dos Santos**, pelo essencial apoio e colaboração no desenvolvimento da parte química desse trabalho, pelos ensinamentos, confiança e amizade.

À **Dra. Selene Maia de Moraes**, por sua colaboração na identificação da molécula.

Ao **Dr. Edilberto Rocha Silveira**, **Dr. Kirley Marques Canuto** e **Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa** pela colaboração na elucidação estrutural da molécula.

À minha banca de qualificação, **Dr. Diego Wilke**, **Dr. Cláudio Costa** e **Dra. Maria Júlia Bezerra**, pelas valiosas ressalvas e contribuições em relação ao meu trabalho.

Aos integrantes do **Laboratório de Oncologia Experimental**, pelo convívio, parceria e contribuição com este trabalho: **Adailson**, **Bruno**, **Caio**, **Carlos**, **Cris**, **Daniel**, **Danilo**, **Igor**, **Maria**, **Maritza**, **Sarah**, **Soraya**, **Stefânio** e em especial a **Andrea**, **Cassia**, **Cláudia**, **Renan**, **Neto**, **Dayse** e **Fran** pela imensa colaboração em todos os momentos.

Ao amigo **Lucas Brito**, pela amizade, apoio e imensa ajuda nesse final do mestrado.

Aos amigos que a farmacologia me deu: **Alfredo**, **Amanda**, **Priscila**, **Alejandra**, **Lucas Nicolau**, **Lucas Carvalho**, **Pedro Everson**, **Katharine**, **Ludmila**, **Talita**, **Bianca**, **Ana Flávia** por todos os bons momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos de longa data, por todo apoio e torcida.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela ajuda indispensável em questões relacionadas à coordenação do programa de pós-graduação, em especial à **Célia** e **Laura**.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a minha formação e com a execução deste trabalho... muito obrigado!

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

**Universidade Federal do Ceará**

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**

**Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP**

**Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP**

“Life begins at the end of your comfort zone.”

(Neale Donald Walsch)

## RESUMO

### ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FRAÇÕES, SUBFRAÇÕES E ANNONACINONA OBTIDOS DE SEMENTES DE *Annona muricata* L.

A utilização de plantas medicinais tem sido evidenciada desde os primórdios para aliviar e tratar doenças e sua utilização tem crescido com o passar dos anos, constituindo uma importante fonte no arsenal terapêutico. A espécie *Annona muricata*, conhecida popularmente como gravioleira, possui ampla utilização como medicamento tradicional e estudos conduzidos com seus metabólitos secundários bioativos vêm apresentando notável atividade antitumoral ligada às acetogeninas. Nesse contexto o presente estudo objetivou o fracionamento bioguiado do extrato acetônico das sementes de *A. muricata* para prospecção de moléculas com potencial citotóxico em linhagens celulares tumorais humanas, resultando no isolamento de uma acetogenina denominada annonacinona. O estudo é pioneiro na avaliação da atividade citotóxica da molécula. Todas as frações, subfrações e annonacinona apresentaram potencial citotóxico nas linhagens tumorais testadas. A annonacinona apresentou valores de  $CI_{50}$  que variaram de 3,7  $\mu\text{M}$  a 0,19  $\mu\text{M}$  em células tumorais de cólon (SW620) e glioblastoma (SF-295), respectivamente após 72 horas de incubação. O perfil citotóxico em diferentes períodos de incubação foi realizado em células SF-295 e células de pulmão (NCI-H460). O efeito citotóxico em células SF-295 foi observado apenas após 72 horas de incubação, enquanto que em células NCI-H460, esse efeito foi observado em 48 horas com  $CI_{50}$  de 0,21  $\mu\text{M}$  e mantendo-se após 72 horas de incubação. A análise temporal da citotoxicidade da annonacinona em células NCI-H460 foi avaliada por dois ensaios distintos, MTT e SRB que apresentaram divergências nos valores, sugerindo que o ensaio do SRB seja mais efetivo para esse tipo de classe de substâncias por depender do conteúdo de proteínas sem interferência do composto. A annonacinona apresentou diminuição da densidade celular em todas as concentrações testadas em células NCI-H460 após 48 horas de incubação, embora após esse tempo de tratamento não tenha sido possível avaliar dano de DNA, progressão do ciclo celular e padrão de morte celular. Em análise sobre a proliferação e viabilidade em tempo real, a annonacinona apresentou inibição do crescimento celular nas concentrações testadas e início de declínio do índice celular após 56 horas de tratamento. Conclui-se que a acetogenina annonacinona apresenta evidente atividade citotóxica *in vitro*, com maior efeito em células NCI-H460, no entanto, outros testes devem ser realizados com tempos de tratamentos maiores para melhor avaliação da sua atividade biológica e potencial terapêutico desta molécula.

Palavras-chave: Acetogeninas, annonacinona, citotoxicidade, *Annona muricata*.

## ABSTRACT

### CYTOTOXIC ACTIVITY OF FRACTION, SUBFRACTIONS AND ANNONACINONE OBTAINED BY SEEDS OF *Annona muricata* L.

The use of medicinal plants has been evidenced since the beginning to relieve and treat diseases and its use has grown over the years, constituting an important source in the therapeutic arsenal. The species *Annona muricata*, popularly known as soursop, is widely used as a traditional drug and studies conducted with its bioactive secondary metabolites have shown remarkable antitumor activity related to acetogenins. In this context, the present study aimed the bioguided fractionation of the acetonic extract of the *A. muricata* seeds to prospect for molecules with cytotoxic potential in human tumor cell lines, resulting in the isolation of an acetogenin called annonacinone. The study is a pioneer in the evaluation of the cytotoxic activity of the molecule. All fractions, subfractions and annonacinone presented cytotoxic potential in the tumor lines tested. The annonacinone showed IC<sub>50</sub> values ranging from 3.7 μM to 0.19 μM in colon tumor cells (SW620) and glioblastoma (SF-295), respectively after 72 hours of incubation. The cytotoxic profile at different periods of incubation was performed on SF-295 cells and lung cells (NCI-H460). The cytotoxic effect on SF-295 cells was observed only after 72 hours of incubation, whereas in NCI-H460 cells, this effect was observed at 48 hours with IC<sub>50</sub> of 0.21 μM and maintained after 72 hours of incubation. The temporal analysis of the cytotoxicity of annonacinone in NCI-H460 cells was evaluated by two different assays, MTT and SRB, which showed differences in the values, suggesting that the SRB assay is more effective for this kind of substance class because it depends on the protein content without interference of the compound. Annonacinone showed a decrease in cell density at all concentrations tested on NCI-H460 cells after 48 hours of incubation, although after this time of treatment it was not possible to evaluate DNA damage, cell cycle progression and cell death pattern. In a real-time analysis of the proliferation and viability, the annonacinone showed inhibition of the cellular growth in the tested concentrations and beginning of decline of the cellular index after 56 hours of treatment. It is concluded that acetogenin annonacinone presents evident cytotoxic activity in vitro, with greater effect in NCI-H460 cells, however, other tests should be performed with longer treatment times for a better evaluation of its biological activity and therapeutic potential of this molecule.

Keywords: Acetogenins. Annonacinone. Cytotoxicity. *Annona muricata*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alterações essenciais responsáveis pelo desenvolvimento do caráter maligno nas células tumorais. ....	17
Figura 2 - Estimativa mundial de incidência de câncer por principais locais, ambos os sexos, 2012. ....	18
Figura 3 - Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma. ....	19
Figura 4 - Taxas brutas de incidência estimadas para 2016 por sexo, segundo o estado do Ceará e a capital. ....	19
Figura 5 - Gravioeira <i>Annona muricata</i> L. (A), folhas (B) e fruto (C). ....	24
Figura 6 - Fruto em corte (D) e sementes secas (E) de <i>Annona muricata</i> L. ....	24
Figura 7 - Estrutura química da uvaricina ....	27
Figura 8 - Classificação de acetogeninas anonáceas ....	28
Figura 9 - Desenho experimental. ....	33
Figura 10 - Etapas do fracionamento bioguiado pelo ensaio de citotoxicidade (MTT) do extrato acetônico de <i>A. muricata</i> . As frações em destaque apresentaram maior atividade antiproliferativa. ....	46
Figura 11 - Cromatograma analítico da fração AMSA-A (8-9) 49-57 purificada. ....	46
Figura 12 - Revelador Kedde para acetogeninas frações AMSA-A (8-9): 11-19; 20-27; 28-37; 38-40; 41-48; 49-57; 58-59. ....	50
Figura 13 - Placa de cromatografia em camada delgada. A) revelação em UV 254nm B) Revelação por vanilina. ....	51
Figura 14 - Estrutura química da annonacinona. .... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Figura 15 - Perfil do potencial antiproliferativo da annonacinona frente às linhagens SF-295 (A) e NCI-H460 (B) após 72 horas de tratamento determinado pelo método MTT. ....	54
Figura 16 - Perfil citotóxico da annonacinona frente à linhagem NCI-H460 após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) de tratamento determinado pelo método SRB. ....	57
Figura 17 - Efeito da annonacinona na viabilidade de NCI-H460 determinado pelo ensaio por exclusão de azul de Trypan após 48 horas de tratamento. ....	58
Figura 18 - Efeito da annonacinona sobre a proliferação celular das células NCI-H460, avaliado pela integridade de membrana (A) e densidade de células (B), determinada por citometria de fluxo. ....	59

Figura 19 - Efeito da annonacinona na distribuição das fases do ciclo celular da linhagem NCI-H460 após 48 horas de tratamento.....	60
Figura 20 - Efeito da annonacinona sobre a fragmentação de DNA em células NCI-H460 após 48 horas de incubação.....	61
Figura 21 - Efeito da annonacinona em células NCI-H460 sobre a externalização da fosfatidilserina avaliada por citometria de fluxo após 48 horas de tratamento.....	62
Figura 22 - Avaliação da ação da annonacinona sobre a proliferação e viabilidade em células NCI-H460 quando analisadas em tempo real pelo software xCELLigence system.....	63
Figura 23 - Espectro de análise de massa da fração AMSA-A (8-9) 49-57 .....	87
Figura 24 - Espectro de Infravermelho da fração AMSA-A (8-9) 49-57 .....	87
Figura 25 - Espectro RMN <sup>1</sup> H da fração AMSA-A (8-9) 49-57. ....	88
Figura 26 - Espectros de RMN A) <sup>13</sup> C-BB e B) <sup>13</sup> C-DEPT 135 da fração AMSA-A (8-9) 49-57. ....	88

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer. ....	22
TABELA 2 - Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de citotoxicidade MTT e SRB. ....	36
TABELA 3 - Concentração inibitória média (CI <sub>50</sub> ) avaliadas através do método do MTT Após 72 horas de incubação das frações AMSA-D, AMSA-A, AMSA-M.....	47
TABELA 4 - Avaliação da atividade citotóxica das frações AMSA-A frente a linhagens de células tumorais HCT-116 e HL-60 através do ensaio do MTT Após 72 horas de incubação.....	48
Tabela 5 - Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C-BB [125 MHz, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] do composto AMSA-A (8-9) 49-57 e da annonacinona descrito na literatura (VILA-NOVA, 2011).....	52
TABELA 6 - Potencial citotóxico da annonacinona em linhagens humanas tumoral e não-tumoral avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h de incubação. ....	53
TABELA 7 - Potencial citotóxico da annonacinona frente às linhagens SF-295 e NCI-H460 após 48 e 72 horas de incubação determinado pelo método MTT.....	55
TABELA 8 - Potencial citotóxico frente à linhagem NCI-H460 após 24, 48 e 72 horas de incubação determinado pelos métodos MTT e SRB.....	56

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

%C	Porcentagem de Crescimento
AMSA	Extrato acetônico das sementes da <i>Annona muricata</i>
AMSA – D	Fração Diclorometano do extrato acetônico de <i>Annona muricata</i>
AMSA – H	Fração Hexânica do extrato acetônico de <i>Annona muricata</i>
AMSA – M	Fração Metanólica do extrato acetônico de <i>Annona muricata</i>
AMSA –A	Fração Acetato de Etila do extrato acetônico de <i>Annona muricata</i>
AMSA-F1	Extrato acetônico das sementes da <i>Annona muricata</i> Fase 1
AMSA-F2	Extrato acetônico das sementes da <i>Annona muricata</i> Fase 2
AMSA-F3	Extrato acetônico das sementes da <i>Annona muricata</i> Fase 3
ANN	Annonacinona
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Controle Negativo
DEPT 135	<i>Distortionless Enhancement of Polarization Transfer</i> com Desacoplador 135 Graus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
E.P.M	Erro Padrão da Média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Espectrometria de Massa
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HCT116	Linhagem celular de Carcinoma Colorretal
HEPG2	Linhagem celular de Carcinoma Hepatocelular

---

---

HL 60	Linhagem celular de Leucemia Promielocítica Humana
IC95%	Intervalo de Confiança de 95%
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IV	Infravermelho
L929	Linhagem Celular de Fibroblastos Murinos
LabNOE	Laboratório Nacional de Oncologia Experimental
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NAD	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NCI-H460	Linhagem Celular de Carcinoma de Pulmão
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
OMS	Organização Mundial de Saúde
OVCAR8	Linhagem Celular de Carcinoma Ovariano
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PC-3	Linhagem celular de Adenocarcinoma de Próstata
PC-9	Linhagem celular de Adenocarcinoma de Pulmão
IP	Iodeto de propídeo
PS	Fosfatidilserina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
ROT	Rotenona
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Parrk Memorial Institute Medium</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SF 295	Linhagem celular de Glioblastoma
SNB-19	Linhagem celular de Glioblastoma
SRB	Sulforodamina B
SSC	<i>Side Scatter</i>
SW-620	Linhagem celular de Adenocarcinoma de Cólon
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
THF	Tetraidrofurânico
UV	Ultravioleta

---

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Câncer .....	15
1.2 Epidemiologia e estimativas do câncer .....	17
1.3 Estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer .....	19
1.4 Bioprospecção de produtos naturais .....	21
1.5 <i>Annona muricata</i> L. ....	23
1.6 Acetogeninas .....	26
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA .....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos específicos .....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
4.1 Material utilizado .....	32
4.2 Planejamento experimental .....	32
4.3 Material vegetal .....	33
4.4 Obtenção do extrato bruto.....	33
4.5 Isolamento e identificação das amostras.....	34
4.6 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	36
4.6.1 Linhagens celulares .....	36
4.6.2 Manutenção das linhagens celulares.....	36
4.6.3 Avaliação do efeito citotóxico pelo ensaio do MTT .....	37
4.6.4 Avaliação de citotoxicidade pelo ensaio da Sulforrodamina B (SRB).....	38
4.6.5 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do azul de Trypan. ....	40
4.7 Estudo do padrão de morte celular.....	41
4.7.1 Citometria de fluxo.....	41

4.8	Monitoramento dinâmico da proliferação e viabilidade celular em tempo real - XCelligence System.....	43
5.	RESULTADOS.....	45
5.1	Fracionamento bioguiado de AMSAF2.....	45
5.2	Elucidação estrutural e identificação química da acetogenina annonacinona presente na fração AMSA-A (8-9) 49-57.....	51
5.3	Avaliação in vitro da atividade citotóxica da annonacinona .....	53
5.4	Avaliação da viabilidade celular da linhagem NCI-H460 tratada com annonacinona pelo ensaio do azul de Trypan .....	57
5.5	Estudo do padrão de morte celular da annonacinona.....	58
5.5.1	Avaliação da integridade da membrana, da densidade das células e do ciclo celular de células NCI-H460 tratadas com annonacinona .....	58
5.5.2	Avaliação do padrão de morte celular .....	60
5.6	Avaliação da ação da annonacinona sobre a proliferação e viabilidade em células NCI-H460 por xCELLigence.....	62
6.	DISCUSSÃO.....	64
7.	CONCLUSÃO .....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO A - EQUIPAMENTOS.....	85
	ANEXO B - SOLUÇÕES E REAGENTES.....	86
	ANEXO C - CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DA ANNONACINONA PRESENTE NA FRAÇÃO AMSA-A (8-9) 49-57.....	87

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

O câncer é considerado uma doença complexa e de difícil tratamento de cunho genético e/ou epigenético, que apresenta como característica o desenvolvimento desordenado e proliferativo de células anormais pelo organismo, com tendência a autonomia e perpetuação, podendo ocasionar a invasão a partes adjacentes do corpo ou migração de células tumorais para outros órgãos (metástase), sendo esta sua principal causa de morte (PINHO, 2005; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013; KUMAR *et al.*, 2013; OMS, 2015; NCI, 2015).

São reportados mais de 100 tipos diferentes de câncer, os quais se dividem em categorias de acordo com o tecido originário da célula tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2000; PATRICK, 2009), podendo ser classificados em: carcinoma, quando sua origem provém da pele ou de tecidos que revestem ou cobrem órgãos internos, englobando os adenocarcinomas, carcinomas basocelulares, carcinomas de células escamosas e carcinomas de células transicionais; sarcoma, quando se origina de tecidos de suporte tais como ossos, cartilagens, gordura, músculo, vasos sanguíneos e outros tecidos conjuntivos; leucemia, quando se origina de células da medula óssea, provocando a formação de um grande número de células sanguíneas brancas anormais; linfoma, quando originam-se de células conhecidas como linfócitos, encontradas em todo o organismo, particularmente em glândulas linfáticas e sangue, são divididos em Hodgkin e não-Hodgkin de acordo com o tipo de célula afetada; mieloma, quando é formado a partir das células do sistema imune, principalmente na medula óssea; e do sistema nervoso central, os quais abrangem os tecidos cerebrais e a medula espinhal (NCI, 2015).

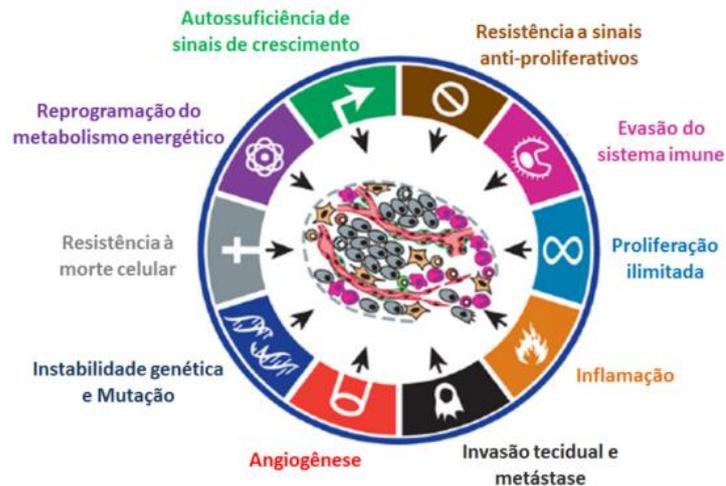
Mutações responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias podem apresentar-se de origem hereditária, embora em menores proporções, ou através de fatores externos que incluem os agentes químicos (arsênico, aflatoxina, componentes do cigarro, benzeno), físicos (radiação) e biológicos (vírus), hábitos e costumes de uma sociedade (alimentação incorreta, consumo de álcool, cigarros, sedentarismo) além do envelhecimento, visto que o aumento da idade tende à diminuição da efetividade dos mecanismos de reparo, acúmulo de mutações somáticas e suscetibilidade a alterações celulares malignas (RALPH *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2013; OMS, 2015; NCI, 2015).

A homeostase celular normal é regulada pela proliferação, interrupção do crescimento e apoptose, quando detectados danos nas células, mecanismos de controle são acionados a fim de corrigir essas falhas e minimizar a progressão maligna. Quando há um desequilíbrio nesse sistema, a alteração da função de genes regulatórios levam à proliferação descontrolada de células e ao acúmulo de anormalidades genéticas, características do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE & BERNEMAN, 2003).

Diversos genes são responsáveis pela complexidade do câncer, dentre os principais, estão os proto-oncogenes, que estimulam o crescimento celular, impedem a diferenciação e a morte celular; os genes supressores de tumor, que limitam a proliferação das células, controlando negativamente seu desenvolvimento e sobrevivência; e os genes de reparo de DNA, responsáveis por reparar possíveis danos no material genético (ROBBINS; CONTRAN; KUMAR, 1995; BELIZÁRIO 2002; VOLGELSTEIN & KINZLER, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005; VALDESPINO-GÓMEZ & VALDESPINO-CASTILLO, 2010; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; NCI, 2015).

Alterações na fisiologia celular como autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos, além de fatores endógenos como evasão da morte celular programada e do sistema imunológico, potencial replicativo ilimitado, reprogramação do metabolismo energético, angiogênese sustentada, e invasão tecidual e metástase são aspectos determinantes na imortalização das células tumorais durante o desenvolvimento da patogênese (Figura 1) (DUNN *et al.*, 2004; KROEMER & POUYSSEGUR, 2008; LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

**Figura 1.** Alterações essenciais responsáveis pelo desenvolvimento do caráter maligno nas células tumorais.



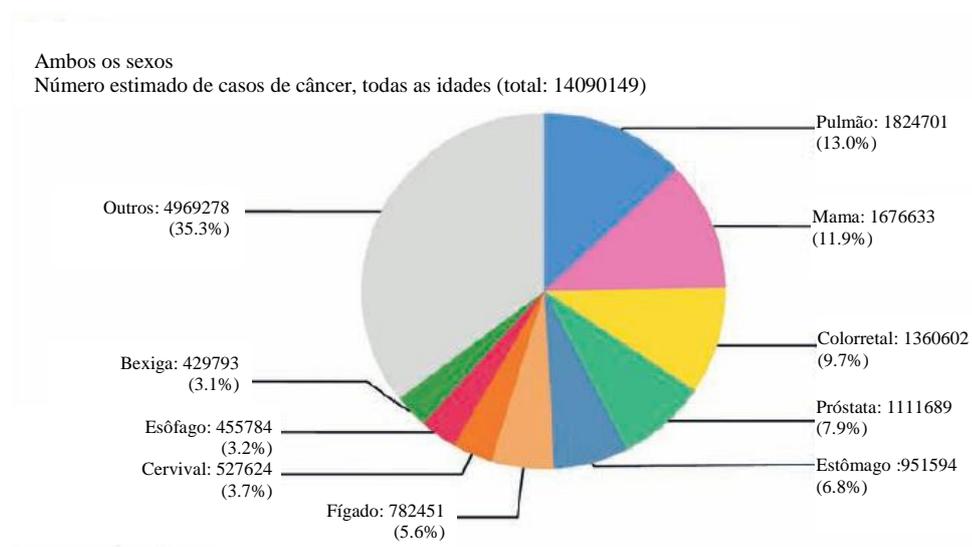
Fonte: Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011.

Além desses atributos, a percepção do câncer como um microambiente tumoral, onde interagem células geneticamente alteradas, células normais (como fibroblastos, células imunes, células endoteliais), vasos e substâncias produzidas localmente ou provenientes da irrigação sanguínea, tem se mostrado pertinentes na compreensão do complexo desenvolvimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

## 1.2 Epidemiologia e estimativas do câncer

O câncer é um problema de saúde pública mundial, com estimativa de aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes por câncer afetando populações em todos os países e regiões apresentando como os tipos mais incidentes, os cânceres de pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão) no ano de 2012 como pode-se observar na figura 2 (OMS, 2015).

**Figura 2.** Estimativa mundial de incidência de câncer por principais locais, ambos os sexos, 2012.



Fonte: Adaptado de OMS, 2014.

Prevê-se que haja um aumento de 70% de novos casos de câncer nas próximas décadas, com estimativas que até 2030 ocorrerá 27 milhões de casos incidentes de câncer, com 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas convivendo com esta doença, sendo os países de baixa e média renda os maiores acometidos (OMS, 2015).

A estimativa para o Brasil no biênio 2016-2017 aponta para a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer, sendo os de próstata (61,2 mil), pulmão (17,3 mil), intestino (16,6 mil), estômago (12,9 mil) e cavidade oral (11,1 mil) os mais frequentes em homens, enquanto os cânceres de mama (57,9 mil), intestino (17,6 mil), colo do útero (16,3 mil), pulmão (10,8 mil) e estômago (7,6 mil) figurarão entre os principais nas mulheres (Figura 3) (INCA, 2016).

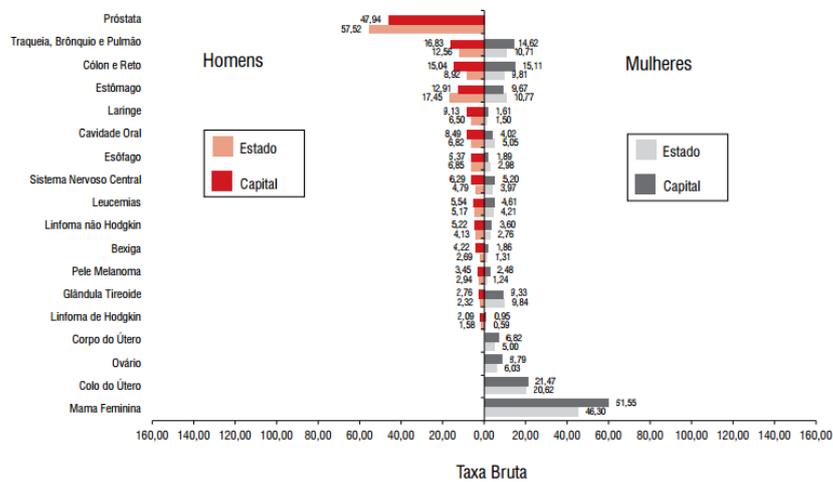
**Figura 3.** Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: INCA, 2016.

No estado do Ceará, o perfil epidemiológico observado assemelha-se ao do restante do país com maiores incidências para os cânceres de próstata, estômago, pulmão e intestino em homens e mama, colo do útero, estômago, pulmão e intestino para as mulheres, conforme a Figura 4.

**Figura 4.** Taxas brutas de incidência estimadas para 2016 por sexo, segundo o estado do Ceará e a capital.



Fonte: INCA, 2016.

### 1.3 Estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer

A terapêutica do câncer baseia-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores ao tratamento radioterápico e a quimioterapia (KUMAR *et al.*, 2013).

Na década de setenta estas formas clássicas de abordagem sofreram alterações significativas com a introdução de tratamentos adjuvantes. O emprego intensivo dos protocolos pós-cirúrgicos, incluindo a associação de quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação à radioterapia e, mais recentemente, a associação destes aos anticorpos monoclonais, terapias gênicas e hormonais vem melhorando os resultados do tratamento de alguns tipos de cânceres (COSTA-LOTUFO *et al.* 2010; KUMAR *et al.*, 2013).

A ressecção cirúrgica do tumor é eficaz nos estágios iniciais da doença quando não há metástase, sendo, na maioria das vezes associada a outras terapias como a radioterapia, que utiliza raios gama e radioisótopos, a fim de aumentar a eficiência do tratamento. A radioterapia pode ser capaz de reduzir o tamanho do tumor, evitar o aparecimento de metástases ou de recidivas. No entanto, seu tratamento oferece algumas limitações devido aos efeitos colaterais observados (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, a imunoterapia tem sido utilizada como tratamento coadjuvante, eliminando células tumorais residuais após intervenção cirúrgica ou outro tratamento, através da estimulação das células de defesa do organismo ou administração de constituintes do sistema imune (ALMEIDA *et al.*, 2005; LOUIS *et al.*, 2012). Vacinas, terapias adotivas de transferência de células T, células NK (*natural killer*) e anticorpos monoclonais incluem o vasto grupo de imunoterapias (SCHOENFELD, 2015). Em pacientes com estágios iniciais da doença, a utilização dessas medidas tem apresentado resultados eficazes em cerca de um terço dos pacientes, no entanto, os demais casos necessitam de uma intervenção sistêmica, como a quimioterapia, com o objetivo de destruir as células tumorais, interferindo no processo de crescimento, divisão e invasão celular, preservando as células normais. (FULDA & DEBATIN, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007).

Os fármacos quimioterápicos podem ser administrados de maneira isolada ou combinados com o objetivo de aumentar a eficácia do tratamento e de evitar a resistência tumoral aos fármacos. A utilização da poliquimioterapia com diferentes alvos terapêuticos é capaz de otimizar as respostas do paciente ao tratamento (SOUZA, 2004). Entretanto, a quimioterapia pode oferecer efeitos secundários, especialmente em células normais de rápido crescimento, a exemplo das células gastrointestinais, do sistema imunológico e capilares, resultando em diversos efeitos colaterais, como, diarreia, náuseas, vômitos, imunodepressão e alopecia (ALMEIDA *et al.*, 2005; BRANDÃO *et al.*, 2010).

Atrelado aos altos efeitos colaterais, diversos tumores ainda apresentam respostas modestas aos protocolos clínicos, o que limita sua indicação e eficácia do tratamento. Desse

modo, torna-se imprescindível a necessidade do desenvolvimento de modalidades terapêuticas capazes de oferecer ao número crescente de pacientes com câncer oportunidades reais de controle dessa patologia (SALGALLER & LODGE, 1998; KUMAR *et al.*, 2013).

#### **1.4 Bioprospecção de produtos naturais**

As plantas medicinais têm sido pesquisadas e utilizadas desde os primórdios para aliviar e tratar doenças. O desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental detém de valiosos exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, em mecanismos de defesa e no controle de pragas (VIEGAS, BOLZANI & BARREIRO, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2012).

Muitas classes de princípios ativos foram isoladas de plantas medicinais brasileiras. De fato, o Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, com mais de 45.000 espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta). Atrelado a isso, sua população tem uma longa tradição no uso de plantas medicinais para o tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas (DUTRA *et al.* 2016).

As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação de seus benefícios clínicos. A etnofarmacologia, ciência que estuda o conhecimento popular sobre fármacos, desperta o interesse de pesquisadores envolvendo áreas multidisciplinares que somam conhecimentos na medicinal natural originado de diversas fontes, incluindo um grande número de plantas, animais e microrganismos (LOPEZ, 2006; MCCHESENEY *et al.*, 2007; YAN *et al.*, 2013). Graças a isso, a compreensão de fenômenos complexos relacionados à biologia celular e molecular tem sido possível, permitindo que enzimas, receptores, canais iônicos e outras estruturas biológicas sejam identificados, isolados e clonados possibilitando dessa forma o desenho de drogas dotadas de maior seletividade e também mais eficazes contra distintas patologias (SHU, 1998; CAVALCANTI *et al.*, 2007).

Uma característica comum a grande parte dos quimioterápicos antineoplásicos, está relacionada a pesquisas de produtos naturais, dos quais 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância, sua origem relacionada a uma fonte natural (NEWMAN & CRAGG, 2012).

Os últimos anos representaram um grande avanço na indústria farmacêutica em termo de pesquisa de produtos naturais de origem vegetal, especialmente no campo da oncologia, o que resultou no desenvolvimento de fármacos (Tabela 1) como a vimblastina e a vincristina, alcaloides isolados da espécie *Catharanthus roseus* e os análogos vindesina e vinorelbina; o etoposídeo, um glicosídeo semissintético produzido a partir do podófilo (*Podophyllum peltatum*); o irinotecan, isolado da casca da *Camptotheca acuminata* D; além dos taxanos paclitaxel e o docetaxel derivados da casca do *Taxus brevifolia* N. (COSTA-LOTUFO, *et al.*, 2010).

**Tabela 1:** Produtos Naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer.

<b>Fármaco</b>	<b>Fonte</b>	<b>Alvo molecular</b>	<b>Indicação terapêutica</b>
Vimblastina	<i>Caratharanthus roseus</i>	Tubulina/Microtúbulos	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking
Vincristina			
Vindesina			
Vinorelbina			
Paclitaxel	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina/Microtúbulos	Câncer de mama
Docetaxel			
Podofilotoxina	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de pulmão, ovário e testículo; Leucemia Linfocítica Aguda
Etoposídeo			
Teniposídeo			
Camptotecina	Camptotheca accuminata	Topoisomerase I	Câncer de cólon
Topotecano			
Irinotecano			

Fonte: Costa-Lotufo, *et al.*, 2010.

O desenvolvimento de novos recursos medicamentosos para o tratamento do câncer utilizando plantas medicinais tem sido uma alternativa para os especialistas da área, a fim de promover a eficácia e o controle de tumores primários assim como as metástases (KUMMAR, 2004). A fitoterapia constitui uma forma de medicina que vem crescendo visivelmente ao longo dos anos consistindo na evolução dos estudos científicos, particularmente os estudos químicos e farmacológicos, que comprovam, cada vez mais, a eficácia das plantas medicinais. (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). A utilização de fitoterápicos e plantas medicinais é

assegurada pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), por meio do Decreto nº 5.813 do ano de 2006, a fim de garantir à população segurança e o uso consciente de plantas medicinais e fitoterápicos (ANVISA, 2006).

Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico do câncer, vários tipos de tumores ainda não dispõem de tratamento adequado (PINTO *et al.*, 2002). Algas, fungos, líquens, plantas e substâncias do metabolismo secundário representam importantes fontes para pesquisas de novas moléculas bioativas (PINTO *et al.*, 2002; CRAGG & NEWMAN, 2005).

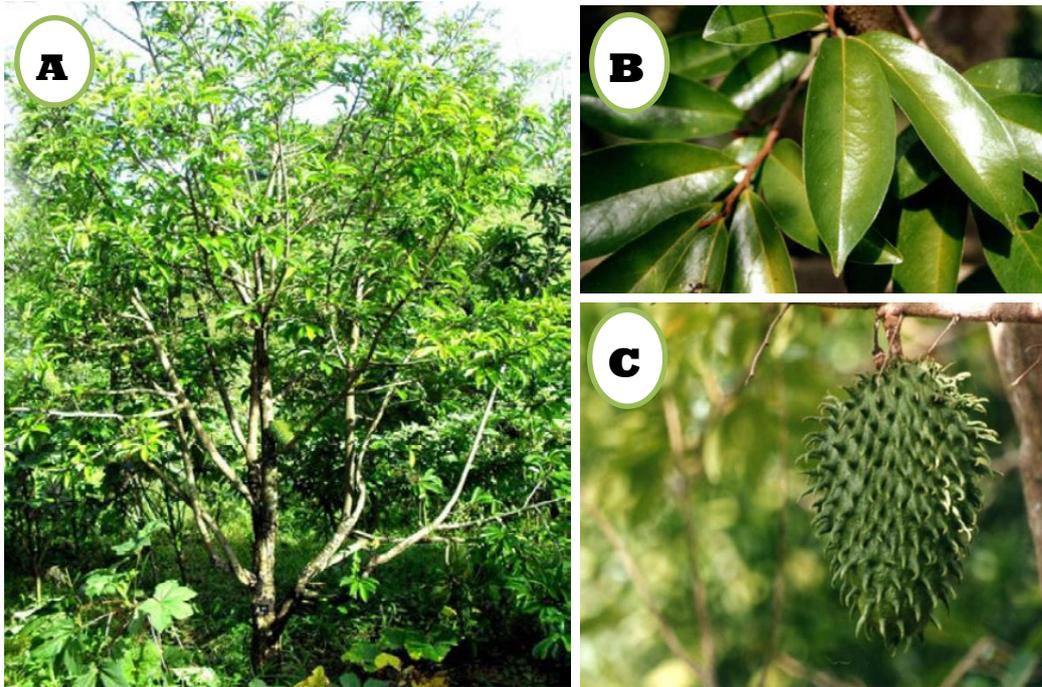
### **1.5 *Annona muricata* L.**

*Annona muricata* L. (Annonaceae) é originária das Antilhas e encontrada em regiões tropicais e subtropicais conhecida popularmente por gravioleira. A família é composta por aproximadamente 120 gêneros e abriga cerca de 2.500 espécies, sendo que 109 são nativas da América tropical e 10 da África tropical (GEURTS, 1981).

No Brasil a espécie é difundida no Norte e Nordeste, cultivada principalmente nos Estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará e Bahia. Bem adaptada a climas úmidos e baixa altitude, a planta pode chegar a 11 m de altura, com folhas verdes brilhantes e flores hermafroditas branco-amareladas, grandes e isoladas, que nascem no tronco e nos ramos.

A floração inicia-se no terceiro ou quarto ano de plantio da semente e o fruto é conhecido por graviola, uma baga composta (sincarpo), grande, de forma ovalada, com peso que pode atingir 10 kg e comprimento médio de 30 cm (Figura 5). As sementes, com 1-2 cm de comprimento e peso médio de 0,60 g, são abundantes ( $\pm 100$  sementes/fruto), pretas, envolvidas por uma polpa branca, de sabor agridoce, muito aromática e succulenta (Figura 6) (PINTO *et al.*, 2005).

**Figura 5:** Gravioeira *Annona muricata* L. (A), folhas (B) e fruto (C).



Fonte: Filardi, 2010.

**Figura 6:** Fruto em corte (D) e sementes secas (E) de *Annona muricata* L.



Fonte: Filardi, 2010.

A gravioleira possui uma ampla utilização terapêutica como medicamento tradicional, em que praticamente todas as partes da planta (casca, folhas, raízes, flores, fruta e sementes) são utilizadas no tratamento de diversos tipos de doenças (LORENZI & MATOS, 2002). A pesquisa etnofarmacológica evidenciou o uso do fruto e seu suco em casos de infestações por vermes e parasitas, para amenizar febres, como estimulante da lactação e como adstringente para diarreia e disenteria; as sementes esmagadas são utilizadas contra parasitas intestinais, ectoparasitas e dermatomicoses; as cascas, folhas e raízes são consideradas sedativas,

antiespasmódicos, hipotensivas, antipirética, antitumorais, hipoglicemiante, anticonvulsivante e digestiva (EISENBERG *et al.*, 1993; MORS *et al.*, 2000; ADEYEMI *et al.*, 2009); o chá da folha é utilizado para problemas do fígado e no combate ao catarro e o óleo que sai do fruto é misturado com azeite de oliva para combater a nevralgia, reumatismo e artrites (VASQUEZ, 1990; CARBAJAL *et al.*, 1991; FEO, 1992; HEINRICH *et al.*, 1992; ALONSO, 1998; MORS *et al.*, 2000; LORENZI & MATOS, 2002; ABDULLAH & SINA, 2003; DAUD, 2005; LUNA *et al.*, 2009).

O metabolismo secundário da gravioleira produz diversos grupos fitoquímicos bioativos, dentre eles encontram-se os alcalóides, compostos fenólicos, óleos essenciais, flavonóides, terpenos e acetogeninas (PONTES *et al.*, 2004). Destacam-se as acetogeninas, exclusivas do gênero *Annona* que estão presentes nas folhas, na casca do caule e nas sementes (PAULL, 1983; CASTRO *et al.*, 1984; MORTON, 1987; ZENG *et al.*, 1996b; WANG *et al.*, 2002; SACRAMENTO *et al.*, 2003).

Outros constituintes do fruto da gravioleira são ácidos cítrico, oxálico, caféico, cumárico, esteárico, linoléico, málico,  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e ácido oléico; anonol, campesterol, citrulina, dextrose, etanol, fitosteróis ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol), frutose, ipuranol, manganês, leucoantocianinas, sacarose e taninos (PAULL, 1983; MOSCA, *et al.*, 2006).

Distintos estudos foram realizados a partir de extratos e compostos isolados provenientes da *Annona muricata* L. e demonstraram ações farmacológicas com atividades:

- 1) Antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* e *S. albus* em extratos metanólico, hexânico e de acetato de etila obtido do caule, casca e sementes (VIEIRA *et al.*, 2010);
- 2) Antimalárica contra *Plasmodium falciparum* em extrato da folha (GBEASSOR *et al.*, 1990; ANTOUN *et al.*, 1993);
- 3) Efeito antiproliferativo em HIV, vírus da herpes simplex 1 e simplex 2 com extrato aquoso de caule, extrato etanólico da casca e da raiz, respectivamente (PADMA *et al.*, 2001);
- 4) Atividade fungicida contra *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* a partir do chá das folhas (HEINRICH *et al.*, 1992);

- 5) Moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* a partir de extratos etanólico de caule, casca e folhas (SANTOS *et al.*, 2001; LUNA *et al.*, 2006);
- 6) Atividade parasiticida em *Entamoeba histolytic*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Molinema dessetae*, *Leishmania trypanosoma*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania promastigotes* a partir de extratos metanólico, hexânico e acetato de etila de sementes, caules e casca (BORIES *et al.*, 1991; HEINRICH *et al.*, 1992; ALALI *et al.*, 1998; JARAMILLO *et al.*, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2006);
- 7) Efeito modulador no sistema nervoso central, atuando como estimulador (reticulina) ou sedativo (estafarina e a aterospermina) devido a presença de alcalóides, além disso o extrato alcoólico do fruto diminui a atividade motora, agindo como hipnótico e sedativo. A atividade antidepressiva e sedativa é atribuída aos alcalóides isoquinolínicos e ao ácido  $\gamma$ -aminobutírico. (HASRAT *et al.*, 1997; N'GOUEMO *et al.*, 1997);
- 8) Atividade citotóxica (*in vitro*): distintos trabalhos evidenciam o potencial citotóxico de acetogeninas isoladas de diferentes espécies, sobre algumas linhagens de células tumorais como adenocarcinoma prostático (PC-3), carcinoma colorretal (HCT-116), leucemia promielocítica (HL-60), carcinoma de ovário (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295) e células tumorais de pulmão (A-549) (Liu *et al.*, 1998; BARRETO, 2014). Foi observado por Yuan e colaboradores (2003) que a annonacina, uma acetogenina bastante encontrada no gênero *Annona*, induz o ciclo celular a parar na fase G1 e inibe a progressão da fase S, além de estimular a ação de p53 e p21, proteínas do ponto de checagem do ciclo celular;
- 9) Além de atividades hipoglicemiante, relaxante muscular e antiespasmódica a partir do extrato aquoso e o etanólico de folhas e cascas (FEO, 1992; ADEWOLE & OJEWOLE, 2009; ADEYEMI *et al.*, 2009; LUNA, 2009).

## 1.6 Acetogeninas

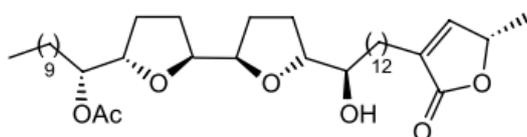
As acetogeninas são exclusivas da família *Annonaceae* e encontradas em sete gêneros: *Annona*, *Asimina*, *Disepalum*, *Goniothalamus*, *Rollinia*, *Uvária* e *Xylopia*. Derivadas de

ácidos graxos de cadeia longa exibe expressiva atividade biológica sendo consideradas alternativas promissoras para o desenvolvimento de drogas antitumorais (ALALI *et al.*, 1999). Estão presentes em várias partes da planta das espécies (caule, raiz, sementes, folhas, galhos e fruto) e em revisão publicada por Bermejo *et al.* (2005), a maioria das acetogeninas isoladas do gênero *Annona* foram encontradas em sementes, e apresentaram citotoxicidade maior quando testadas do que as acetogeninas presentes nas folhas.

Bioquimicamente, são um grupo de metabólitos secundários constituído por uma extensa cadeia hidrocarbônica, geralmente com 35 a 37 átomos de carbono, um anel terminal  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturado, podendo haver ou não a presença de anel tetrahydrofuranos (THF) ou anel tetrahidropirano (THP) ao longo da cadeia. Além disso, as acetogeninas possuem diversos grupos funcionais, notadamente, hidroxilas, que são importantes para a bioatividade desses compostos (BERMEJO *et al.*, 2005; LEITE, 2009).

A atividade citotóxica foi descrita pela primeira vez em 1982 com o isolamento da primeira acetogenina, a uvaricina (Figura 7) obtida da espécie *Uvária acuminata* com atividade antileucêmica. A partir daí, o interesse por essas substâncias vem crescendo principalmente pela variada ação biológica que apresentam com atividades antimicrobiana (YANG *et al.*, 1992), leishmanicida (Vila-Nova *et al.*, 2011), parasiticida, inseticida, citotóxica (DURET *et al.*, 1998), imunossupressora e antitumoral (HOOP *et al.*, 1998), antimalárica e antiprotozoária (ALALI *et al.*, 1999).

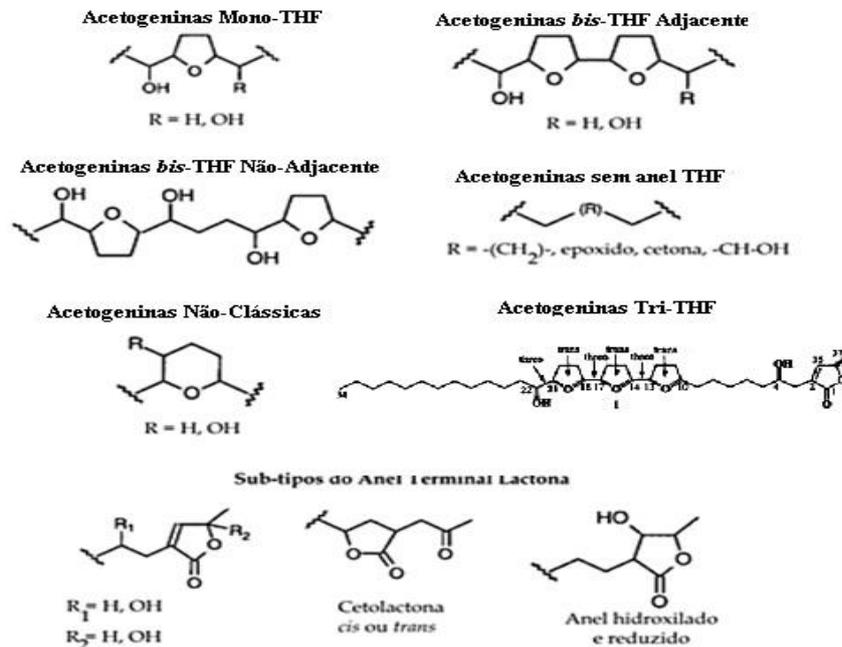
**Figura 7:** Estrutura química da uvaricina



Fonte: Lima, 2007.

De acordo com a posição das funções químicas e estereoquímicas que apresentam (Figura 10), e a quantidade de anéis tetrahydrofurânicos (THF) as acetogeninas são classificadas em: mono-THF, bis-THF adjacente, bis-THF não-adjacente, tri-THF, as que não possui anéis THF e as não-clássicas (por possuírem anel tetrahidropirano – THP ou por apresentarem hidroxilas no anel THF) (ZAFRA-POLO *et al.*, 1996; ALALI *et al.*, 1999; HU *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009; Liaw *et al.*, 2010).

Figura 8: Classificação de acetogeninas anonáceas



Fonte: Adaptado de GU *et al.*, 1994; ALALI *et al.*, 1999.

Algumas avaliações de citotoxicidade com relação à estrutura-atividade das acetogeninas mostraram que: a) Em todos os casos, as acetogeninas do tipo bis-THF com anéis adjacentes são as mais potentes, seguidas em ordem decrescente de atividade pelas bis-THF não-adjacentes, pelas mono-THF e por último aquelas que não possuem anéis THF; b) As unidades hidroxilas são extremamente importantes para bioatividade destes compostos; c) A subunidade  $\gamma$ - lactona  $\alpha,\beta$ - insaturada é essencial para a atividade citotóxica. A redução da ligação dupla reduz a atividade (PAES *et al.*, 2016).

Após o isolamento, determinação estrutural e comprovação da citotoxicidade da uvaricina, os estudos que se seguiram mostraram que, assim como a rotenona, a piericidina e o amital, o efeito citotóxico e antitumoral observado nas acetogeninas envolve um efeito dúbio de inibição da NADH ubiquinona oxidoredutase, enzima essencial no complexo I da cadeia transportadora de elétrons (LOPEZ, 1979; TORMO *et al.*, 2003; KOJIMA, 2004) e inibição das NADH oxidases na membrana plasmática em células cancerosas, que permite a produção de ATP em condições anaeróbicas a fim de restaurar os níveis de NAD e permitir glicólise e continuação da fosforilação ao nível de substrato (ALALI *et al.*, 1998; MORAES *et al.*, 2015).

Em células cancerígenas o metabolismo energético produtor de ATP está desregulado, podendo haver predomínio da via glicolítica ou da fosforilação oxidativa dependendo da

origem histológica da célula. A ocorrência dessas alterações energéticas permite a rápida proliferação, crescimento contínuo, sobrevivência em condições adversas, invasão tecidual, metástase e resistência ao tratamento quimioterápico. Em eventos de dano celular, distintas vias de transdução de sinal podem convergir à mitocôndria para causar a permeabilização da membrana externa e conduzir a liberação de proteínas pró-apoptóticas (como o citocromo c, Smac/DIABLO e o fator de indução de apoptose) a fim de comprometer as funções energéticas das mitocôndrias (MORAES *et. al.*, 2015).

Ambos os mecanismos de ação das acetogeninas resultam na inibição da produção de ATP. Como as células tumorais demandam alta produção de ATP devido seu intenso metabolismo, tanto para divisão celular quanto para síntese de ácidos nucleicos, é possível correlacionar a sensibilidade das linhagens de células neoplásicas para os inibidores de complexo I. Dessa forma, a ativação do processo de morte celular em células tumorais através da inibição do metabolismo mitocondrial pode ser uma abordagem terapêutica promissora no tratamento do câncer (ALALI *et. al.*, 1998; MORAES, *et. al.*, 2015).

As acetogeninas também são eficazes para tumores resistentes a múltiplas drogas, uma vez que, nas membranas deste tipo de célula existem proteínas, como a glicoproteína P (P-gp), que atravessam a membrana e requerem ATP para funcionar. Essas proteínas atuam como bombas que expulsam fármacos para o exterior, evitando a concentração intracelular. Por apresentar dependência de ATP, as células resistentes a múltiplas drogas passam a ser mais suscetíveis às substâncias que inibem a produção de ATP, dessa maneira, quando as acetogeninas inibem o complexo I e NADH oxidase levando a uma diminuição de níveis intracelulares de ATP, conseqüentemente diminuem a eficácia da bomba de efluxo P-gp (PAES *et. al.*, 2016).

Em um estudo publicado em 1999, Caparros-Lefebvre e colaboradores discutiram a possível relação entre o parkinsonismo atípico endêmico em Guadelupe, na Índia Francesa e o consumo de chá e frutas da família *Annonaceae* (*A. muricata* e *A. squamosa*) relacionada com exposição crônica a alcalóides e acetogeninas neurotóxicas do gênero *Annona*. Em estudo recente, foi demonstrado que a annonacina presente na fruta da *A. muricata* pode apresentar um potencial risco de neurodegeneração, quando observado a depleção de ATP em neurônios estriados de ratos e interrupção do transporte mitocondrial levando perturbações na proteína tau e características similares de doenças neurodegenerativas. No entanto, pesquisas adicionais são cruciais para distinguir todos os compostos que contribuem para este efeito e

determinar o limiar destes compostos nos quais essa decorrência é causada (ESCOBAR-KHONDIKER *et.al.*, 2007; MOGHADAMTOUSI *et. al.*, 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Considerado o câncer um problema de saúde pública mundial, sendo a segunda causa de morte do mundo (BARBOSA, 2009), essa doença apresenta grande complexidade e difícil tratamento, tornando-a alvo de pesquisa para o desenvolvimento e descoberta de fármacos mais efetivos (KUMAR *et al.*, 2013). A pesquisa etnofarmacológica tem gerado respostas promissoras no desenvolvimento de moléculas que contribuem na terapêutica dessa patologia, nesse cenário, destacam-se os estudos conduzidos com plantas da família *Annonaceae* que vêm apresentando satisfatórias atividades antitumorais ligadas as acetogeninas (ALALI *et. al.*, 1998; DUTRA *et.al.*, 2016).

Trabalhos prévios com espécie *Annona muricata* realizados no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LabNOE) apresentou resultados satisfatórios do extrato acetônico das folhas e sementes frente a linhagens leucêmicas, de cólon e glioblastoma, bem como com a acetogenina isolada anonacina que apresentou notável atividade contra linhagem de câncer de cólon (OLIVEIRA, 2012; RIOS, 2013; BARRETO, 2014). Metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (sazonalidade, temperatura, patógenos, altitude, etc) e a distribuição dessas substâncias varia nas diferentes partes das plantas, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; SOUSA FILHO *et. al.*, 2011). Esses achados estimularam o nosso grupo a seguir estudando a atividade desta espécie, explorando sua atividade citotóxica através da bioprospecção química do extrato das sementes de *A. muricata*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Realizar o fracionamento químico bioguiado do extrato das sementes de *A. muricata* para prospecção de substâncias com potencial citotóxico em linhagens tumorais humanas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar o fracionamento do extrato acetônico das sementes de *A. muricata* guiado pela atividade citotóxica das frações e subfrações em linhagens tumorais humanas;
- Avaliar o efeito citotóxico do composto isolado annonacinona em diferentes linhagens tumorais humanas;
- Avaliar a densidade celular após tratamento com annonacinona em células tumorais de pulmão (NCI-H460);
- Avaliar o conteúdo de DNA e externalização da fosfatidilserina de células NCI-H460 após tratamento com annonacinona;
- Avaliar a proliferação e a viabilidade de células tumorais NCI-H460 em tempo real após tratamento com annonacinona;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

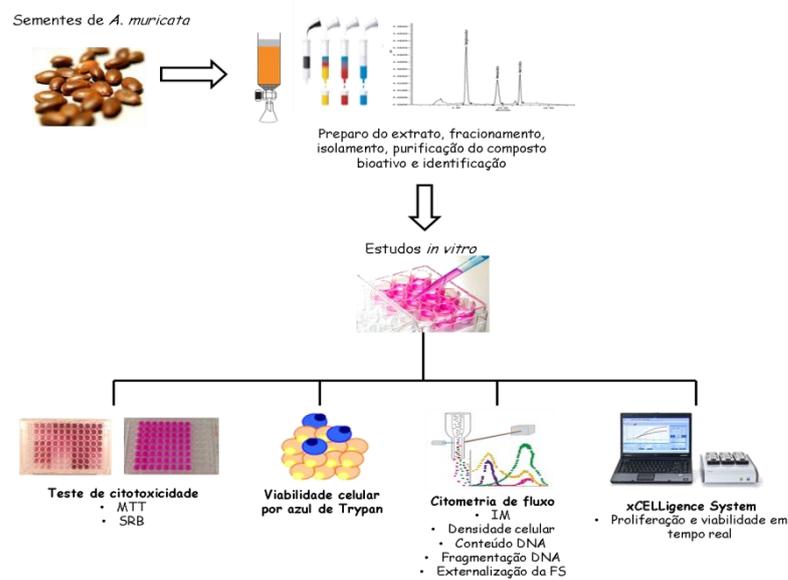
### 4.1 Material utilizado

A descrição dos equipamentos, softwares de aquisição e análise de dados, bem como o fabricante dos reagentes utilizados está detalhada no Anexo A. As soluções preparadas e a descrição dos componentes dos kits utilizados estão detalhadas no Anexo B.

### 4.2 Planejamento experimental

As sementes da *A. muricata* foram coletadas em Abril de 2011 no município de Trairi - CE. A partir das sementes, foi preparado o extrato acetônico, seguido do fracionamento, isolamento, purificação e identificação da acetogenina annonacinona. A atividade citotóxica destes compostos foi avaliada inicialmente utilizando o método do MTT e posteriormente o método do SRB. Para o controle positivo foram utilizados a doxorrubicina, um antineoplásico já comumente utilizado na prática clínica e a rotenona, um inibidor específico do complexo I mitocondrial. O controle negativo foi utilizado DMSO, veículo empregado para solubilização das amostras.

Após o isolamento e identificação da acetogenina annonacinona, foi realizado o estudo da atividade citotóxica, utilizando o ensaio de viabilidade celular por exclusão do azul de Trypan, estudando os eventos celulares por citometria de fluxo e avaliando a proliferação e viabilidade celular em tempo real através do XCelligence System. A figura 9 representa o desenho experimental e as etapas do trabalho.

**Figura 9.** Desenho experimental

Legenda: IM- Integridade de membrana; FS – Fosfatidilserina

### 4.3 Material vegetal

As sementes de *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) foram coletadas no município de Trairi – Ceará (S3°22'15,98"; W 39°17'34,46") em abril de 2011. O material botânico foi identificado no herbário Prisco Bezerra, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, local onde se encontra depositado uma exsicata da espécie com registro EAC 49002.

### 4.4 Obtenção do extrato bruto

Foram coletados 2,80 kg das sementes de *Annona muricata*, as quais, depois de secas e moídas, foram submetidas à extração com acetona a frio por percolação com 10 litros de acetona durante 72 horas. Posteriormente, o extrato foi concentrado por meio de destilação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo-se um extrato viscoso e de coloração amarela.

Após destilação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo, o extrato concentrado foi cuidadosamente secado, para completa remoção do solvente e pesado. O extrato obtido apresenta-se como um óleo viscoso com três fases bem definidas e distintas.

A fase mais densa de cor amarelo claro, viscosidade baixa e menor volume foi denominada de extrato acetônico das sementes da *Annona muricata* Fase 1 (AMSAF1) (m = 26 g); a fase intermediária de cor marrom e viscosidade elevada denominada extrato acetônico das sementes da *Annona muricata* Fase 2 (AMSAF2) (m = 44 g); e o sobrenadante de coloração amarelo- avermelhado denominada extrato acetônico das sementes da *Annona muricata* Fase 3 (AMSAF3) (m = 418 g).

O rendimento do extrato acetônico bruto foi de 17,4%. A fase intermediária (AMSAF2) do extrato acetônico bruto foi escolhida para o fracionamento bioguiado do estudo por apresentar atividade citotóxica evidenciada em estudos prévios do grupo de pesquisa do LabNoe.

#### **4.5 Isolamento e identificação das amostras**

O fracionamento químico do extrato acetônico de *A. muricata* foi realizado no Laboratório de Química Medicinal, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, sob supervisão do químico responsável, Dr. Cláudio Costa dos Santos.

O mesmo foi guiado pela identificação dos extratos, frações e subfrações mais ativos para a inibição da proliferação de linhagens de células tumorais, sendo estes estudos de citotoxicidade realizados no LabNoe.

Para a realização do fracionamento empregou-se técnica de adsorção em cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária géis de sílica comum e solventes orgânicos de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol), puros ou em misturas binárias, obedecendo sempre uma ordem crescente de polaridade. A proporção de sílica empregada foi cerca de 20 vezes a massa do produto bruto a ser purificado (MATTOS, 1997).

As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatoplasmas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência F<sub>254</sub>, com suporte em alumínio e 0,2 mm de espessura.

As cromatografias em camada delgada preparativa (CCDP) foram efetuadas em cromatoplasmas revestidas de géis de sílica (Macherey-Nagel) e com suporte de alumínio, 20 x 20 cm e espessura de 0,20 mm, com indicador de fluorescência F<sub>254</sub>. Uma amostra de 20 mg da fração foi diluída em clorofórmio e aplicada utilizando como eluente clorofórmio : acetato

de etila (80 : 20), 50 mL. A visualização das bandas foi efetuada com auxílio de luz ultravioleta (254 e 365 nm) através de câmera de luz ultravioleta (Biothec) e/ou pela pulverização da cromatoplaça com solução de vanilina e ácido perclórico 0,75 M em etanol, seguido de aquecimento em estufa à 100 °C por aproximadamente 5 minutos. A recuperação das amostras foi realizada utilizando como solventes: hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros e/ou em misturas binárias.

O revelador Kedde (solução metanólica de ácido 3,5-dinitrobenzóico a 1%) foi utilizado para a detecção de lactonas de 5 membros  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas, características das acetogeninas apresentando como resultado positivo o desenvolvimento de coloração vermelho.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em aparelho Shimadzu, Japão. As separações foram efetuadas em sistema analítico com coluna Gemini (250 x 4.6 x 5 $\mu$ ), marca Phenomenex. Todos os solventes empregados (grau CLAE) foram adequadamente filtrados através de membranas fluopore (FH) em teflon (PTFE) 0,5 $\mu$ m e empregado um fluxo de 0,8mL por minuto utilizando como eluente acetonitrila:metanol 15%.

A determinação estrutural do composto isolado das sementes de *A. muricata* foi utilizada foi realizada pelo Dr. Cláudio Costa dos Santos juntamente a prof.<sup>a</sup> Dra. Selene Maia de Moraes, da Universidade Estadual do Ceará.

A Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foi realizada em parceria com Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará sob supervisão do prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira.

Os espectros de massa foram realizados em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) sob supervisão do Dr. Kirley Marques Canuto, obtidos em espectrômetro de massa de alta resolução (UltrOTOF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, MA).

Os espectros no infravermelho foram realizados em parceria com o Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM II) sob supervisão da Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa, registrados em espectrômetro da Perkin- Elmer, Spectrum 100 FTIR, equipado com acessório de reflexão total atenuada universal (UATR).

## 4.6 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

### 4.6.1 Linhagens celulares

As linhagens tumorais utilizadas para a avaliação da atividade antiproliferativa foram obtidas através de doação pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI). A linhagem L929 foi obtida a partir do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e utilizada como modelo para a avaliação da citotoxicidade sobre células não tumorais. As células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e suas respectivas concentrações de plaqueamento para o teste do MTT e SRB estão listadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de citotoxicidade MTT e SRB.

<b>LINHAGEM CELULAR</b>	<b>TIPO HISTOLÓGICO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>CONCENTRAÇÃO DE PLAQUEAMENTO</b>
<b>HCT-116</b>	Carcinoma de cólon	Humana	0,7 x 10 <sup>5</sup> céls./mL
<b>HEPG2</b>	Carcinoma hepatocelular	Humana	0,7 x 10 <sup>5</sup> céls./mL
<b>HL-60</b>	Leucemia promielocítica	Humana	0,3 x 10 <sup>6</sup> céls./mL
<b>L929</b>	Fibroblastos	Murina	0,1 x 10 <sup>6</sup> céls./mL
<b>NCI-H460</b>	Carcinoma de pulmão	Humana	0,1 x 10 <sup>6</sup> céls./mL
<b>OVCAR-8</b>	Adenocarcinoma de ovário	Humana	0,1 x 10 <sup>6</sup> céls./mL
<b>PC-3</b>	Adenocarcinoma de próstata	Humana	0,1 x 10 <sup>6</sup> céls./mL
<b>PC-9</b>	Adenocarcinoma de pulmão	Humana	0,1 x 10 <sup>6</sup> céls./mL
<b>SF-295</b>	Glioblastoma	Humana	0,1 x 10 <sup>6</sup> céls./mL
<b>SNB-19</b>	Glioblastoma	Humana	0,1 x 10 <sup>6</sup> céls./mL
<b>SW-620</b>	Adenocarcinoma de cólon	Humana	0,7 x 10 <sup>5</sup> céls./mL

### 4.6.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II) e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (NUAIRE, modelo TS Autoflow).

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas plásticas para cultura (25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL ou 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL) utilizando meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), e as células L929 foram cultivadas em DMEM (Gibco), ambos suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). As culturas tiveram seu crescimento acompanhado sob microscópio óptico de inversão (ZEISS, modelo Axiovert 40C) a cada 24 horas e a manutenção foi feita antes que as células atingissem confluência de 90%.

Para a manutenção de células aderidas, o meio era retirado e a garrafa era lavada 2x com PBS estéril, em seguida, adicionava-se tripsina 0,5% (Gibco) diluída 10X em solução tampão Phosphate Buffer Solution (PBS), a fim de suspender as células. Depois de suspensas, a ação da tripsina era inibida pela adição de meio suplementado com SBF (10%). Parte das células era removida da garrafa e o volume era preenchido com meio completo. Para manutenção de células suspensas, apenas trocava-se o meio.

#### **4.6.3 Avaliação do efeito citotóxico pelo ensaio do MTT**

O ensaio do MTT é um método colorimétrico que tem como objetivo quantificar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) de cor amarela, resultando na formação de cristais de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas. Os metabólitos primários envolvidos do ciclo de Krebs, NADH<sub>2</sub>, NADPH e Succinato são os principais envolvidos nesta reação, em que a atividade metabólica da célula é dependente do número de células e está diretamente relacionada com a quantidade de MTT metabolizada, sendo a quantificação realizada por absorvância em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). Neste trabalho, o ensaio do MTT foi utilizado para biomonitorar o efeito citotóxico das frações e subfrações obtidas com o objetivo de selecioná-las para prosseguimento do fracionamento.

As células em suspensão ou em monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades, sendo a concentração de plaqueamento determinada de acordo com as linhagens de diferentes sensibilidades a serem testadas descritas na Tabela 2. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>, 100 µL das amostras diluídas em meio completo variando entre 0,05 - 25 µg/mL para a frações, 0,01 - 5 µg/mL para as subfrações e 0,04 - 5µM para a annonacinona, foram adicionadas e as placas foram novamente incubadas por 72 horas. As placas foram centrifugadas a 1500 rotações por minuto (rpm) por 15 min e, em seguida, o

sobrenadante foi retirado. Foi adicionado em cada poço 150  $\mu$ L de solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em meio RPMI 1640, e as placas foram reincubadas por 3 horas.

Após o período de incubação, as placas foram novamente centrifugadas, a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante retirado. Para realização da leitura em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) com absorvância de 595 nm, o formazan foi ressuspenso em 150  $\mu$ L de Dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado em cada poço. Para leitura foi utilizado o programa Multimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.). A doxorubicina e rotenona foram utilizadas como controle positivo dos experimentos e para controle negativo apenas DMSO, utilizado para solubilizar as amostras.

Os valores das absorvâncias, resultantes dos testes das frações e subfrações em concentração única, foram transformados em porcentagem de inibição, sendo comparado ao controle negativo. Estes dados foram analisados com base na média  $\pm$  erro padrão da média da triplicata de no mínimo três experimentos. Quando testados em diluição seriada, foi feita a determinação da concentração inibitória média (CI50) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%), obtidos por regressão não linear. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.0.

#### **4.6.4 Avaliação de citotoxicidade pelo ensaio da Sulforrodamina B (SRB)**

O ensaio de Sulforrodamina B (SRB) consiste num método de citotoxicidade de quantificação colorimétrica da proteína celular (biomassa total) em culturas de células coradas com SRB. A fim de avaliar um possível viés por conta de superestimação da concentração inibitória média obtida pelo método do MTT, foi realizado o ensaio temporal através do SRB apenas com a anonacinona frente à linhagem que apresentou maior sensibilidade (NCI-H460).

O Sulforrodamina B ( $C_{27}H_{30}N_2O_7S_2$ ) é um corante brilhante de cor purpúrea, com dois grupos sulfônicos, solúvel em água. Sob condições ácidas o corante liga-se aos aminoácidos da proteína básica, em células viáveis previamente fixadas com ácido tricloroacético (TCA) frio a 10% (m/v). O corante SRB é usado como um indicador quantitativo do conteúdo proteico da cultura celular, sendo este conteúdo proporcionalmente linear à densidade de células. Um aumento ou diminuição do número de células resulta numa alteração proporcional da quantidade do corante incorporado nas células em cultura, o que indica o grau de citotoxicidade causada pelo composto em estudo (SKEHAN, et al., 1990).

As células em monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades, sendo a concentração de plaqueamento determinada de acordo com as linhagens a serem testadas descritas na Tabela 2. Para determinar a quantidade de células existentes no momento da adição das amostras, foi feita uma placa controle, denominada tempo zero (T0). Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>, 100 µL da anonacinona diluída em diferentes concentrações com meio completo foram adicionadas e as placas foram novamente incubadas por 24, 48 e 72 horas. A placa de tempo zero foi centrifugada, o sobrenadante descartado e adicionada em cada poço 100µL da solução de TCA 10% para fixar os resíduos de aminoácidos de proteínas. A placa foi armazenada em geladeira a 4°C para ser corada juntamente com as placas amostras-teste.

Após o tempo de incubação as placas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 15 min e, em seguida, o sobrenadante foi retirado. Foram adicionados 100 µL de solução de TCA 10% em todos os poços, incluindo brancos e controles. Para facilitar a fixação das células à superfície da placa de cultura, as placas foram mantidas durante 1 hora a 4 °C.

Após o período de fixação, removeu-se o TCA, lavou-se cada poço cinco vezes com 200 µL de água destilada. Após a última lavagem, adicionaram-se em cada poço das placas, 100 µL de solução de SRB a 0,4% (p/v) dissolvido em ácido acético 1% e foram incubadas por 30 minutos em estufa a 37°C e a 5% CO<sub>2</sub> de modo a permitir a incorporação do corante.

Após período de incubação a solução corante SRB foi removida e lavou-se cinco vezes cada poço com 200 µL de ácido acético a 1% (v/v). Após a última lavagem adicionaram-se em cada poço 200 µL de Tris Base a 10 mM, com o intuito de lisar as células e conseqüentemente libertar as proteínas coradas com SRB.

Em seguida foram submetidas a uma agitação de 15 minutos em temperatura ambiente para a dissolução das proteínas coradas e a absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880).

Para leitura foi utilizado o programa Multimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.). A doxorubicina e rotenona foram utilizadas como controle positivo dos experimentos. Foram obtidas as absorbâncias: amostra-teste (T), controle negativo (CN), e a leitura do tempo zero (T0).

Com os valores médios de absorbância para cada concentração do extrato, a porcentagem de crescimento celular (%C) foi calculada de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{Se } T \geq T0 \text{ e } < \text{CN} \rightarrow \text{atividade citostática: } \%C = 100 \times [(T-T0)/(CN-T0)];$$

$$\text{Se } T < T0 \rightarrow \text{atividade citocida: } \%C = 100 \times [(T-T0)/ T0];$$

Onde:

T = média da absorbância da amostra-teste;

T0 = absorbância do controle de células na placa tempo zero (T0);

CN= média da absorbância do controle negativo.

#### **4.6.5 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do azul de Trypan.**

A exclusão por azul de Trypan é um método quantitativo de avaliação da viabilidade celular, que permite quantificar separadamente células viáveis e células não viáveis. O corante penetra em todas as células, no entanto, apenas as células metabolicamente ativas (viáveis) conseguem expulsar o Trypan para fora, enquanto que nas não viáveis é observada uma coloração azulada (PERES; CURI, 2005).

Para a realização do teste, as células NCI-H460 em suspensão foram plaqueadas em placas de 24 poços em uma menor concentração ( $5 \times 10^4$  células/mL) a fim de evitar excesso de células no poço e inibição de crescimento por falta de espaço ou nutrientes, e foram incubadas por 48 h com a annonacina nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8  $\mu\text{M}$ , escolhidas com base na  $\text{CI}_{50}$  obtidos pelo método do MTT (1/2x; 1x, 2x e 4x do valor da  $\text{CI}_{50}$ ) no tempo de 48 horas de tratamento. Estas concentrações foram utilizadas nos demais métodos realizados. A concentração utilizada para a doxorubicina e rotenona foi de 0,3  $\mu\text{M}$  e 4,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente, baseada no perfil de inibição de crescimento através do método do MTT e/ou SRB.

Após os períodos de incubação as células foram transferidas para tubos eppendorf, que em seguida foram centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm. O pellet foi ressuspensão em 1 mL de PBS. Em uma alíquota de 90  $\mu\text{L}$  de suspensão de células, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de azul de Trypan 0,4%. As células viáveis e não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer.

Os dados foram analisados com base na média  $\pm$  erro padrão da média da triplicata de quatro experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferença estatística significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste Student Newman-Keuls para comparação entre grupos, com significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4.7 Estudo do padrão de morte celular**

### **4.7.1 Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é uma importante alternativa de estudo dos eventos celulares, caracterizada pela análise destes eventos em condições vitais da célula. No citômetro, as células são individualmente conduzidas em canal de corrente fluida, em que, ao interceptar o feixe de luz, geralmente proveniente de um laser, causam sua dispersão em várias direções dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e da densidade óptica de cada célula. A detecção de um feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionada com o tamanho celular, que se dá por dispersão linear (FSC, Forward Scatter), enquanto que a captação de um desvio ortogonal está relacionada com a complexidade da célula, em particular sua granulosidade, que ocorre por dispersão lateral (SSC, Side Scatter). Além disso, é capaz de detectar a fluorescência emitida por marcadores utilizados, classificando cada célula com um evento (SHAPIRO, 1995).

As células NCI-H460 foram tratadas com annonacinona (0,1, 0,2, e 0,4  $\mu\text{M}$ ), doxorubicina (0,3  $\mu\text{M}$ ), rotenona (4,5  $\mu\text{M}$ ) e apenas DMSO em concentração abaixo de 0,1% assim como presente nas amostras.

As células foram analisadas utilizando o citômetro Guava easyCyte™ 6-2L. Para todos os parâmetros avaliados pela técnica de citometria de fluxo, 10 mil eventos foram adquiridos por cada replicada de cada amostra, exceto no ensaio da Anexina V que foram adquiridos 5 mil eventos. Cada experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.

A análise dos dados da citometria de fluxo foi feita com base na média  $\pm$  erro padrão da média; e para a verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os gráficos do ciclo celular foram analisados no programa ModFit LT® versão 4.1 (Verity Software House).

#### **4.7.1.1 Avaliação da integridade da membrana, da densidade de células e da morfologia celular**

O teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo (IP) de penetrar nas células, cuja membrana esteja rompida (não-viáveis), e se ligar ao DNA, emitindo alta fluorescência

vermelha quando é excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995).

Após 48 horas de tratamento, uma alíquota de 100  $\mu$ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 $\mu$ L de uma solução de IP a 50 $\mu$ g/mL (diluído em tampão fosfato). Após 20 minutos as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Foram obtidas informações sobre densidade, morfologia (espalhamento frontal e lateral da luz, o que corresponde ao tamanho e granulosidade relativa entre as células, respectivamente) e integridade de membrana celular utilizando-se o filtro para o espectro do vermelho (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

#### **4.7.1.2 Análise de conteúdo e fragmentação de DNA (Ciclo Celular)**

Esse teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA. A análise do conteúdo de DNA revela a ploidia celular e provê informações sobre em que fase do ciclo encontra-se uma célula e, ainda, permite estimar a frequência de células apoptóticas, as quais são caracterizadas pelo conteúdo de DNA fragmentado. A distribuição das células dentro das principais fases do ciclo celular é baseada em diferenças no conteúdo de DNA entre a fase pré-replicativa ( $G_{0/1}$ ), as células que realmente apresentam o DNA replicado (S) e a fase pós-replicativa e mitótica ( $G_{2+M}$ ) (DARZYNKIEWICZ et al., 2010).

Inicialmente, a membrana plasmática das células foi permeabilizada por um detergente, permitindo que o iodeto de propídeo ligue-se ao DNA de todas as células. Células com o núcleo íntegro emitirão alta fluorescência, e aquelas que apresentam núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos o iodeto de propídeo e por isso emitem menor fluorescência. Além disso, o IP se intercala proporcionalmente à quantidade de DNA da célula, permitindo mensurar as fases do ciclo celular por meio da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo.

Uma alíquota de 100  $\mu$ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100  $\mu$ L de uma solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de Triton X-100 e 2  $\mu$ g/mL iodeto de propídeo em PBS). Após o período de incubação por 40 minutos no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

Os gráficos do ciclo celular foram analisados no programa ModFit LT (Verity Software House).

#### 4.7.1.3 Avaliação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V

A translocação da fosfatidilserina (PS), um fosfolípídeonormalmente localizado na face interna da membrana plasmática, para a face externa da célula é um evento associado aos primeiros estágios do processo de apoptose. Este ensaio permite diferenciar células viáveis, apoptóticas e necróticas pela coloração diferencial por fluorescência. Anexina-V é uma proteína com alta afinidade por PS e que, conjugada à ficoeritina (PE, do inglês Phycoerythrin), emite fluorescência amarela quando ligada, possibilitando a identificação de células em apoptose.

O corante 7-AAD penetra as membranas celulares desintegradas e se liga ao núcleo, emitindo fluorescência vermelha. A estratégia da coloração dupla fornecida pelo reagente Guava<sup>®</sup> Nexin permite a identificação de quatro populações distintas: células sem marcação são consideradas normais (ou viáveis); células com coloração amarela são tidas como em apoptose inicial; células vermelhas são consideradas necróticas (debris); e células reconhecidas pelos dois corantes são identificadas como em apoptose tardia, pois, nos estágios finais, as membranas das células apoptóticas perdem a integridade.

Após o tratamento por 48 horas, uma alíquota de 100 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 µL da solução de Guava Nexin<sup>®</sup> (Guava Technologies). Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro, as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo. A fluorescência da anexina V conjugada com a ficoeritina foi mensurada por fluorescência amarela a 583nm e o 7AAD na fluorescência vermelha a 680nm. As percentagens de células viáveis e de células em apoptose inicial e tardia foram calculadas.

#### 4.8 Monitoramento dinâmico da proliferação e viabilidade celular em tempo real - XCelligence System

O uso de ensaios *in vitro* com células é crucial para o entendimento da eficácia, especificidade, permeabilidade, solubilidade, estabilidade e mecanismo de ação da interação entre uma substância e seus alvos celulares, porém, a maioria desses ensaios apresentam várias limitações. Entre elas estão passos que envolvam a lise ou fixação celular, levando a

uma possível diminuição do controle da viabilidade celular antes e depois do tratamento. Outro fator importante é que alguns desses ensaios podem prover uma informação limitada sobre o mecanismo de interação da droga com seus alvos celulares.

O XCELLigance System RTCA DP (*Dual Plate*) permite uma monitoração dinâmica e livre da proliferação e viabilidade celular em tempo real. Esse equipamento é capaz de quantificar a proliferação e viabilidade de células aderidas em tempo real utilizando um sistema eletrônico de leitura, denominado impedância. As células são plaqueadas em placas de 16 poços que contêm sensores microeletrônicos. A interação das células com esses biosensores eletrônicos geram uma resposta de impedância que não apenas indica o status de viabilidade celular como também correlaciona com o número de células no poço.

A medição da impedância não é um processo invasivo, fazendo com que as células permaneçam em seu mais normal estado fisiológico durante o ensaio de proliferação e citotoxicidade. Resumidamente, a técnica permite a avaliação da proliferação, viabilidade e morte nas células.

Seguindo as sugestões do fabricante, foi realizada uma curva de concentração de células para a escolha do número de células ideal para o experimento. Para tal, as células NCI-H460 foram plaqueadas nas E-plates de 16 poços em concentrações que variaram de  $4 \times 10^5$  a  $6,25 \times 10^4$  células/mL. A aderência, a disposição e proliferação das células foram monitoradas a cada 30 minutos utilizando o RT-DP system. A proliferação celular foi monitorada por 48-72 horas. Após o final dessa etapa, o número de células por poço foi escolhido baseado no Index celular máximo encontrado, chegando à concentração ótima de  $4 \times 10^3$  células/poço.

O número de células/poço selecionado foi plaqueado em 190  $\mu$ L de meio na placa. A aderência, disposição e proliferação das células foi monitorada a cada 30 minutos pelo sistema *RT-DP*. Aproximadamente 24 horas depois do plaqueamento, quando as células estavam em sua fase de crescimento logarítmica, as células foram tratadas com 10  $\mu$ L dos compostos dissolvidos em meio de cultura. As células do controle foram tratadas com DMSO em concentração final abaixo de 0,2% assim como em todas as amostras utilizadas.

O resultado de impedância celular foi expresso como uma unidade arbitrária chamada de Índice Celular (do inglês, *Cell Index*). O índice celular de cada ponto foi definido como  $(R_n - R_b) / 15$ , onde  $R_n$  é a impedância do poço com célula e  $R_b$  é a impedância do poço apenas com o meio. As curvas de crescimento foram comparadas para uma possível elucidação do mecanismo de citotoxicidade.

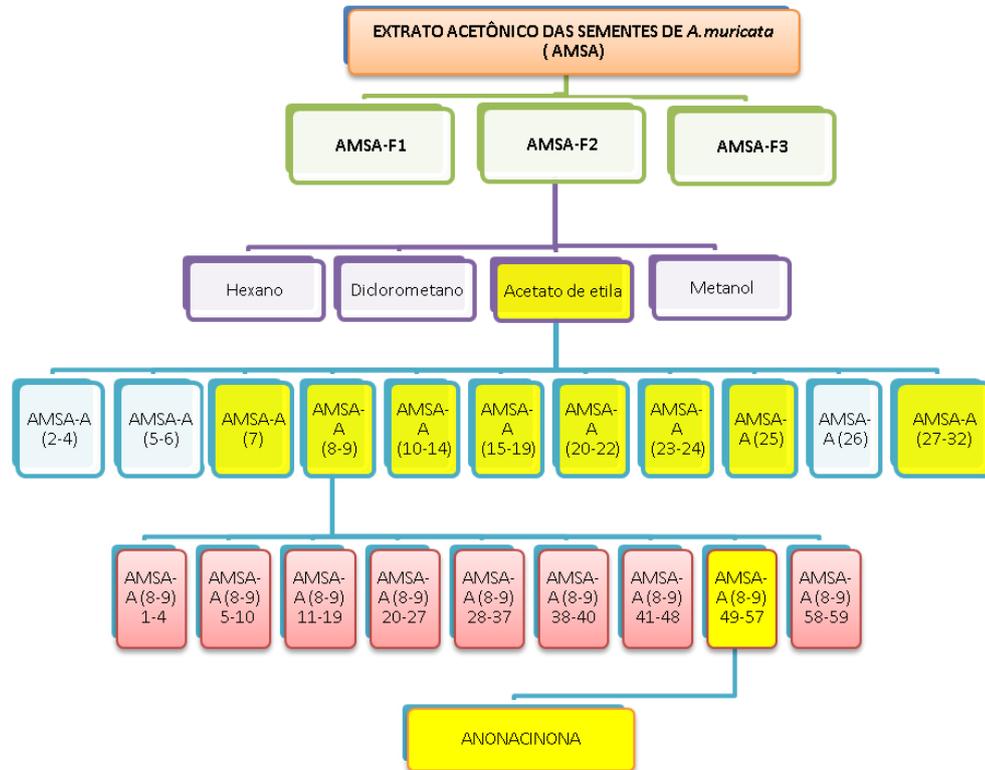
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Fracionamento bioguiado de AMSAF2

Foi utilizada a Fase 2 (AMSAF2) do extrato acetônico das sementes (44g), equivalente a 9% do extrato total. A mesma foi submetida a uma cromatografia filtrante em coluna aberta utilizando géis de sílica como fase estacionária, o que resultou em quatro frações com polaridades distintas: fração hexânica (AMSA-H), fração diclorometano (AMSA-D), fração acetato de etila (AMSA-A) e fração metanólica (AMFA-M). O fracionamento foi guiado pelo ensaio de citotoxicidade (MTT) do extrato acetônico das sementes de *A. muricata*, apresentado na Figura 10. Abaixo, encontram-se descrita as etapas principais do fracionamento, que resultou no isolamento da acetogenina denominada annonacinona.

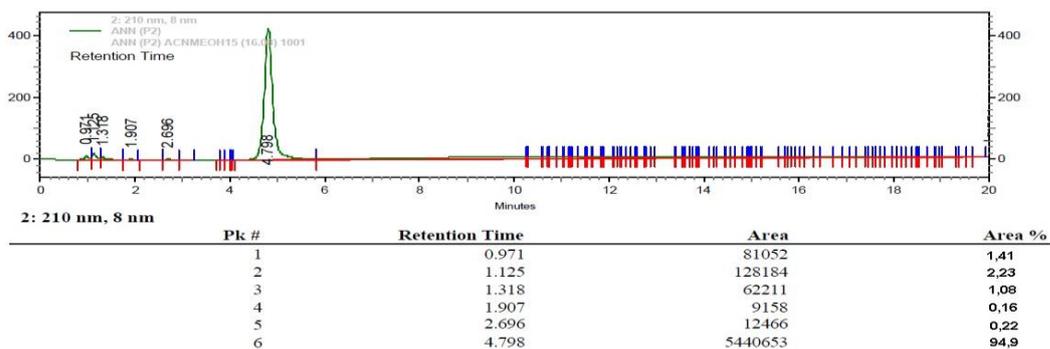
A escolha da fração a ser cromatografada após o fracionamento foi obtida com base nos efeitos citotóxicos. Para determina-la, amostras em concentrações únicas de 25 µg/mL que tiveram efeito inibitório maior que 75% sobre o crescimento das células tumorais, foram selecionadas para prosseguir o fracionamento e determinar a concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) através de diluições seriadas da amostra. Obtiveram destaque a fração AMSA-A e suas sub-frações AMSA-A (8-9) e AMSA-A (8-9) 49-57.

**Figura 10.** Etapas do fracionamento bioguiado pelo ensaio de citotoxicidade (MTT) do extrato acetônico de *A. muricata*. As frações em destaque apresentaram maior atividade antiproliferativa.



A fração AMSA-A (8-9) 49-57 foi submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para purificação da amostra e análise do perfil químico da mesma. O cromatograma evidenciou um pico majoritário apresentando um grau de pureza de 94,9%, conforme visualizado na Figura 11. Após essa determinação, uma amostra foi encaminhada para determinação estrutural do composto majoritário através de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , espectrometria de massa e de infravermelho e o restante do material foi direcionado para os testes *in vitro*.

**Figura 11.** Cromatograma analítico da fração AMSA-A (8-9) 49-57 purificada.



As frações provenientes da cromatografia filtrante foram submetidas à avaliação da atividade citotóxica *in vitro* através do ensaio do MTT frente às linhagens celulares tumorais humanas OVCAR-8, HCT-116 e SF-295 em concentração única 25µg/mL. A fração AMSA-H apresentou uma inibição da proliferação celular inferior a 75% sendo, portanto descontinuada das etapas posteriores.

As demais frações foram submetidas a diluições seriadas a fim de determinar os valores de concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) em linhagens tumorais HL-60, HCT-116 e SF-295. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo no estudo. Os valores de CI<sub>50</sub> após 72 horas de tratamento estão apresentados na Tabela 3. Dentre as frações testadas, AMSA-A apresentou o menor valor de CI<sub>50</sub> com alta citotoxicidade frente as linhagens, sendo escolhida para continuidade do fracionamento.

**Tabela 3.** Concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) avaliadas através do método do MTT após 72 horas de incubação das frações AMSA-D, AMSA-A, AMSA-M.

FRAÇÕES	CI <sub>50</sub> (µg/mL)		
	Intervalo de confiança de 95%		
	HL-60	HCT-116	SF-295
AMSA-D	0,61 (0,2 - 1,5)	0,001 (0,0003 - 0,004)	0,43 (0,1719 - 1,100)
AMSA-A	0,01 (0,001 - 0,16)	0,0005 (0,00004- 0,003)	0,001 (0,0002 - 0,006)
AMSA-M	1,1 (0,8 - 1,5)	0,009 (0,001 - 0,05)	0,001 (0,0002 - 0,01)
Doxorrubicina	0,02 (0,01-0,02)	0,12 (0,09 - 0,17)	0,24 (0,2-0,27)

NT: Não testado. Os valores de CI<sub>50</sub> estão apresentados em µg/mL e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Software versão 6.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses.

No seguimento do estudo bioguiado a fração AMSA-A, foi fracionada em coluna empacotada com sílica gel e eluída com diferentes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, seguindo a ordem crescente de polaridade. O fracionamento supracitado resultou em 32 frações que foram analisadas e comparadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e então reunidas em 11 sub-frações

denominadas de AMSA-A (1 a 32) por apresentarem o mesmo perfil de separação. Não foi dada continuidade com a fração AMSA-A (1) por apresentar material insuficiente.

As misturas das frações foram submetidas ao ensaio do MTT em concentração única de 25 µg/mL em linhagens tumorais OVCAR-8, HCT-116 e SF-295. As frações AMSA-A (2-4); (5-6) e (26) apresentaram inibição de proliferação celular inferior a 75% em pelo menos duas das linhagens testadas e por isso foram eliminadas. As demais frações foram submetidas novamente ao ensaio do MTT para a determinação da  $CI_{50}$  frente às linhagens tumorais HCT-116 e HL-60, conforme tabela 4.

**Tabela 4.** Avaliação da atividade citotóxica das frações AMSA-A frente a linhagens de células tumorais HCT-116 e HL-60 através do ensaio do MTT após 72 horas de incubação.

FRAÇÕES	$CI_{50}$ (µg/mL)	
	Intervalo de confiança de 95%	
	HCT-116	HL-60
AMSA-A (7)	0,33 (0,23 - 0,48)	1,04 (0,76 - 1,43)
AMSA-A (8-9)	0,02 (0,008 - 0,03)	0,08 (0,06 - 0,1)
AMSA-A (10-14)	0,12 (0,07 - 0,2)	0,97 (0,77 - 1,2)
AMSA-A (15-19)	0,43 (0,3 - 0,62)	0,2 (0,11 - 0,35)
AMSA-A (20-22)	1,13 (0,85 - 1,5)	0,79 (0,61 - 1,03)
AMSA-A (23-24)	0,89 (0,63 - 1,26)	0,18 (0,15 - 0,2)
AMSA-A (25)	0,32 (0,24 - 0,43)	0,19 (0,14 - 0,27)
AMSA-A (27-32)	1,164 (0,9 - 1,5)	3,727 (2,3 - 6)
Doxorrubicina	0,02 (0,01-0,02)	0,12 (0,09 - 0,17)

Os valores de  $CI_{50}$  estão apresentados em µg/mL e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Software versão 6.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses. A doxorrubicina foi usada como controle positivo.

Dentre as frações testadas a fração AMSA-A (8-9) apresentou o melhor resultado na avaliação antiproliferativa com o menor valor de  $IC_{50}$ , sendo assim, escolhida para o prosseguimento do fracionamento fitoquímico.

A fração AMSA-A (8-9), com massa de 1,44 g foi solubilizada em hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puro ou em mistura binária, seguindo a ordem crescente de polaridade, sendo obtidas a partir dela 59 novas frações. Após análise por CCDA, foram reunidas em nove frações e que foram posteriormente submetidas ao ensaio do MTT para avaliação do efeito antiproliferativo *in vitro* contra as linhagens celulares tumorais HCT-116 e HL-60. Os valores de  $CI_{50}$  após 72 horas de tratamento estão apresentados na tabela 5. A fração AMSA-A (8-9) 1-4 foi abolida por não apresentar quantidades suficientes.

**Tabela 5.** Avaliação da atividade citotóxica das frações AMSA-A (8-9) frente a linhagens de células tumorais HCT-116 e HL-60 através do ensaio do MTT após 72 horas de incubação.

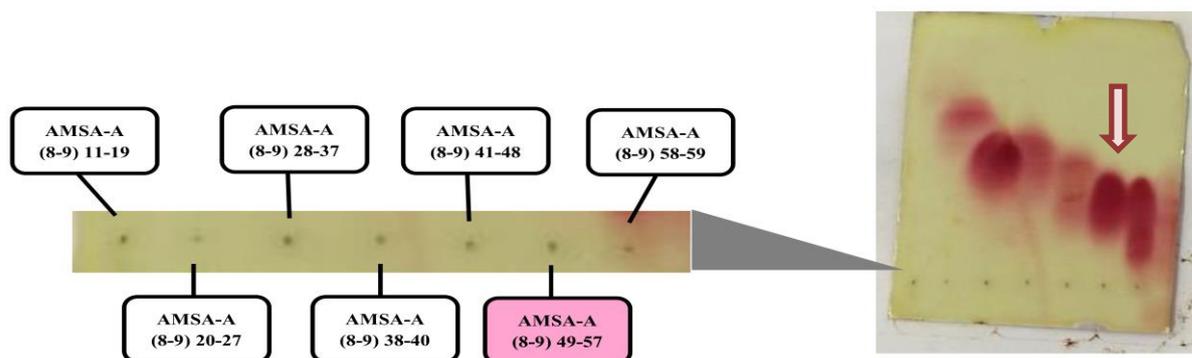
FRAÇÕES	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Intervalo de confiança de 95%	
	HCT-116	HL-60
AMSA-A (8-9) 5-10	2,0 (1,2 - 3,4)	>5
AMSA-A (8-9) 11-19	3,7 (2,4 - 5,6)	2,0 (1,5 - 2,8)
AMSA-A (8-9) 20-27	0,45 (0,3 - 0,6)	0,23 (0,15 - 0,35)
AMSA-A (8-9) 28-37	0,12 (0,08 - 0,17)	1,5 (1,1 - 1,9)
AMSA-A (8-9) 38-40	0,23 (0,16 - 0,3)	>5
AMSA-A (8-9) 41-48	0,8 (0,6 - 1,1)	2,0 (1,4 - 3,0)
AMSA-A (8-9) 49-57	1,2 (0,9 - 1,8)	2,2 (1,8 - 2,7)
AMSA-A (8-9) 58-59	1,7 (1,2 - 2,3)	1,0 (0,6 - 1,8)
<b>Doxorrubicina</b>	0,02 (0,01-0,02)	0,12 (0,09 - 0,17)

Os valores de  $CI_{50}$  estão apresentados em  $\mu\text{g/mL}$  e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Software versão 6.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses. A doxorrubicina foi usada como controle positivo.

As frações AMSA-A (8-9) 20-27; 28-37; 41-48; 49-57 e 58-59 apresentaram os melhores resultados na atividade citotóxica. Em virtude disso, foi empregado um revelador Kedde a fim de avaliar qualitativamente o perfil das acetogeninas presentes em cada fração, apresentando como resultado positivo o desenvolvimento de coloração rósea (Figura 12).

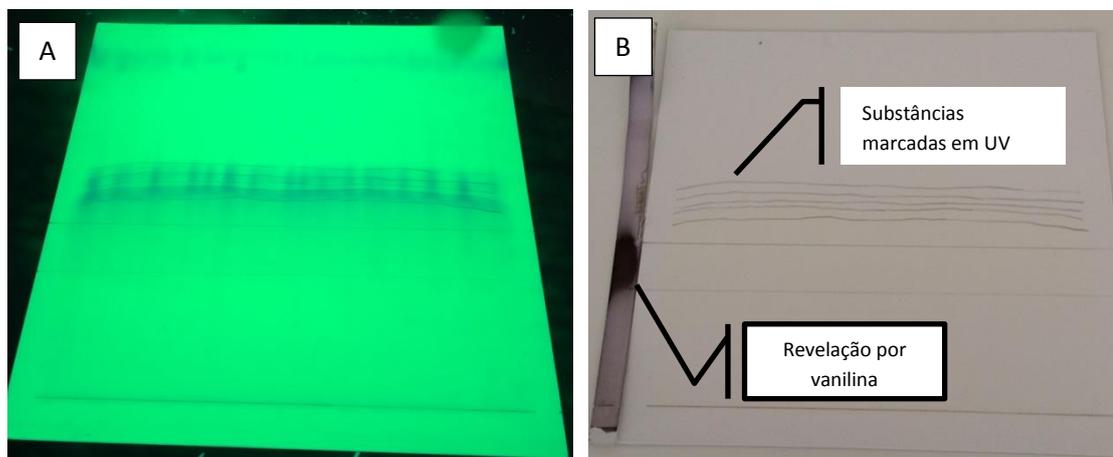
Por apresentar uma distribuição mais condensada, homogênea e coloração mais intensa, a fração AMSA-A (8-9) 49-57 foi escolhida para prosseguir à purificação da amostra. Vale ressaltar que quanto mais extenso é o arraste através cromatografia de camada delgada, maior a quantidade de constituintes químicos presente naquela amostra, dessa forma, quanto mais condensada ela for, mais fácil se torna o isolamento por apresentar um perfil mais purificado.

**Figura 12.** Revelador Kedde para acetogeninas frações AMSA-A (8-9): 11-19; 20-27; 28-37; 38-40; 41-48; 49-57; 58-59.



Conforme Figura 13A e B, o resultado da fração AMSA-A (8-9) 49-57 através da placa preparativa para cromatografia em camada delgada apresentou visualização de algumas bandas por meio da exposição destas à radiação UV (254 nm), bem como uma mancha marrom escura bem delimitada não visível na câmera de luz ultravioleta por meio da pulverização de vanilina seguido de aquecimento em estufa para revelação. Foi realizada a raspagem dessa faixa na placa por acreditarmos ser a acetogenina evidenciada na revelação por Kedde. Clorofórmio foi adicionado a fim de solubilizar as substâncias impregnadas na sílica seguido de filtragem.

**Figura 13.** Placa de cromatografia em camada delgada. A) revelação em UV 254nm B) Revelação por vanilina.



Após a evaporação do solvente a amostra foi ressuspensa em solventes apropriados para realização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), filtrada em membranas FH (fluopore) em PTFE (teflon) 0,5 $\mu$ m e purificadas através de CLAE (Figura 13). Após a purificação, o tratamento cromatográfico do extrato acetônico da fração AMSA-A (8-9) 49-57 forneceu uma substância com aparência de sólido branco, que foi encaminhada para análise estrutural por RMN e IV.

A fração AMSA-A (8-9) 58-59 que apresentou excelente valor de  $CI_{50}$  na avaliação da atividade citotóxica foi submetida à avaliação de perfil cromatográfico em CLAE a fim de verificar se tratava de outra acetogenina, entretanto o cromatograma evidenciou ser a mesma acetogenina presente na fração AMSA-A (8-9) 49-57.

## **5.2 Elucidação estrutural e identificação química da acetogenina annonacinona presente na fração AMSA-A (8-9) 49-57**

A annonacinona foi isolada a partir do extrato acetônico das sementes da *Annona muricata* e apresentou-se como uma graxa de cor parda. Os dados obtidos pela espectrometria de massa, infravermelho e ressonância magnética nuclear (em anexo C) foram analisadas e interpretadas pelos químicos Dr. Cláudio Costa dos Santos juntamente com Dra. Selene Maia de Moraes.

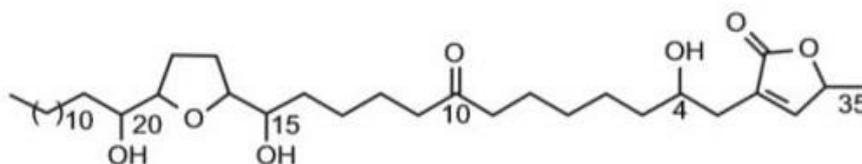
Os resultados provenientes da ressonância magnética nuclear foram comparados associando os valores químicos de cada carbono com os valores de RMN da annonacinona descrito na literatura, conforme Tabela 5.

A correlação dos dados encontrados na literatura e os achados provenientes do estudo foram determinantes para a identificação do composto isolado na fração AMSA-A (8-9) 49-57, sendo esta uma acetogenina denominada annonacinona, nome IUPAC: (2S)-4-[(2R,13R)-2,13-dihydroxy-13-[(5R)-5-[(1R)-1-hydroxytridecyl]oxolan-2-yl]-8-oxotridecyl]-2-methyl-2H-furan-5-one; purificada por CLAE (94% de pureza), apresentando como características físico-químicas um composto sólido amorfo de cor branca, de fórmula molecular  $C_{35}H_{62}O_7$ , peso molecular 594.874 g/mol e estrutura química representada na Figura 14.

Apesar de não ser uma molécula inédita, o presente estudo é pioneiro na avaliação da atividade citotóxica da annonacinona frente a linhagens tumorais distintas.

**Tabela 5.** Comparação dos dados de RMN  $^{13}C$ -BB [125 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ] do composto AMSA-A (8-9) 49-57 e da annonacinona descrito na literatura (VILA-NOVA, 2011).

#C	AMSA-A (8-9) 49-57	Annonacinona
1	174,00	174,08
2	131,28	134,45
3	26,01	25,31
4	29,14	27,55
5	29,16-30,39	28,97-29,92
6-7	29,16-30,39	28,97-29,92
8	24,49	23,97
9	42,88	42,99
10	211,00	211,55
11	42,75	42,91
12	26,08	25,32
13	26,36	25,47
14	33,70	33,45
15	74,33	74,15
16	83,37	82,79
17-18	29,14	29,01
19	83,44	82,89
20	74,15	74,00
21	33,93	33,70
22	26,36	25,80
23-29	29,16-30,39	28,97-29,92
30	32,51	32,12
31	23,20	22,89
32	14,24	14,32
33	152,82	149,15
34	78,19	77,62
35	19,21	19,42

**Figura 14.** Estrutura química da annonacinona

### 5.3 Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica da annonacinona

O efeito citotóxico da annonacinona foi avaliado em um amplo painel de células tumorais e não tumorais utilizando o método colorimétrico do MTT em concentrações que variaram de 0,04 a 5  $\mu\text{M}$ , após 72 horas de incubação. A doxorrubicina e a rotenona foram utilizadas como controle positivo. Os valores de concentração inibitória média ( $\text{CI}_{50}$ ) estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Potencial citotóxico da annonacinona em linhagens humanas tumoral e não-tumoral avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h de incubação.

LINHAGENS	$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )			
	Intervalo de confiança de 95%			
	Annonacinona	Doxorrubicina	Rotenona	
TUMORAIS	<b>HCT-116</b>	2,3 (1,8 - 3,0)	0,2 (0,17 - 0,23)	0,38 (0,31 - 0,46)
	<b>HEPG2</b>	1,8 (1,3 - 2,7)	0,48 (0,44 - 0,53)	>5
	<b>HL-60</b>	>5	0,02 (0,02 - 0,027)	0,21 (0,19 - 0,24)
	<b>NCI-H460</b>	0,24 (0,2 - 0,3)	0,49 (0,42 - 0,56)	0,005 (0,0018 - 0,015)
	<b>PC3</b>	>5	0,78 (0,67 - 0,89)	0,63 (0,52 to 0,75)
	<b>PC9</b>	>5	0,59 (0,48 - 0,7)	0,87 (0,72 - 1,1)
	<b>SF-295</b>	0,19 (0,1 - 0,2)	0,29 (0,25 - 0,3)	0,4 (0,27 - 0,6)
	<b>SNB-19</b>	>5	1,7 (1,3 - 2,2)	>5
	<b>SW620</b>	3,7 (3,0 to 4,6)	0,83 (0,7 - 0,97)	0,59 (0,36 - 0,51)
	<b>NÃO-TUMORAL</b>	<b>L929</b>	>5	0,16 (0,15 - 0,17)

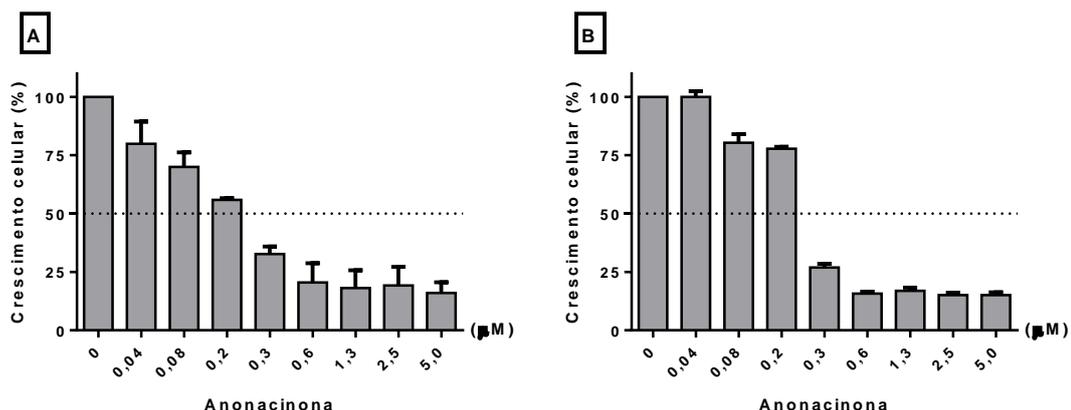
Os valores de  $\text{CI}_{50}$  estão apresentados em  $\mu\text{M}$  e foram calculados a partir de regressão não

linear utilizando o programa Prisma versão 6.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses.

O estudo do perfil antiproliferativo da anonacinona mostrou potente atividade citotóxica em algumas linhagens de células tumorais, com o menor valor de  $CI_{50}$  de  $0,19 \mu\text{M}$  e o maior de  $3,7 \mu\text{M}$  para linhagens de glioblastoma (SF-295) e cólon (SW-620), respectivamente. Não foi possível mensurar os valores de  $CI_{50}$  do composto contra linhagem de células não tumorais de fibroblastos murino (L929) e em linhagens tumorais leucêmicas (HL-60), de próstata (PC-3), pulmão (PC-9), e cérebro (SNB-19), visto que os valores de  $CI_{50}$  foram maiores que a maior concentração testada ( $5,0 \mu\text{M}$ ).

Pode ser observado que não há um padrão evidente de seletividade por uma determinada origem histológica. Entretanto, deve-se ressaltar que a anonacinona exibiu maior atividade frente às linhagens de glioblastoma (SF-295) e de carcinoma de pulmão (NCI-H460), apresentando perfil semelhante de inibição entre as linhagens após 72 horas de tratamento (Figura 15).

**Figura 15.** Perfil do potencial antiproliferativo da anonacinona frente às linhagens SF-295 (A) e NCI-H460 (B) após 72 horas de tratamento determinado pelo método MTT.



Diante dos resultados acima descritos, foi realizada uma análise temporal da atividade antiproliferativa da anonacinona frente a estas linhagens a fim de avaliar qual das linhagens apresentaria maior sensibilidade à substância em menor tempo de tratamento. Os valores de  $CI_{50}$  foram determinados pelo teste do MTT e estão exibidos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Potencial citotóxico da annonacinona frente às linhagens SF-295 e NCI-H460 após 48 e 72 horas de incubação determinado pelo método MTT.

LINHAGEM	CI <sub>50</sub> (µM)	
	Intervalo de confiança de 95%	
	48 h	72 h
SF-296	>5	0,19 (0,1 - 0,2)
NCI-H460	0,21 (0,18 - 0,24)	0,24 (0,2 - 0,3)

Os valores de CI<sub>50</sub> estão apresentados em µM e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 6.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses.

A annonacinona não apresentou efeito citotóxico frente a linhagem de glioblastoma (SF-295) após tratamento por 48 horas na concentração máxima testada (5,0 µM) através da avaliação por MTT, em contrapartida, apresentou atividade citotóxica independente de tempo de tratamento na linhagem NCI-H460, com valor de CI<sub>50</sub> de 0,2µM, no período de 48 horas e 72 horas de incubação. Desse modo esta linhagem foi escolhida para a continuidade dos estudos e avaliação do perfil citotóxico da annonacinona.

Uma vez determinada a linhagem a ser trabalhada - NCI-H460, fez-se necessário a avaliação da citotoxicidade por uma metodologia diferente a fim de confirmar os resultados obtidos pelo ensaio do MTT. Dessa maneira foi utilizado o ensaio do SRB, que consiste na quantificação colorimétrica das proteínas celulares.

Foi realizada uma análise temporal da atividade citotóxica da annonacinona utilizando concentrações seriadas, após 24, 48 e 72 horas de tratamento através do método do MTT e do SRB (tabela 8).

**Tabela 8.** Potencial citotóxico frente à linhagem NCI-H460 após 24, 48 e 72 horas de incubação determinado pelos métodos MTT e SRB.

TEMPO	CI <sub>50</sub> (µM)					
	Intervalo de confiança de 95%					
	MTT			SRB		
	ANN	DOX	ROT	ANN	DOX	ROT
<b>24 h</b>	4,4 (4,0 - 4,7)	0,5 (0,45 - 0,6)	0,44 (0,4 - 0,5)	>10	0,34 (0,29 - 0,4)	ND
<b>48 h</b>	0,21 (0,18 - 0,24)	0,4 (0,38 - 0,48)	0,04 (0,02 - 0,07)	>10	0,2 (0,13 - 0,26)	4,5 (3,8 - 5,4)
<b>72 h</b>	0,24 (0,2 - 0,3)	0,5 (0,4 - 0,6)	0,005 (0,00 - 0,01)	~ 0,22	~ 0,32	3,3 (2,5 - 4,4)

Os valores de CI<sub>50</sub> estão apresentados em µM e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 6.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses. A doxorubicina e a rotenona foram utilizadas como controle positivo. ND: não determinado; ANN: annonacinona; DOX: doxorubicina; ROT: rotenona.

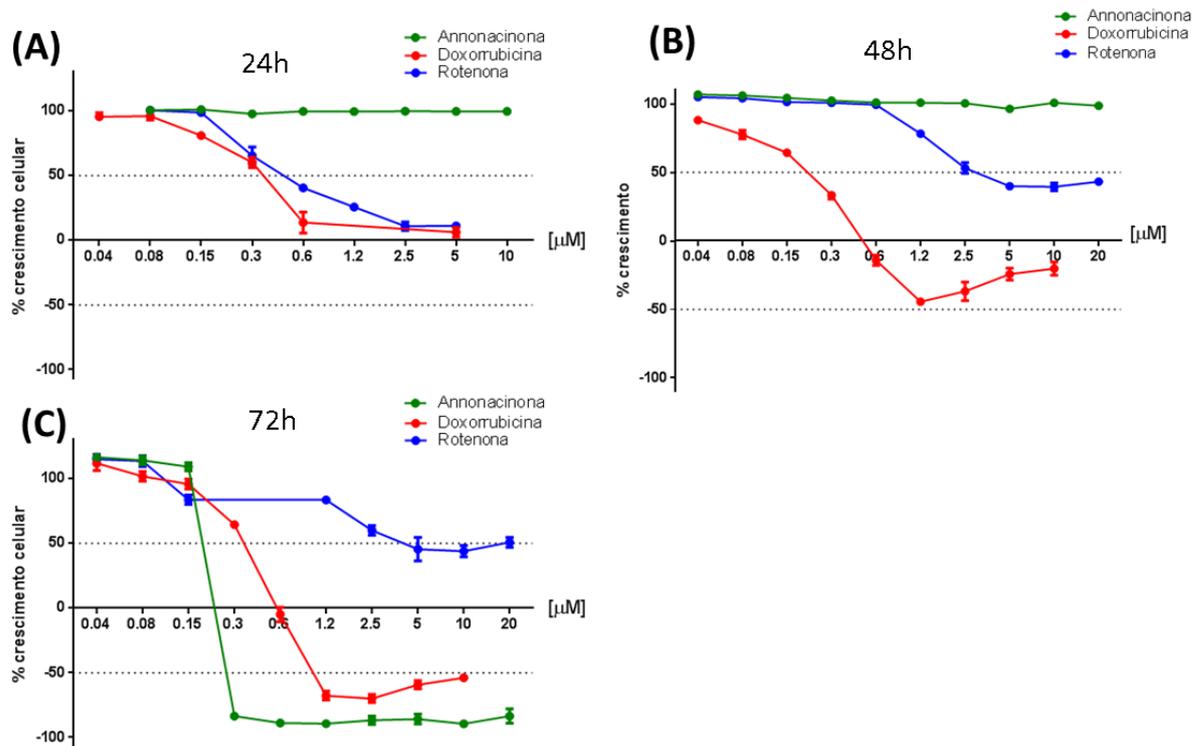
Após 72 horas de tratamento com a annonacinona, tanto no ensaio do MTT quanto o ensaio do SRB, apresentaram a mesma concentração inibitória média de 0,2 µM. Entretanto, não foi possível calcular a CI<sub>50</sub> dos menores tempos de incubação (24 e 48 horas) através do ensaio do SRB, pois a maior concentração testada (10 µM) não foi capaz de inibir ou reduzir o crescimento celular.

Em contrapartida, ao se avaliar a CI<sub>50</sub> dos tempos de incubação de 24 e 48 horas através do ensaio do MTT, o mesmo foi capaz de calcular os valores das concentrações inibitórias médias de 4,4 µM e 0,21 µM respectivamente.

O valor da CI<sub>50</sub> obtida pelo controle positivo rotenona, durante os tratamentos de 48 e 72 horas apresentaram divergências quando comparados os métodos. No tempo de 48 horas exibiu valores de 0,04 µM e 4,5 µM, e para o tempo de 72 horas foram obtidos os valores de 0,005 µM e 3,3 µM para os métodos MTT e SRB respectivamente.

A figura 16A, 16B e 16C representa graficamente o perfil citotóxico da annonacinona frente à linhagem NCI-H460 através do método do SRB nos períodos de 24, 48 e 72 horas respectivamente.

**Figura 16.** Perfil citotóxico da annonacinona frente à linhagem NCI-H460 após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) de tratamento determinado pelo método SRB.



#### 5.4 Avaliação da viabilidade celular da linhagem NCI-H460 tratada com annonacinona pelo ensaio do azul de Trypan

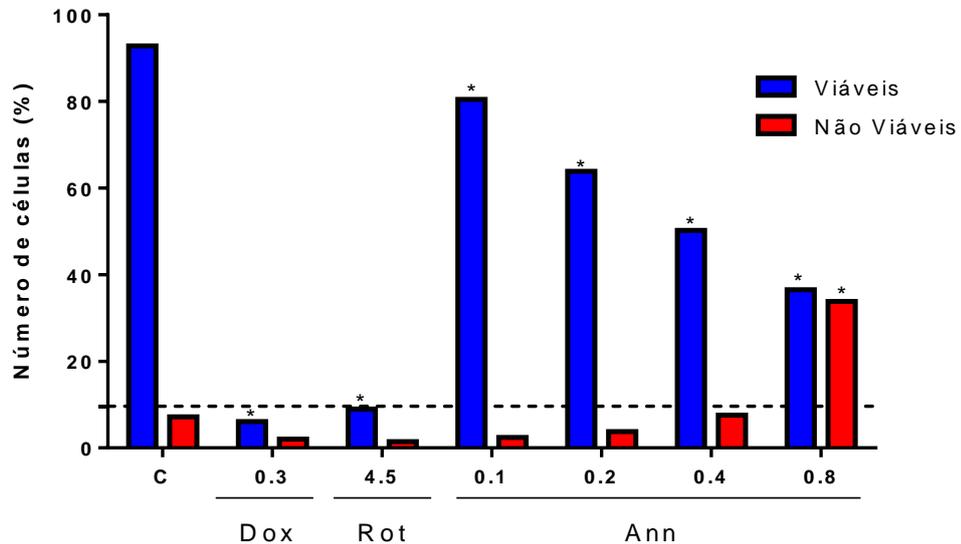
O ensaio de viabilidade celular por exclusão do azul de Trypan foi realizado para quantificar diretamente células viáveis e não viáveis, após 48 e 72 horas de incubação com a annonacinona.

Após 48 horas de tratamento com annonacinona foi possível ver uma redução estatisticamente significativa no número de células viáveis em todas as concentrações testadas 0,1 µM; 0,2 µM; 0,4 µM e 0,8 µM com redução da viabilidade celular em 12,3%; 28,9%; 42,6% e 56,3% respectivamente quando comparado ao controle negativo. Na maior concentração testada (0,8 µM) houve um aumento significativo de 26,6% de células não viáveis em relação ao controle negativo (Figura 17).

Entretanto, após 72 horas de tratamento, mesmo na menor concentração escolhida todas as células apresentavam-se inviáveis. Por esse motivo decidiu-se utilizar apenas o tempo

de 48 horas de tratamento por acreditar ser esse o início dos eventos da atividade citotóxica da molécula.

**Figura 17.** Efeito da annonacinona na viabilidade de NCI-H460 determinado pelo ensaio por exclusão de azul de Trypan após 48 horas de tratamento.



Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido de teste de Newman Keuls. A doxorubicina (0,3  $\mu$ M) e a rotenona (4,5  $\mu$ M) foram utilizadas com o controle positivo. Dox: doxorubicina; Rot: rotenona; Ann: annonacinona.

Os controles positivos doxorubicina 0,3  $\mu$ M e rotenona 4,5  $\mu$ M apresentaram diferenças significativas em relação ao número de células viáveis quando comparadas ao controle negativo, sendo capazes de inibir o crescimento celular com base no fator de plaqueamento ( $5 \times 10^4 = 9,6\%$ ).

## 5.5 Estudo do padrão de morte celular da annonacinona

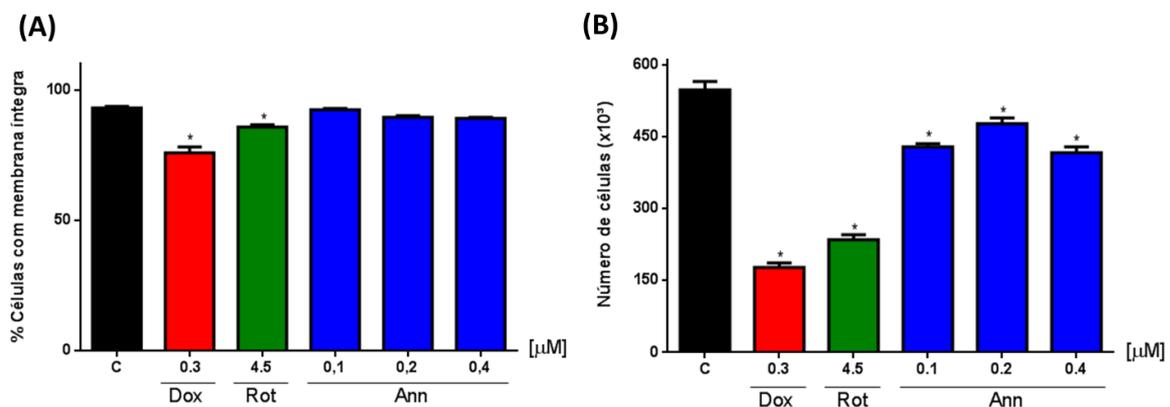
### 5.5.1 Avaliação da integridade da membrana, da densidade das células e do ciclo celular de células NCI-H460 tratadas com annonacinona

Para o estudo do padrão de morte da annonacinona sobre as células NCI-H460, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo para avaliar a integridade da membrana e a

densidade de células, bem como o conteúdo de DNA a fim de verificar a progressão do ciclo celular após o tratamento por 48 horas.

Como observado na Figura 18A, não foram encontradas alterações estatisticamente significativas em nenhuma das concentrações testadas com a annonacinona quanto à integridade da membrana das células. Por outro lado, ao avaliar a densidade celular (Figura 18B), foi observada uma redução de 21,7%; 12,9% e 23,8% do número de células quando comparadas com o controle negativo, com densidade celular de  $428 \times 10^3$ ;  $476 \times 10^3$  e  $416 \times 10^3$  para as concentrações 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,2  $\mu\text{M}$  e 0,4  $\mu\text{M}$  respectivamente. A doxorubicina (Dox) e a rotenona (Rot) alteraram a integridade de membrana das células de forma significativa, com valores de 75,8% e 85,8% respectivamente quanto ao percentual de células com membrana íntegra, representando uma redução de redução de 17,2% e 7,3% respectivamente quando comparadas ao controle negativo além de reduzir a quantidade de células em 67,6% e 57% após tratamento apresentando densidade celular de  $177 \times 10^3$  e  $238 \times 10^3$  respectivamente.

**Figura 18.** Efeito da annonacinona sobre a proliferação celular das células NCI-H460, avaliado pela integridade de membrana (A) e densidade de células (B), determinada por citometria de fluxo.

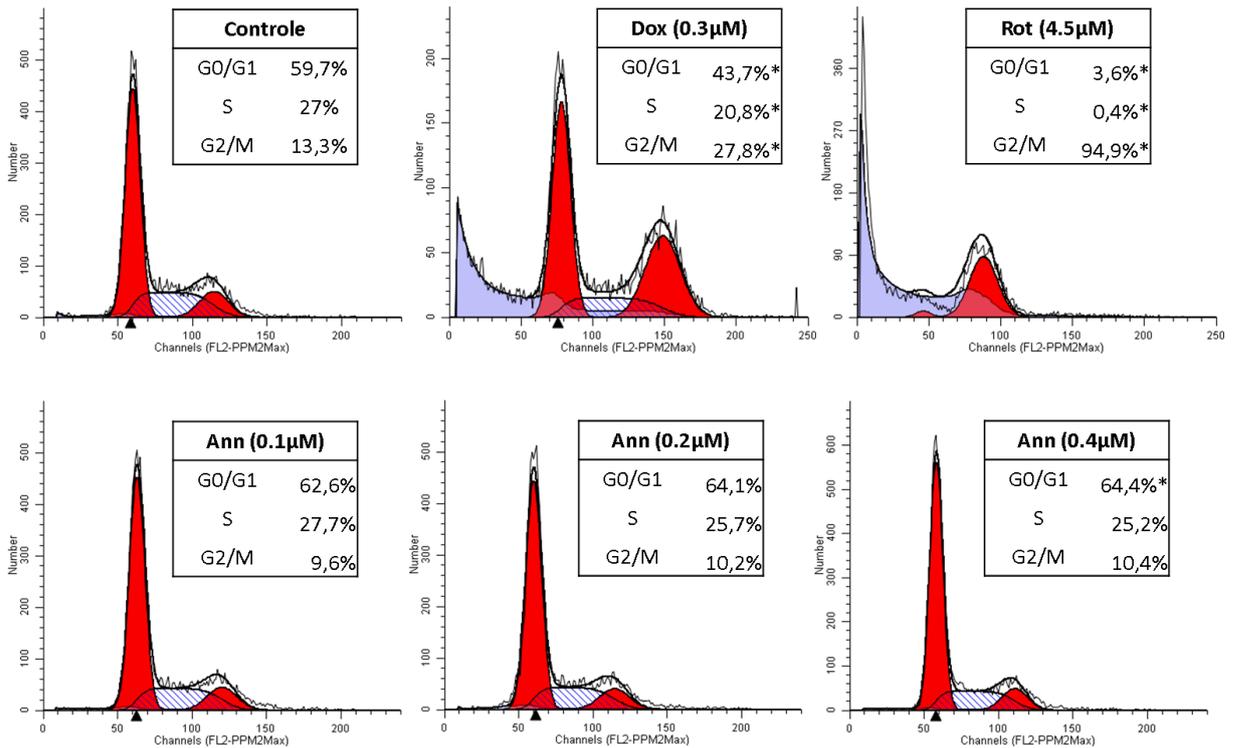


Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido de teste de Tukey.

Na análise do perfil do ciclo celular das células NCI-H460 tratadas com annonacinona por 48 horas, foi possível verificar que apenas na maior concentração testada (0,4  $\mu\text{M}$ ) houve um leve aumento do número de células em fase G0/G1 quando comparado ao controle negativo. Já a doxorubicina (Dox) apresentou um aumento da intensidade da fluorescência

em G2/M, sugerindo a parada do ciclo celular nesse ponto. Enquanto a rotenona (Rot), apresentou uma parada em G2/M de maneira quase totalitária (94,9%) em relação ao controle negativo (Figura 19).

**Figura 19.** Efeito da annonacinona na distribuição das fases do ciclo celular da linhagem NCI-H460 após 48 horas de tratamento.



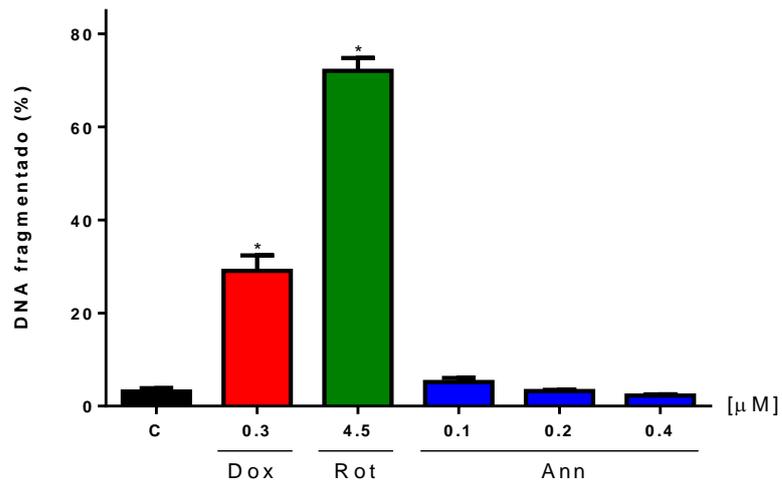
Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o programa ModFit LT. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido de teste de Tukey. Ilustração de uma replicata representativa de cada experimento. Doxorubicina e rotenona foram usadas como controle positivo. Dox: doxorubicina; Rot: rotenona; Ann: annonacinona.

### 5.5.2 Avaliação do padrão de morte celular

A fragmentação do DNA é uma característica presente em vários processos de morte celular. Para avaliar a capacidade da annonacinona de induzir fragmentação de DNA, foi utilizado o mesmo princípio da análise do perfil do ciclo celular. As células com a cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub-G1) incorporam menor quantidade de iodeto de propídeo, e dessa forma, emitem fluorescência mais baixa. Os resultados apresentados na Figura 20 mostraram que a annonacinona não foi capaz de induzir fragmentação

internucleossomal do DNA em nenhuma das concentrações testadas quando comparado com o controle negativo. Nos controles positivos, a rotenona apresentou um maior potencial de fragmentação de DNA em relação à doxorubicina quando ao controle negativo.

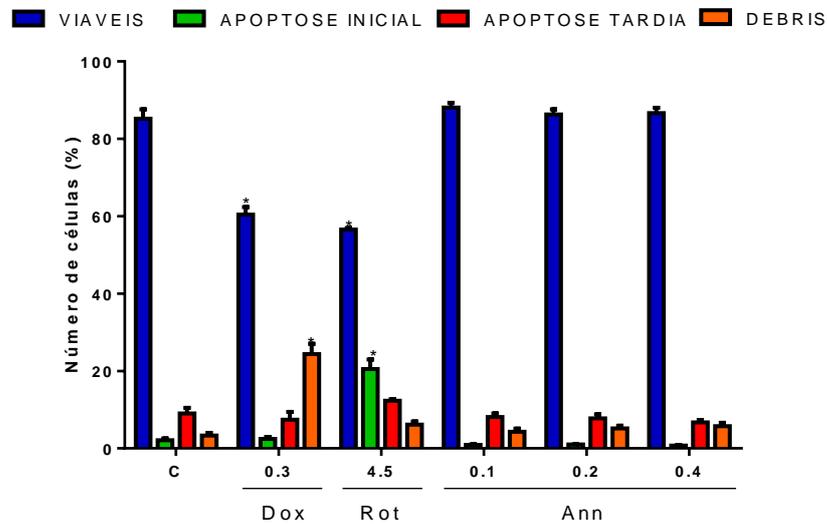
**Figura 20.** Efeito da annonacinona sobre a fragmentação de DNA em células NCI-H460 após 48 horas de incubação.



Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  comparado com o controle, por ANOVA seguido pelo teste Tukey. Dox: doxorubicina; Rot: rotenona; Ann: annonacinona.

Outra forma avaliação do padrão de morte celular é a identificação da externalização da fosfatidilserina - uma das primeiras alterações que ocorrem na via de morte celular apoptótica. A fim de analisar um possível envolvimento do mecanismo de morte celular por apoptose no mecanismo de ação da annonacinona, a externalização da fosfatidilserina foi avaliada por citometria de fluxo após 48 horas de tratamento (Figura 21).

**Figura 21.** Efeito da annonacinona em células NCI-H460 sobre a externalização da fosfatidilserina avaliada por citometria de fluxo após 48 horas de tratamento.



Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o Guava easyCyte. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo três experimentos independentes. \* $p < 0.05$ , comparado com o controle por ANOVA seguido de teste de Tukey. Dox: doxorubicina; Rot: rotenona; Ann: annonacinona.

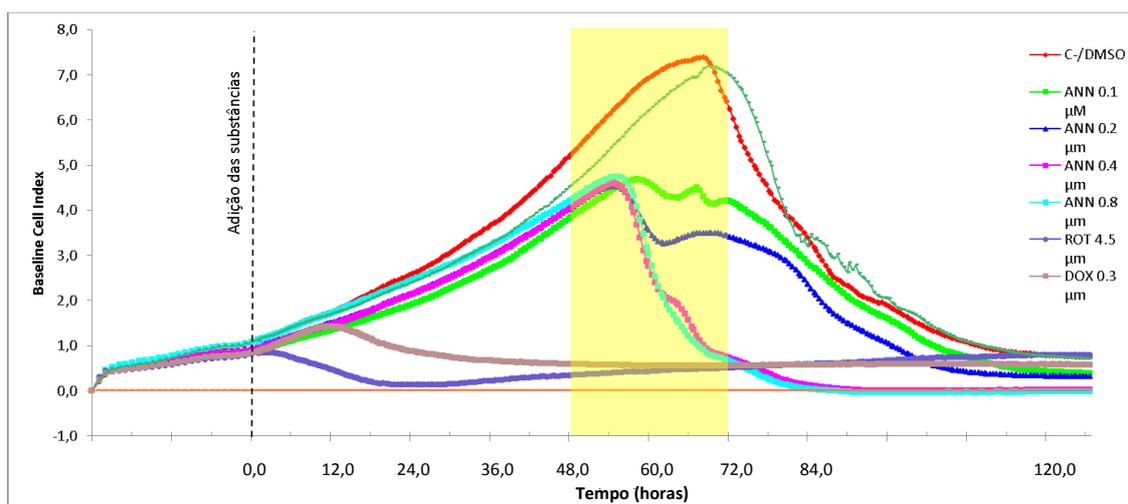
Não foi observado apoptose inicial em nenhuma das concentrações testadas de annonacinona após o tempo de 48 horas de tratamento. De modo surpreendente também não foi observado apoptose inicial no controle positivo doxorubicina, entretanto houve uma redução da porcentagem de células viáveis e aumento significativo na quantidade de debris celular (21,1 %) sugerindo que a concentração testada apresente elevada toxicidade e que após o tempo de tratamento de 48 horas a Anexina V não seja capaz de marcar as células por estas já se apresentarem fragmentadas. A rotenona apresentou um aumento de 18,5% no perfil apoptótico inicial comparando com o controle negativo.

### 5.6 Avaliação da ação da annonacinona sobre a proliferação e viabilidade em células NCI-H460 por xCELLigence

O comportamento cinético das células submetidas ao tratamento com a annonacinona, foi avaliado através do xCELLigence, num período total de incubação de 120 horas. As adições das substâncias foram feitas 24 horas após o plaqueamento.

O programa gerou um gráfico representado na Figura 22, onde é possível ver que a annonacinona inibe o crescimento celular entre os tempos de 48-54 horas, em todas as concentrações testadas quando comparado com o controle negativo apresentando um Index celular máximo de 4,5. As maiores concentrações testadas (0,4 e 0,8  $\mu\text{M}$ ) apresentam o mesmo perfil em relação ao crescimento celular e declínio em seu índice. A menor concentração da annonacinona testada (0,1  $\mu\text{M}$ ) manteve a inibição do crescimento celular após 54 horas, enquanto que a concentração de 0,2  $\mu\text{M}$  apresentou uma redução do índice de células após 54 horas. As células submetidas aos tratamentos com doxorrubicina e rotenona apresentaram efeito citostático padrão. Esse resultado pode estar relacionado aos valores obtidos na citometria de fluxo quanto à parada no ciclo celular.

**Figura 22.** Avaliação da ação da annonacinona sobre a proliferação e viabilidade em células NCI-H460 quando analisadas em tempo real pelo software xCELLigence system.



Foram utilizadas 4000 células para o experimento. Os poços dos controles receberam a mesma concentração de solvente que a amostra na sua maior concentração. A doxorrubicina (Dox, 0,3  $\mu\text{M}$ ) e rotenona (Rot 4,5  $\mu\text{M}$ ) foram utilizadas como controle positivo. Ann: annonacinona.

## 6. DISCUSSÃO

O câncer é o nome dado a um grupo de mais de 100 doenças que atinge o mundo todo e no Brasil, é a segunda maior causa de mortes em adultos (INCA 2016). Compartilham características de mutações ou alterações genéticas que podem ser resultados de variados fatores, sejam eles intrínsecos (mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA) ou extrínsecos (dano e instabilidade genética induzida por radiação, por substâncias químicas ou por infecção viral) (TANNOCK, 2005). Alterações como autossuficiência em sinais de proliferação, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, e invasão tecidual e metástase são fundamentais na fisiologia celular tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

A utilização de produtos naturais como terapia farmacológica para o tratamento de várias doenças tem longa tradição pela população brasileira. Muitas drogas que são atualmente utilizadas na quimioterapia foram isoladas de determinadas espécies de plantas ou derivadas de um protótipo natural (LOPEZ, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2012). Nesse cenário a família *Annonaceae* apresenta destaque pela variada atividade biológica e especialmente pela produção de acetogeninas, metabólitos secundários exclusivos da espécie com evidenciada atividade antitumoral (ALALI *et al.*, 1999). A produção de metabólitos secundários é influenciada pelo ambiente no qual o vegetal se desenvolve e os tipos de cultivo (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; SOUSA FILHO *et al.*, 2011). A espécie *A. muricata*, conhecida popularmente como gravioleira é uma das espécies mais estudadas do gênero quanto à atividade citotóxica e antitumoral, nesse contexto o trabalho objetivou o fracionamento bioguiado do extrato acetônico das sementes de *A. muricata* através da avaliação da citotoxicidade *in vitro* a fim de isolar o composto responsável pelo seu efeito.

Após o fracionamento por cromatografia em coluna filtrante do extrato acetônico bruto fase 2, quatro frações foram geradas (AMSA-H; AMSA-D; AMSA-A e AMSA-H) e submetidas à avaliação citotóxica contra três linhagens distintas de células tumorais (OVCAR-8; HCT-116 e SF-295) por concentração única e em diluições seriadas. Foi possível observar que a fração AMSA-H apresentou um percentual de inibição na concentração única (25µg/mL) inferior a 75%, sendo assim descontinuada das etapas posteriores. O hexano é um solvente bastante apolar, dessa maneira os componentes do extrato que apresentarem esse mesmo perfil químico irão interagir com ele e serão arrastados. O resultado é uma fração que

se caracteriza pelo grande número de moléculas apolares como óleos e ácidos graxos, justificando o efeito não satisfatório da avaliação citotóxica.

Já as demais frações, que apresentam gradativos aumentos de polaridade, possuem a capacidade de melhor adsorver a fase estacionária, e conseqüentemente interagir de maneira maior com as substâncias presentes na amostra sendo capazes de arrasta-las. O resultado disso é evidenciado na determinação da concentração inibitória média, o qual as frações AMSA-D; AMSA-A; AMSA-M apresentaram resultados excepcionais, com ênfase na fração AMSA-A que apresentou altíssima potência na ordem de nanograma (0,5ng/mL). Como dito anteriormente, *A.muricata* apresenta em sua composição diversos compostos fitoquímicos com evidenciadas atividades biológicas, como flavonoides, alcaloides, terpenos e acetogeninas, dessa forma quanto menos purificada for a fração, maior a quantidade desses compostos na amostra e maior o seu potencial terapêutico por atuarem de maneira sinérgica e/ou em adição .

OLIVEIRA (2012) evidenciou o potencial citotóxico do extrato acetônico obtido das folhas de *A. muricata* na ordem de ng/mL frente a linhagens leucêmicas (HL-60 e K-562), cânceres de cólon (HCT-8 e HCT-116) e glioblastoma (SF-295). Utilizando extrato acetônico de sementes de *A. muricata*, RIOS (2013), observou distinta atividade citotóxica frente a linhagens tumorais HL-60, SF-295, OVCAR-8 e HCT-116 com valores de  $CI_{50}$  que variaram de 0,06 a 0,19  $\mu\text{g/mL}$ . Através de fracionamento químico, BARRETO (2014), evidenciou potente atividade citotóxica de frações acetato de etila (AMFA-A) e metanólica (AMFA-M) provenientes de extrato acetônico das folhas de *A. muricata* frente a linhagens SF-285, HL-60, HCT-116, OVCAR-8, com destaque para a fração AMFA-A que apresentou os menores valores de  $CI_{50}$ . SILVA e colaboradores (2015) avaliaram a atividade citotóxica do extrato etanólico da casca do caule e de folhas da *A. muricata*, evidenciando potencial citotóxico em ambas as amostras quando testadas em linhagens SF-295, OVCAR-8, HCT-116 e HL-60, com valores de  $CI_{50}$  que variaram de 12,8 a 22,6  $\mu\text{g/mL}$  e 7,6 a 0,09  $\mu\text{g/mL}$  para os extratos da folha e da casca do caule, respectivamente. ARTANTI, ASTIRIN & PRAYITNO (2016), avaliaram a atividade citotóxica de diferentes frações do extrato etanólico das folhas de *A.muricata* com resultados positivos para e linfoblastos (Raji) e células de câncer cervical (Hela); MOGHADAMTOUSI e colaboradores (2014), demonstraram em estudo relevante atividade citotóxica do extrato acetato de etila das folhas da *A. muricata* em células de pulmão (A549) relacionando esse efeito à apoptose mediada pela mitocôndria e parada no ciclo celular na fase G1; NAJMUDDIN, e colaboradores (2016) avaliaram o extrato bruto de folhas

de *Annona muricata* em linhagem de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 e 4T1) demonstrando potente atividade citotóxica; Em estudo utilizando o extrato bruto de folhas de *A. muricata*, YANG, LIU & LEE (2016) evidenciaram atividade citotóxica frente linhagens de cólon (HCT-116) e hepatocarcinoma celular (Hep G2).

Todos esses achados corroboram para os excelentes valores encontrados nas  $CI_{50}$  das frações provenientes do extrato das sementes do presente estudo, evidenciando seu potencial citotóxico frente à distintas linhagens tumorais.

O fracionamento guiado pela atividade citotóxica frente às linhagens tumorais através do método do MTT levou ao isolamento de uma acetogenina mono-THF denominada annonacinona, de fórmula molecular  $C_{35}H_{62}O_7$  e de peso molecular de 594 g/mol. A mesma foi testada em painel com diferentes linhagens de células tumorais humana e linhagem não-tumoral a fim de avaliar sua atividade citotóxica, visto que apesar de não ser uma molécula inédita, este trabalho é pioneiro na avaliação de sua atividade citotóxica.

Sabe-se que o mecanismo de ação das acetogeninas envolve o bloqueio da respiração celular aeróbia, por meio de inibição do complexo I da cadeia respiratória, por conta disso, para os testes de citotoxicidade, além da doxorrubicina - fármaco amplamente utilizado na quimioterapia do câncer, a rotenona também foi selecionada como controle positivo. Ela é um pesticida natural utilizado e preparado a partir das raízes de certas plantas subtropicais pertencentes ao gênero *Lonchocarpus* ou *Derris elliptica* e seu mecanismo de toxicidade é mediado principalmente devido potente inibição específica e de alta afinidade, da NADH desidrogenase mitocondrial no complexo I mitocondrial, com isso aumenta a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e interrompe a fosforilação oxidativa mitocondrial causando uma crise bioenergética, devido à redução nos níveis de ATP e morte celular por apoptose ou necrose, devido à despolarização causada pela grande abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, ocorre à liberação de fatores pró-apoptóticos tais como fator indutor de apoptose, que eventualmente causa a morte celular (LI *et. al.*, 2003; CICCHETTI *et al.*, 2009; TIEU, 2011; SUBRAMANIAM & CHESSELET, 2013, MORAES *et.al.*, 2015).

A avaliação da atividade citotóxica da annonacinona frente a diversas linhagens celulares tumorais humanas e não tumoral, evidenciou bons resultados quanto a sua atividade citotóxica com valores de  $CI_{50}$  que variaram de 0,19  $\mu$ M a 3,7  $\mu$ M em linhagens de glioblastoma (SF-295) e de cólon (SW620) respectivamente, após 72 horas de incubação através do ensaio do MTT apresentando os menores valores de  $CI_{50}$  para as linhagens de

glioblastoma (0,19  $\mu\text{M}$ ) e pulmão (0,24  $\mu\text{M}$ ). No entanto, não foi possível observar um padrão evidente de seletividade entre as linhagens tumorais testadas.

O estudo é pioneiro na avaliação do potencial citotóxico dessa acetogenina - annonacinona, entretanto é relatada na literatura a atividade biológica de diversas acetogeninas mono-THF isoladas de *Annona muricata* como annopentocins A com atividade citotóxica em células de câncer de pâncreas (PACA-2), annopentocins B e annopentocins C em células de câncer de pulmão (A-549), cis- e trans- annomuricin-D-ones em células de câncer de pulmão (A-549), cólon (HT-29) e pâncreas (PACA-2) (ZENG *et. al.*, 1996a); muricins A-G; muricatetrocin A e muricatetrocin B, longifolicin, corossolin, e corossolona isoladas de sementes de *Annona muricata* demonstraram atividade citotóxica frente linhagem celular de carcinoma hepatocelular (Hep G2) (CHANG & WU, 2001); RIESER e colaboradores (1996) evidenciaram potente atividade citotóxica da cis-annonacin, isolada das sementes de *Annona muricata* em linhagem de câncer de cólon (HT-29); Em estudo de 2005, LIAW e colaboradores evidenciaram o potencial citotóxico de acetogeninas mono-THF provenientes das sementes de *Annona muricata*: muricin H, muricin I e cis-annomontacin, e das folhas: cis-corossolona e annocatalin frente à duas linhagens de carcinoma hepatocelular (Hep G2 e 2,2,15); Muricin H mostrou distinta atividade citotóxica frente linhagem de câncer de pulmão H460 em estudo realizado por QUISPE e colaboradores (2006); YANG e colaboradores (2009) demonstraram significativa citotoxicidade da squamocin frente linhagens de câncer cervical (Hela), fígado (SMMC-7541), estômago (SGC-7901), mama (MCF-7) e pulmão(A-5408), a 4-deoxyannoreticuin demonstrou melhor atividade frente linhagem de fígado (SMMC-7541) enquanto a cis-4-deoxyannoreticuin demonstrou seletiva atividade frente a linhagem de câncer de mama (MCF-7).

Em estudo bioguiado, BARRETO (2014), isolou do extrato acetônico de folhas da *A. muricata* uma acetogenina denominada annonacina com excelente atividade em células de câncer de cólon (HCT-116) com efeito citotóxico dependente de concentração e tempo. Em outros estudos, a muricatacina (5-hidróxi-4-heptadecanolido) isolada das sementes de *A. muricata* apresentou promissora ação citotóxica nas células de linhagens tumorais de pulmão, de mama e de cólon (CAVÉ *et al.*, 1997) e as acetogeninas anomuricina e muricapentocina mostraram seletividade quando testadas em linhagem de carcinoma pancreático (PACA-2) e adenocarcinoma de cólon (HT-29) (KIM *et al.*, 1997). Outras acetogeninas isoladas de diferentes espécies da família *Annonaceae* também exibem distinta atividade citotóxica, como a squamotacin isolada do extrato da casca de *Annona squamosa* em linhagem tumoral de

próstata (PC-3) (HOPP *et. al.*, 1996); Bullatacin, isolada do fruto de *Annona atemoya* em linhagem celular de hepatocarcinoma (2.2.15) (CHIH *et. al.*, 2001).

No presente estudo, as células de origem fibroblástica murina não transformada (L929) foram escolhidas para avaliar a citotoxicidade da annonacinona frente a células não tumorais. A partir de teste de citotoxicidade, utilizando o método do MTT foi possível perceber uma seletividade da amostra para linhagens de células tumorais quando comparadas com a linhagem não tumoral testada, em que os valores de  $CI_{50}$  apresentados foram maiores que a maior concentração testada (5  $\mu$ M).

Dado que corrobora com o resultado obtido por BARRETO (2014), que avaliou a capacidade da annonacina em apresentar atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico, tendo como resultado a não inibição da proliferação na maior concentração testada (8,3  $\mu$ M).

A análise temporal da atividade antiproliferativa da annonacinona frente à linhagem mais sensível testada (NCI-H460) foi avaliada através de dois ensaios de citotoxicidade, MTT e SRB, a fim de comparar os resultados obtidos por diferentes vias e evitar possíveis vies relacionados à interação da substância com mecanismo de cada teste. Através do ensaio do SRB, não foi possível avaliar a concentração inibitória média nos tempos de 24 e 48 horas, pois a maior concentração testada (10  $\mu$ M) não foi capaz de inibir a proliferação nesses tempos de tratamento. O método do MTT é avaliado pela capacidade das células viáveis reduzirem o sal de tetrazólio em formazam, em que o valor da absorbância obtida é proporcional ao seu número. Entretanto essa transformação é mensurada através da atividade mitocondrial das células vivas através de enzimas específicas. Se a substância testada atua em parte reduzindo o metabolismo mitocondrial das células, o método do MTT pode apresentar como vies um valor superestimado de  $CI_{50}$ , fato este que pode justificar a diferença dos valores encontrados da concentração inibitória média da rotenona e da annonacinona quando comparados os testes. Em estudo utilizando três inibidores da via glicolítica (2-desoxiglicose, 3-bromopiruvato e Ionidamina), TONDER, JOUBERT & CROMARTY (2015) compararam três ensaios de enumeração de células (vermelho neutro, redução de resazurina e SRB) com o ensaio do MTT e demonstraram grande variação em relação ao  $CI_{50}$  sugerindo que vários parâmetros devem ser avaliados em relação ao ensaio, pois a depender da atividade da substância podem existir interferências e limitações no ensaio.

No ensaio de viabilidade por exclusão do corante azul de Trypan, foram realizados dois tempos de tratamento 48 e 72 horas. Após o tratamento de 72 horas todas as células se

apresentaram inviáveis em todas as concentrações utilizadas da annonacinona, enquanto que após o tratamento por 48 horas foi possível evidenciar uma redução gradual e significativa de células viáveis à medida que aumentava-se a concentração da annonacinona quando comparadas ao controle negativo, inclusive apresentando um significativo aumento de células não viáveis na maior concentração testada (0,8  $\mu\text{M}$ ). Por acreditar que a atividade citotóxica da molécula iniciava-se em 48 horas, esse tempo foi mantido a fim de avaliarmos sua ação em relação à progressão do ciclo celular bem como nos mecanismos de morte celular.

O mecanismo de citotoxicidade de muitos agentes anticâncer convencionais é baseado no dano de DNA e subsequente indução de apoptose. No entanto, as células tumorais também podem responder a agentes capazes de desacelerar o ciclo celular, sendo conhecidos como agentes citostáticos. Estes compostos não matam células cancerosas, mas impedem que essas células se proliferem (RIXE; FOJO, 2007). A maioria dos agentes anticâncer convencionais tem potencial citostático e citotóxico. A citostaticidade pode ser o passo inicial para diferentes mecanismos de morte celular em que a duração da parada da mitose não está necessariamente correlacionada com a probabilidade de morte (WEISSENSTEIN *et al.*, 2014).

Na análise do efeito da annonacinona sobre o ciclo celular das células NCI-H460, através da quantificação do conteúdo de DNA, apenas na maior concentração (0,4  $\mu\text{M}$ ) foi observado um leve aumento na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> enquanto que nas demais concentrações não foi possível verificar alterações estatisticamente significativas no ciclo celular, o que não exclui a possibilidade da molécula estar atuando sobre o ciclo. Esse resultado pode estar relacionado com uma desaceleração do ciclo celular logo no início da ação da annonacinona no tempo de tratamento escolhido. De modo semelhante, no tempo avaliado não foi possível determinar fragmentação de DNA, característica presente em vários processos de morte celular e nem padrão de morte celular. A perda da assimetria da membrana fosfolipídica com a translocação da fosfatidilserina da membrana interna da bicamada lipídica para a superfície celular é uma característica relevante no processo da apoptose (VERMES *et al.*, 1995; ZIMMERMANN; BONZON & GREEN, 2001; LEE; LIU & YEUNG; 2009). A anexina V, é uma proteína recombinante que interage forte e especificamente com os resíduos de fosfatidilserina, sendo dessa maneira utilizada para avaliar o envolvimento do processo de apoptose da annonacinona.

MOGHADAMTOUS e colaboradores (2015) evidenciaram aumento na fase G<sub>1</sub> e apoptose inicial e tardia em linhagem de cólon (HT-29) de modo tempo-dependente

utilizando a acetogenina annonuricin E; estudos utilizando o extrato de folhas de *A. muricata* evidenciaram aumento em sub-G1 de maneira dose-dependente em linhagem de hepatocarcinoma celular (Hep G2) (YANG *et. al.*, 2016); e em células de câncer de mama (4T1) (NAJMUDDIN, 2016) com indução de apoptose; utilizando o extrato de folhas, galhos e raízes, Pieme e colaboradores (2013) observaram parada em G0/G1 em linhagem leucêmica (HL-60) com indução de apoptose; Em estudo bioguiado utilizando as folhas de *A. muricata*, MOGHADAMTOUSI e colaboradores (2015) isolou a acetogenina annonuricin E e evidenciou significativa indução de apoptose inicial em células de cólon (HT-29); Utilizando acetogeninas isoladas da espécie *Annona squamosa*, JUANG e colaboradores (2016) evidenciaram parada em G2/M e apoptose em células de câncer de faringe (NPC-TW01) quando tratadas com as acetogeninas Squamostatin A, squamocin M e corossolona.

Apesar do tempo de tratamento com a annonacinona por 48 horas apresentar redução da densidade de células viáveis observado no ensaio de viabilidade celular do azul de Trypan e confirmado na citometria de fluxo, o gráfico demonstrado no xCELLigence, nos direciona para um início do efeito citotóxico da molécula somente após 54 horas de tratamento e não 48 horas como havíamos imaginado. Esse fato corrobora para a ausência de resultados quando avaliados o ciclo celular das células NCI-H460, dano de DNA e mecanismos de morte após o tratamento com a annonacinona. Dessa maneira, outros ensaios com tempos de tratamento entre 54 e 60 horas com a annonacinona devem ser realizados a fim de analisar a sua atividade biológica e os mecanismos envolvidos na sua citotoxicidade. Os resultados da análise do gráfico do xCELLigence nos permite observar que mesmo na menor concentração testada (0,1  $\mu\text{M}$ ) a annonacinona é capaz de inibir a proliferação celular quando comparada ao controle negativo, permanecendo com índice celular em 4,5 enquanto que o controle apresenta seu pico em 7,0. As concentrações de 0,4  $\mu\text{M}$  e 0,8  $\mu\text{M}$  apresentaram o mesmo comportamento de citotoxicidade, com pico do índice celular em 4,5 e posterior declínio após 54 horas, constatando a necessidade da avaliação desses eventos durante esse tempo em que se inicia sua ação na viabilidade e proliferação celular.

Com base nas informações geradas no presente trabalho, a acetogenina estudada - annonacinona demonstrou elevado potencial citotóxico frente a distintas linhagens celulares tumorais humanas, em especial à linhagem de câncer de pulmão NCI-H460 fortalecendo a importância dessa classe química na pesquisa antitumoral básica. Entretanto, estudos mais aprofundados dos mecanismos envolvidos na atividade citotóxica da molécula, durante um tempo maior de tratamento, com a avaliação de marcadores bioquímicos e moleculares na

proliferação celular, além da avaliação do seu potencial antitumoral e toxicidade em modelos *in vivo* é de fundamental importância no intuito de verificar o possível papel desta molécula no tratamento do câncer.

## 7. CONCLUSÃO

No presente estudo, o fracionamento bioguiado do extrato acetônico das sementes de *A. muricata* resultou no isolamento de uma acetogenina mono-THF annonacinona com relevante atividade citotóxica *in vitro* frente a distintas linhagens tumorais humanas, com maior efeito em NCI-H460.

A annonacinona apresentou inibição da proliferação celular de células NCI-H460 e redução da densidade de células viáveis após 48 horas de tratamento. No entanto, outros testes devem ser realizados para avaliar os mecanismos envolvidos na sua atividade biológica e potencial terapêutico.

As frações e subfrações obtidas do extrato acetônico das sementes de *A. muricata* L. apresenta distinta atividade citotóxica frente a linhagens celulares tumorais humanas, sendo uma fonte promissora para a obtenção por meio de métodos cromatográficos de compostos pertencentes à classe das acetogeninas, com atividade citotóxica proeminente.

## REFERÊNCIAS

- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Portaria n. 600 de 26 de junho de 2012**. Aprova as diretrizes diagnósticas e terapêuticas do câncer de pulmão. Brasília: 281–286, 2012.
- ABDULLAH, F.; SINA, I. The Potential of Soursop Seed Extract *Annona muricata* Linn as a Biopesticide against Aphids *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) on Chilly. **Malaysian Journal of Science**, v.22 , n.2, p. 11-16, 2003.
- ADEWOLE, S. O.; OJEWOLE, J. A. Protective Effects of *Annona Muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Serum Lipid Profiles and Oxidative Stress in Hepatocytes of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**, v.6, n.1, p. 30 – 41, 2009.
- ADEYEMI, D. O.; KOMOLAFE, O. A.; ADEWOLE, O. S.; OBUOTOR, E. M.; ADENOWO, T. K. Anti-hyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). **African Journal of Traditional, Complimentary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 1, p. 62-69, 2009.
- ALALI, F. Q., KAAKEH, W.; BENNET, G. W.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins as natural pesticides; potent toxicity against insecticide-susceptible and resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**. v.91, n.3, p.641-9, 1998.
- ALALI, F. Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: Recent progress. **Journal of Natural Products**, v.62, p. 504-540, 1999.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis Ediciones, SRL, 1998.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Genes and Cancer**, 2014. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002550-pdf.pdf>>. Acesso em: dezembro 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is cancer?** 2013. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 11 dez. 2016.
- ANTOUN, M. D.; GERENA, L.; MILHOUS, W. K. Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactives. **International Journal of Pharmacognosy**, v.31, n.4, p.255–58, 1993.

ANVISA, **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF)**, Decreto nº 5.813 do ano de 2006, Brasília, 2006. Disponível em: <[http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user\\_arquivos\\_64/Politica\\_Nacional\\_de\\_Plantas\\_Medicinais\\_e\\_Fitoterapicos.pdf](http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user_arquivos_64/Politica_Nacional_de_Plantas_Medicinais_e_Fitoterapicos.pdf)>. Acessado em dez 2016.

ARTANTI, A. N., ASTIRIN, O. P., PRAYITNO, A. Cytotoxic Activity Of Non Polar Fraction From *Annona Muricata* L. Leaves On Hela And Raji Cell Line. **Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research**, v. 1, p.112 – 118, 2016.

BARBOSA, C. V. **Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL**. 2009. 112 p. Dissertação - Universidade Federal de Alagoas, 2009.

BARRETO, F. S. **Estudo da atividade citotóxica de compostos obtidos do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. por fracionamento bioguiado**. 2014. 89 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Products Reports.**, v.22, n.2, p.269-303, 2005.

BORIES, C.; LOISEAU P.; CORTES, D.; MYINT, S.H.; HOCQUEMILLER, R., GAYRAL, P., CAVE, A.; LAURENS A. Anti-parasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta Medica**. v. 57 , n.5, p.434-436, 1991.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ELBAZ, A.; Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. **The Lancet**. v. 354, n. 9175, p281–286, 1999.

CARBAJAL, D.; CASACO, A.; ARRUZAZABALA, L.; GONZALEZ, R.; FUENTES, V. Pharmacological Screening of Plant Decoctions Commonly Used in Cuban Folk Medicine. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.33 , n.1/2, p. 21-24, 1991.

CASTRO, F.A.; MAIA, G.A.; HOLANDA, L.F.F.; GUEDES, Z.B.L.; FÉ, J.A. M. Características físicas e químicas da graviola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 361-365, 1984.

CAVALCANTI, B.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascídia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa riisei*. **Química Nova**, v. 30, n.5, p.1194-1202, 2007.

CAVÉ, A.; FIGADERE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. **Progress in the chemistry of organic natural products**; Herz, W.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Steglich, W.; Tamm, Ch., Eds; Springer-Verlag: New York, 70: 81-288, 1997.

CECHINEL, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.1, 1998.

CHANG, F.R., WU, Y.C. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 64, p. 925-31, 2001.

CHIH, H.; CHIU, H. F.; TANG, K. S.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Bullatacin, a potent antitumour annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. **Life Sciences**. v. 69, p. 1321-31, 2001.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 30, p. 475-83, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista virtual de química**, v.2, n. 1, p. 47-58, 2010.

DARZYNKIEWICZ, Z.; HALICKA, H. D.; ZHAO, H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow and Laser Scanning Cytometry. **Advanced Experimental Medicinal Biology**, v. 676, p.137-147, 2010.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; CORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.

DAUD, S. B. **Chemical Constituents from *Annona Murica* (Linn.) And *Garcinia Mangostana* (Linn.) and Their Biological Activities**. University Putra Malaysia, 2005.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Three Bs of Cancer Immunoediting. **Annual Review of Immunology**. v. 22, p. 329-360, 2004.

DURET, P.; HOCQMULLER, R.; CAVE, A. Bulladecin and Atemotetrolin, two bis-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona atemoya* seeds. **Phytochemistry**. 48: 499-506, 1998.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v 112, 4-29, 2016.

EISENBERG, D.M.; KESSLER, R.C.; FOSTER, C.; NORLOCK, F.E.; CALKINS, D.R.; DELBANCO, T.L. Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs, and patterns of use. **The New England Journal of Medicine**. n. 328, p. 246–252, 1993.

ESCOBAR-KHONDIKER, M.; HOLLERHAGE, M.; MURIEL, M. P.; CHAMPY, P.; BACH, A.; DEPIENNE, C.; HOGLINGER, G. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes Tau pathology in cultured neurons. **Journal of Neuroscience**. v. 27, p. 7827–7837, 2007.

FILARDI, Marcelo Augusto. **Potencial antitumoral de extratos da própolis brasileira e de folhas de graviola (*Annona muricata*): efeito citotóxico sobre células hepatocarcinogênicas HEPG2**. 2010. 140f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1705, n.1, p. 27-41, 2004.

GBEASSOR, M.; KEDJAGNI, A. Y.; KOUMAGLO, K.; SOUZA, C.; AGBO, K.; AKLIKOKOU, K. In vitro antimalarial activity of six medicinal plants. **Phytotherapy Research**. v.4, n.3, p.115–17, 1990.

GEURTS, F. **Annonaceous Fruits**. Royal Tropical Institute, Amsterdam, the Netherlands. 1981.

GLOBOCAN 2012. **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. Acesso em: Dez. 2016.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

GU, Z., FANG, X., ZEOG L., MCLAUGHLIN, J. L Goniocin from *Goniothalamus giganteus*: The first tri-THF annonaceous acetogenin. **Tetrahedron Letters**, v 35, n. 25, p. 5367–5368, 1994.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert a.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011.

HASRAT, J.A; DE BRUYNE, T.; DE BACKER, J.P; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A. J. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT1A receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.49, n.11, p.1145-9, 1997.

HEINRICH, M.; KUHNT, M.; WRIGHT, C.W.; RIMPLER, H.; PHILLIPSON, J.D.; SCHANDELMAIER, A.; WARHURST, D.C. Parasitological and Microbiological Evaluation of Mixe Indian Medicinal Plants (Mexico). **Journal of Ethnopharmacology**, v.36, n. 1, p.81-85, 1992.

HOOP, D. C.; ALALI, F. Q.; GU, Z.; McLAUGHLIN, J. L. Three new bioactive bis-adjacent THF-ring acetogenins from the bark of *Annona squamosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 569-575, 1998.

HOPP, D. C.; ZENG, L.; GU, Z.; McLAUGHLIN, J. L. Squamotacin: an annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line (PC-3). **Journal of Natural Products**. v.59, n.2, 1996.

HU, T.S.; WU, Y.L.; YAO, Z.J. Recent progress on the chemical synthesis of Annonaceous acetogenins and their structurally Modified mimics. In: Liang, X.T.; Fang, W.S. (Edts.) **Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products**. cap. 10, p. 399- 441, 2006.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas de câncer no Brasil**. 2016. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>. Acesso em: 11 dez. 2016.

JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J.; GONZALEX, M.C.; ROBLEDO, S.M.; VELEZ, I.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v.71, p.183-186, 2000.

JUANG, S.H.; CHIANG, C.Y.; LIANG, F.P.; CHAN, H.H.; YANG, J.S.; WANG, S.H.; LIN, Y.C.; KUO, P.C.; SHEN, M.R.; THANG, T. D.; NGUYET, B. T. M.; KUO, S.C.; WU, T.S. Mechanistic Study of Tetrahydrofuran- acetogenins In Triggering Endoplasmic Reticulum Stress Response-apoptosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma. **Scientific Reports**. 6:39251, 2016.

KATZUNG, Bertram G.; MASTERS, Susan B.; TREVOR, Anthony J. (Org.). **Farmacologia: básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre, 1228 p., 2014.

KIM, G. S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F. E.; MCLAUGHLIN, J. L. SASTRODIHARDJO, S. Two New Mono-Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, Annomuricin E and Muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v.61, p.432-436, 1997.

KOJIMA, N. Systematic synthesis of antitumor Annonaceous acetogenins. **Yakugaku Zasshi**. v.124, n.10, p.673-81, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Patologia: bases patológicas da doença**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 928p., 2013.

LEE, W. Y.; LIU, K. W.; YEUNG, J. H. Reactive oxygen species-mediated kinase activation by dihydrotanshinone in tanshinones-induced apoptosis in HepG2 cells. **Cancer Letters**. v. 285, n. 1, p. 46-57, 2009.

LEITE, J. P. V. Química dos Produtos Naturais: Uma Abordagem Biossintética. In: \_\_\_\_\_ (Ed.) **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. Ed. Atheneu, Cap.3. p. 47-97, 2009.

LI, N.; RAGHEB, K.; LAWLER, G.; STURGIS, J.; RAJWA, B.; MELENDEZ, J. A.; ROBINSON, J. P. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.10, p. 8516–8525, 2003.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; CHEN, S.; WU, C. C.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.13, p. 4767- 4776, 2005.

LIAW, C.C.; WU, T. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Historic perspectives on annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials. **Planta Medica**, v. 76, n. 13, p. 1390-1404, 2010.

LIMA, Milena Duarte. **Perfil cromatográfico dos extratos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência**. 2007. 84f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

LIU, X.X.; ALALI, F. Q.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Glacins A and B: Two novel bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n.5, p. 620-624, 1998.

LOPEZ, A. M. Plant extracts with cytostatic properties growing in Cuba. I. **Revista Cubana de Medicina Tropical**. v.31, n.2, p. 97–104, 1979.

LOPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**. v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LOUIS, M. W.; MURRAY, J. C.; SHUPTRINE, C. W. Antibody-based immunotherapy of cancer: new insights, new targets. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1081-1084, 2012.

LUNA, A. F.; FREITAS, T. M. B.; ALVES, I. C.; SILVA, J. N.; LUZ, E. W. M. Potencial antioxidante da polpa industrializada e polpa in natura da *Annona muricata* L. a partir do método DPPH. In.:CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA., 4, 2009. Pará. **Anais...**Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, 2009.

LUNA, J.S., DECARVALHO, J.M., DELIMA, M.R., BIEBER, L.W., BENTO, E.S., FRANCK, X.; SANT'ANA A.E. Acetogenins in *Annona muricata* L. (Annonaceae) leaves are potent molluscicides. **Natural Product Research**. v.20, n.3, p.253-257, 2006.

LUO, G.; HAO, N.B.; HU, C. J.; YONG, X.; LU, M.H.; CHENG, B. J.; ZHANG, Y.; YANG, S. M. HBV infection increases the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. **Cancer Causes & Control**, v. 24, p. 529-537, 2013.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p.823-837, 2009.

McCHESNEY, J.D.; VENKATARAMANA, S.K.; HENRIA, J.T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**. v.68, p. 2015-2022, 2007.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.,FADAEINASAB M.,NIKZAD, S., MOHAN, G., ALI, H. M., KADIR, H. A.. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**. v.16, p.15625-15658, 2015.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; KADIR, H. A.; PAYDAR, M.; ROUHOLLAHI, E.; KARIMIAN, H. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- $\kappa$ B. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.14, 299, 2014.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; ROUHOLLAHI, E., KARIMIAN, H.; FADAEINASAB, M.; FIROOZINIA, M.; ABDULLA, M. A.; KADIR, H. A. The Chemopotential Effect of *Annona muricata* Leaves against Azoxymethane-Induced Colonic Aberrant Crypt Foci in Rats and the Apoptotic Effect of Acetogenin Annomuricin E in HT-29 Cells: A Bioassay-Guided Approach. **Plos One**. v.10 (4), 2015.

MORAES, M.O; BARRETO, F.S; MOURA, A. F.; ARAUJO, R. M.; SANTOS, C. C.; WILKE, D.V. Potencial antitumoral de compostos obtidos de plantas da família annonaceae.In: ALMEIDA, J.R.G.S.;OLIVEIRA JUNIOR, R.G.;OLIVEIRA, A.P. **Annonaceae: tópicos selecionados**. Curitiba: CRV, Cap. 14, p.427-458, 2015.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications Inc., 2000.

MORTON, J. F. Soursop. In: **Fruits of Warm Climates**. Miami, p. 75–80, 1987.

MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C .E. B.; DANTAS, T. M. **Características Botânicas das Principais Anonáceas e Aspectos Fisiológicos de Maturação**. EMBRAPA- Documentos, n. 106, 28 p., 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

N'GOUEMO, P.; KOUDOGBO, B.; TCHIVOUNDA, H.P.; NGUEMA,C.A.; ETOUA, M.M. Effects of Ethanol Extract of *Annona muricata* on Penylenetetrazol-induced Convulsive Seizures in Mice. **Phytotherapy Research**, v.11, n.3, p. 243-245, 1997.

NAJMUDDIN, S. U. F. S.; ROMLI, M. F.; HAMID, M.; ALITHEEN, N. B.; RAHMAN, N. M. A. N. A. Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 16(1):311, 2016.

NCI. NATIONAL CANCER INSTITUTE AT THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **What is cancer? 2015**. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 11 dez. 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v.75, n.3, p.311-335, 2012.

OLIVEIRA, C. C. **Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L.** 2012. 180p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

OMS. World Health Organization. Cancer. **World health statistics, 2015**. Geneva: World Health Organization; Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439_eng.pdf?ua=1)

OMS. World Health Organization. **Cancer**. Fact sheet N.297, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 11 dez. 2016.

OMS. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2014**. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2014.

PADMA, P.; CHANSAURIA, J. P. N.; KHOSA, R. L.; RAY, A. K. Effect of *Annona muricata* and *Polyalthia cerasoides* on brain neurotransmitters and enzyme monoamine oxidase following cold immobilization stress. **Journal of Natural Remedies**. v.1, n.2, p.144-46, 2001.

PATRICK, G.L. **An introduction to medicinal chemistry**.Oxford: Oxford University Press, 2009.

PAULL, R. E.; DEPUTY, J.; CHEN, N. J. Changes in organic acids, sugars and headspace volatiles during fruit ripening of soursop (*Annona muricata* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 108, n. 6, p. 931-934, 1983.

PIEME, C. A.; GURU, S. K.; AMBASSA, P.; KUMAR, S.; NGAMENI, B.; NGOGANG, J. Y.; BHUSHAN, S.; SAXENA, A. K. Induction of mitochondrial dependent apoptosis and cell cycle arrest in human promyelocytic leukemia HL-60 cells by an extract from *Dorstenia psilurus*: a spice from Cameroon. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 13: 223, 2013.

PINHO, M. **Biologia Molecular do Câncer: fundamentos para a prática médica**. 1. ed. Revinter Ltda. 2005.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.

PINTO, A.C.Q. Taxonomy and Botany. In: PINTO, A.C.Q.; CORDEIRO, M.C.R.; ANDRADE, S.R.M.; et. al. (Org.). **Annona Species**. International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, UK, p. 3-27, 2005.

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, 2004.

QUISPE M. A.; ZAVALA C, D.; ROJAS C. J. Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. **Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Publica**, v.23, n. 4, p.265- 269, 2006.

RALPH, S. J.; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S.; NEUZIL, J.; SAAVEDRA, E.; MORENO-SÁNCHEZ, R. The causes of cancer revisited: “Mitochondrial malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation – Why mitochondria are targets for cancer therapy. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 145–170, 2010.

RIESER, M.J.; GU, Z.M.; FANG, X.P.; ZENG, L.; WOOD, K.V.; MCLAUGHLIN, J. L. Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 59, p.100-108, 1996.

RIOS, M. E. F. **Estudo da atividade citotóxica e do potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L.(AMSA), em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***. 2013. 121 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

RIXE, O.; FOJO, T. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient?. **Journal of Clinical Respiratory**, v. 13, n. 24, p. 7280-7287, 2007.

RIXE, O.; FOJO, T. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient?. **Clinical Cancer Research**. v. 13, n. 24, p. 7280-7287, 2007.

ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Fundamentos da Patologia Estrutural e Funcional**. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1995.

SACRAMENTO, C.K.; FARIA, J.C.; CRUZ, F.L.; BARRETTO, W.S.; GASPAR, J.W.; LEITE, J.B.V. Caracterização Física e Química de Frutos de Três Tipos de Gravioleira (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, n. 2, p. 329-331, 2003.

SALGALLER, M. L.; LODGE, P. A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **Journal of Surgical Oncology**. v.68, p. 122-138, 1998.

SANTOS, A. F.; SANT’ANA, A. E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**., v.8, p.115-120, 2001.

SCHOENFELD, J. D. Immunity in Head and Neck Cancer. **Cancer Immunology Research**, v.3, n.1, p. 12-17, 2015.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New York : Ed Wiley-Liss, 1995.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**. v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, E. M. F.; NASCIMENTO, R. B. C.; BARRETO, F. S.; MORAES, M. O.; GRIZ, S. A. S.; SANTOS, A. F.; MOUSINHO, K. C. Estudo in vitro do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n.2, p.277-283, 2015.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD ,M.R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**. v.82, p.1107-1112, 1990.

SOUZA, M. V. N.; Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n.2, p. 308-312, 2004.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H.C Natural products in advance clinical trials applied to cancer. **Revista Fitos**. v. 3, p. 25-41, 2007.

SUBRAMANIAM, S. R.; CHESSELET, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 106-107, p. 17–32, 2013.

TAKAHASHI, J. A., PEREIRA, C. R., PIMENTA, L. P., BOAVENTURA, M. A.; SILVA, L.G. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. **Natural Product Research**. v. 20, n.1, p.21- 26, 2006.

TANNOCK, I. F. **The basic science of oncology**. 4th ed. New York: McGraw Hill; 2005.

TIEU, K. A. Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 1, n. 1, 2011.

TONDER, A. V.; JOUBERT, A. M; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**. v.20, 8:47, 2015.

TORMO, J. R.; ROYO, I; GALLARDO, T., ZAFRA-POLO, M.C., HERNANDEZ, P., CORTES, D.; PELAEZ, F. In vitro antitumor structure activity relationships of threo/trans/three mono- tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex 1. **Oncology Research**. v.14, n.3, p.147-54, 2003.

VALDESPINO-GÓMEZ, V. M; VALDESPINO-CASTILLO, V. E. Non-classical cellular and molecular deficits in cancer development. **Gaceta Médica de México**. v, 146, p. 185–198, 2010.

VASQUEZ, M. R. **Useful Plants of Amazonian Peru**. National Agricultural Library. USA,1990.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**. v. 184, p. 39-51, 1995.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, **Cell Proliferation**. , v. 36, p. 131–149, 2003.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VIEIRA, G. H. F.; MOURÃO, J. A.; ÂNGELO, A. M.; COSTA, R. A.; VIEIRA, R. H. S. F. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.52, n.3, p.129-132, 2010.

VOLGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v.10, n. 8, p. 789-799, 2004.

WANG, L. Q.; MIN, B.S.; LI, Y.; NAKAMURA, N.; QIN, G.W.; LI, C.J.; HATTORI, M. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 10, n.3, p.561-65, 2002.

WEISSENSTEIN, U.; KUNZ, M.; URECH, K.; BAUMGARTNER, S. Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 6, 2014.

YAN, Z.; LI, T.; LV, P.; LI, X.; ZHOU, C.; YANG, X. Sensitive and reliable multianalyte quantitation of herbal medicine in rat plasma using dynamic triggered multiple reaction monitoring. **Journal of Chromatography B**. v. 928, p. 22-31, 2013.

YANG, H.; LIU, N.; LEE, S. Ethanol Extract of *Annona Muricata*. L Induces Liver Cancer Cell Apoptosis Through ROS Pathway. **Biomedical and Pharmacology Journal**. v.9, n.3, 2016.

YANG, H.; ZHANG, N.; LI, X.; CHEN, J.; CAI, B. Structure–activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against human tumor cell. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 2199–2202, 2009.

YANG, X. J.; XU, L. Z.; SUN, N. J.; WANG, S. C.; ZHENG. Studies on the chemical constituents of *Annona squamosa*. **Acta Pharmaceutica**.v.27, p.185-190, 1992.

YUAN, S. S.; CHANG, H. L.; CHEN, H.W.; YEH, Y. T.; KAO, Y. H.; LIN, K. H; WU, Y. C.; SU J. H. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Sciences**. v. 72, n.25, p. 2853-61, 2003.

ZAFRA-POLO, M.C.; GONZALEZ, C.; ESTORNELL, E.; SAHPAZ, S.; CORTES, D.. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex. **Phytochemistry**. v.42, p.253–271, 1996.

ZENG, L.; WU, F. E.; OBERLIES, N. H.; MCLAUGHLIN, J. L.; SASTRODIHADJO, S. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 59, n.11, p.1035–42, 1996a.

ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N. H.; SHI, G.; GU, Z. M.; HE, K.; MCLAUGHLIN, J. L. Recent advances in Annonaceous acetogenins. **Journal of Natural Products**. v.13, n.4, p.275–306, 1996b

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 92, p. 57-70, 2001.

## ANEXO A – EQUIPAMENTOS

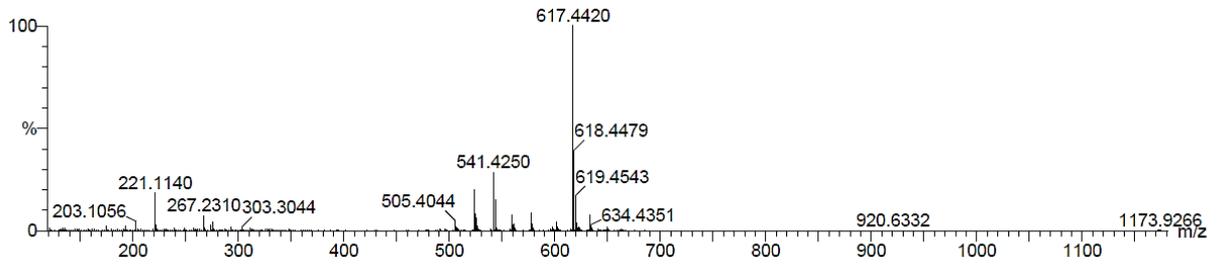
- Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®
- Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di®
- Bomba à vácuo, EXIMPUMP®
- Citoentrífuga, CT-2000 CIENTEC®
- Centrífuga refrigerada, SORVALL® Biofuge fresco
- Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5810R
- Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini®
- Contador automático de células sanguíneas, Coulter Counter T-530®
- Deonizador de água Milli-Q, Milipore®
- Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®
- Fluxo laminar, VECO®
- Incubadora de células, (CO2 Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®
- High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter®
- Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®
- Microscópio óptico de inversão, ZEISS, AXIOVERT 40C
- Mini Protean® tetra cell, Biorad
- Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Biorad
- pHmetro, Micronal® B474
- Pipetas automáticas, Gilson®
- PowerPac™ HC High-Current Power Supply, Biorad®
- Shaker, BIOMIXER – TS 2000A
- Sistema de Fotodocumentação, ImageQuant 300 Imager GE Healthcare®
- Sonicador, UNIQUE – ULTRA CLEANER 1600<sup>a</sup>

## ANEXO B - SOLUÇÕES E REAGENTES

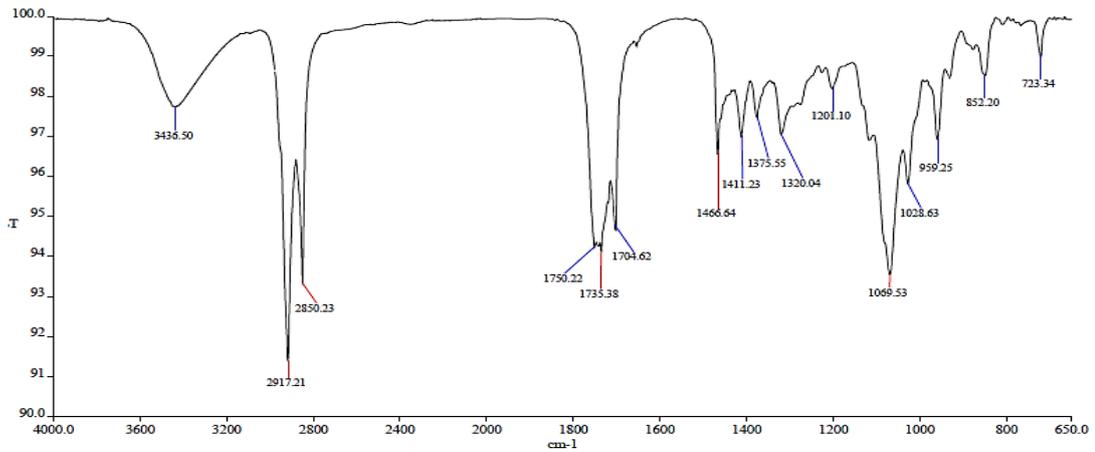
- Acetato de etila
- Acetona
- Azul de tripan 10% (Vetec®): 10 mg de azul de tripan + PBS q.s.p. 100 mL de solução.
- Clorofórmio
- Dimetilsulfóxido
- Doxorrubicina, Sigma®
- Hexano
- Metanol
- MTT (Sigma®): 20 mg de MTT + PBS q.s.p. 100 mL solução.
- Rotenona, Sigma®
- Sephadex LH-20
- Sílica gel
- Soro Fetal Bovino [SFB] (Cultilab®)
- Tampão fosfato de sódio (PBS): 8,766 g cloreto de sódio (Labsynth®) + 2,14 g + NaHPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Labsynth®) + 0,276 g NaHPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Labsynth®) + água destilada q.s.p. 1L solução-pH 7,2.
- Tripsina 0,25%: 50 mL de tripsina 2,5% (Cultilab®) + 0,125 g EDTA (Proquímios®) + 450 mL PBS.
- Vanilina: 5 g de vanilina + 100 mL de Álcool Etílico + 100 mL sol. 0,75 M Ácido Perclórico. Vanilina dissolvida em álcool e armazenada em frasco âmbar.

## ANEXO C – CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DA ANNONACINONA PRESENTE NA FRAÇÃO AMSA-A (8-9) 49-57

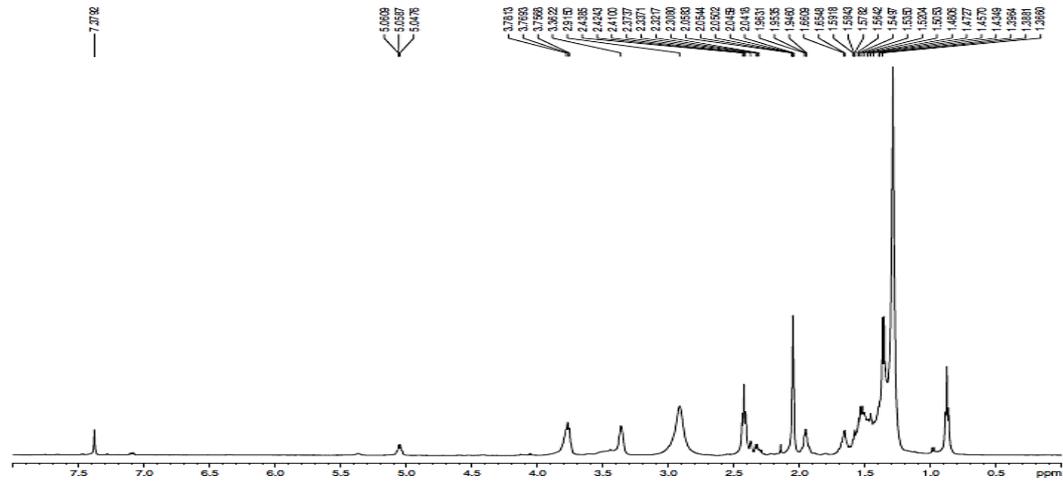
**Figura 23.** Espectro de análise de massa da fração AMSA-A (8-9) 49-57



**Figura 24.** Espectro de Infravermelho da fração AMSA-A (8-9) 49-57



**Figura 25.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  da fração AMSA-A (8-9) 49-57.



**Figura 26.** Espectros de RMN A)  $^{13}\text{C}$ -BB e B)  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 da fração AMSA-A (8-9) 49-57.

