



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

**MARIA ERIVANDA FRANÇA RIOS**

**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*.**

**FORTALEZA**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA (MESTRADO**  
**PROFISSIONAL)**

**MARIA ERIVANDA FRANÇA RIOS**

**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*.**

Dissertação submetida à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como Requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia Clínica (profissional).

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

**FORTALEZA**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

---

R453e Rios, Maria Erivanda França.

Estudo da atividade citotóxica e do potencial do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L. (AMSA), em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* / Maria Erivanda França Rios. – 2013.

121 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado Profissional, Fortaleza, 2013.

Área de concentração: Farmacologia.

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

1. Farmacologia. 2. Sarcoma 180. 3. Toxicidade. I. Título.

---

CDD 615.1

**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***

Maria Erivanda França Rios

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia Clínica (profissional), outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A transcrição de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovada em 21 de Maio de 2013.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Cláudio Costa dos Santos  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)- Mossoró-RN

---

Dr. José Delano Barreto Marinho Filho  
Doutor em Farmacologia

*Aos meus filhos **Rebeca França** e **Thiago França** que são a razão de tudo.*

*Ao meu marido **Nailton**, sempre me apoiando nos momentos difíceis.*

À **Deus**, por ter-me concedido saúde e paz estando ao meu lado, mesmo nas “noites traiçoeiras” de plantão e em todos os momentos imprescindíveis nessa maravilhosa jornada que é a vida.

## AGRADECIMENTOS

Em especial, ao **Prof. Dr. Odorico de Moraes**, por ter me acolhido no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) como bolsista, como funcionária e depois como aluna de pós-graduação, por sempre ter acreditado nos meus potenciais e pelas inúmeras oportunidades de crescimento, pela orientação, pela compreensão e pelo imenso carinho que sempre demonstrou ter e pelo reconhecimento do meu esforço na tentativa de desenvolver um bom trabalho.

À **Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes**, pela oportunidade, pela colaboração, pela amizade sempre disposta a ajudar .

À **Profa. Dra. Gisela Camarão**, pelos ensinamentos no decorrer de todo o mestrado.

À **Dra. Cláudia do Ó Pessoa**, pelo incentivo na realização desse trabalho, pela amizade e pela dedicação e por todas as dúvidas esclarecidas no desenvolver da pesquisa;

À **Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo**, pela sua ajuda como coordenadora e amiga no laboratório.

À **Dra. Jamile Magalhães**, pela imensa ajuda com os animais e nos dos testes de bioquímica e hematologia.

Ao Dr. **Cláudio Costa**, químico que isolou os extratos que permitiram a realização deste trabalho.

Ao **Daniel Borges**, pela disposição do material para o estudo.

À **Dra. Ana Paula Nunes**, pela ajuda e ensinamentos nos resultados da histopatologia .

Aos **Profs. Diego Wilke e Washington Barros** pela ajuda ambos iniciando a caminhada à docência.

**Professores do Curso de Pós-Graduação**, por terem colaborado nessa caminhada infundável pela busca de conhecimento.

Aos amigos do **LOE: Danilo Rocha, Patrícia Marçal, Carla Sombra, Cecília Carvalho, Bruno Cavalcanti, Delano Marinho, Ana Jérsia Marinho, Sterfânio,**

**Felipe Rocha** (futuro papai sempre disposto a ensinar), **Treysse, Bruno Soares , Sarah, Marcilia, Igor Bonfim** ,pela ajuda.

À técnica **Silvana França**, cuja dedicação e trabalho é indispensável à boa ordem do laboratório, além das inúmeras ajudas e a **Rogéria Montenegro**, pelo auxílio sempre disponibilizado e rápido.

Às secretárias **Adelânia Roque, Fábria, Maria Tereza e Sheyla**, pela imensa atenção e resolução dos pedidos e problemas arranjados no decorrer dessa empreitada.

Aos **funcionários do biotério, Haroldo , Adauto, seu Bento, Josiê** , responsáveis pela manutenção do biotério e pelo bem-estar e higiene dos nossos animais.

Aos amigos do **HUWC- Laboratório Central: Liduina Braga** (sempre disposta a ouvir os pedidos de escala), **Lus Mario, Maria José, Glairta, Lindalva, Tereza** e demais colegas de trabalho.

Aos amigos e membros da **UNIFAC**, pelas ajudas e apoios técnicos.

À toda família **França**, especialmente, aos meus pais, **Luis França** (*in memorian*) e **Maria Freire**, pelo amor eterno e inigualável, estímulo a continuar sempre abrindo caminhos na minha vida profissional, pela dedicação sem limites e carinho sem comparação e as minhas irmãs, “A casa das sete mulheres”, **Silvia ,Tereza, Vanda, Neuma, Socorro, Silvana e Eu**, pelos momentos alegres e ajuda constante indispensável.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica ou para a execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos.....</b>	<b>09</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>11</b>
<b>Lista de Gráficos.....</b>	<b>14</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>15</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>17</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1 Câncer.....	20
1.2 Produtos Naturais.....	24
1.2.1 Produtos Naturais Anti-Câncer Originados de Plantas.....	25
1.3 Planta estudada: <i>Annona muricata</i> L.....	34
1.3.1 Características Botânicas.....	35
1.3.1.1 Taxonomia.....	35
1.3.1.2 Habitat.....	35
1.3.1.3 Descrição Botânica.....	36
1.3.1.4 Constituintes.....	40
1.3.1.5 Pesquisa Fitoquímica.....	40
1.4 As acetogeninas.....	41
1.5 Os alcalóides.....	44
1.6 Outros Constituintes.....	45
1.7 Uso na Medicina Tradicional.....	45
1.8 Principais Usos da Graviola na Medicina Popular.....	46
1.9 Propriedades Farmacológicas.....	48
1.10 Justificativa do Trabalho.....	50
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>52</b>
2.1 Objetivo Geral.....	52
2.2 Objetivos Específicos.....	52
<b>3 Materiais e Métodos.....</b>	<b>54</b>
3.1 Materiais.....	54
3.2 Métodos.....	56
3.2.1 Material vegetal, extração e isolamento da AMSAF2.....	56
3.2.2 Material vegetal.....	56

3.2.3 Obtenção do extrato acetônico das sementes de <i>Annona muricata</i> ....	56
3.3 Modelos Biológicos.....	58
3.3.1 Linhagens velulares.....	58
3.3.1.1 Obtenção e cultivo das células tumorais.....	59
3.4 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas-Teste do MTT..	59
3.5 Atividade citotóxica em linfócitos-teste Alamar blue.....	61
3.6 Estudo da atividade antitumoral in vivo.....	62
3.6.1 Obtenção e manutenção dos animais.....	62
3.7 Determinação da Atividade Hemolítica em Eritrócitos de Camundongos	64
3.8 Manutenção do tumor sarcoma 180 em camundongos.....	65
3.9 Investigação da Toxicidade Oral Aguda do Extrato Acetônico das Sementes de <i>Annona muricata</i> (AMSAF2)pelo Método Up and Down.....	65
3.10 Determinação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> do extrato acetônico (AMSAF2) em camundongos( <i>Mus musculus</i> )Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	66
3.11 Observações histopatológicas da atividade antitumoral do extrato AMSAF2 em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	68
3.12 Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	69
<b>4 Resultados.....</b>	<b>72</b>
4.1 Estudo da Atividade Citotóxica- MTT e Alamar Blue.....	72
4.2 Atividade Hemolítica.....	73
4.3 Toxicidade Aguda pelo método do Up and Down.....	73
4.4 Avaliação da atividade antitumoral da AMSAF2 em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	76
4.5 Análise macroscópica e histopatológica dos órgãos.....	78
4.6 Determinação dos parâmetros Hematológicos e Bioquímicos.....	86
<b>5 Discussão.....</b>	<b>91</b>
<b>6 Conclusão.....</b>	<b>101</b>
<b>7 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>102</b>

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>AMSAF2</b>	<i>Annona muricata</i> L. Sementes Acetônica Fração 2
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>CRE</b>	Creatinina
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPM</b>	Desvio padrão da média
<b>E.P.M.</b>	Erro Padrão da Média
<b>HTS</b>	High Throughput Screening
<b>HE</b>	Hematoxilina/Eosina
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória média
<b>LACT</b>	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>TBS</b>	Tris Buffer Solution (Tampão Tris)
<b>TDF</b>	Teste da Dose Fixa
<b>U</b>	Unidade

**UV** Ultra-Violeta

**i.p.** Via Intraperitoneal

**v.o.** Via Oral

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Características essenciais das células tumorais. Fonte: Adaptado de (HANAHAN; WEINBERG, 2011).....	<b>21</b>
<b>Figura 2</b>	Comparação entre os números de mortes mundiais para enfermidades cardiovasculares e câncer no período de 2002-2030 para a população mundial abaixo dos 70 anos. Fonte: Adaptado de Mathers & Loncar, 2006. ....	<b>22</b>
<b>Figura 3</b>	Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012, exceto pele não melanoma, na população brasileira. Fonte: INCA, 2012.....	<b>23</b>
<b>Figura 4</b>	Complementaridade da Química e Biologia. Química Medicinal é uma arte que combina a Química e a Biologia no descobrimento de novas drogas. Adaptado de LEE, 2010.....	<b>24</b>
<b>Figura 5</b>	<i>Taxus brevifolia</i> (a); estruturas químicas do paclitaxel (b) e docetaxel (c).....	<b>27</b>
<b>Figura 6</b>	<i>Catharanthus roseus</i> (a); estruturas químicas da Vinblastina (b), Vincristina (c), Vindesina (d) e Vinorelbina (e).....	<b>29</b>
<b>Figura 7</b>	<i>Camptotheca acuminata</i> (a); estruturas químicas da Camptotecina (b), Topotecan (c) e Irinotecan (d).....	<b>31</b>
<b>Figura 8</b>	<i>Podophyllum peltatum</i> (a); estruturas químicas da Podofilotoxina (b), Etoposídeo (c) e Tenoposídeo (d).....	<b>33</b>
<b>Figura 9</b>	<i>Annona muricata</i> L. Acessado em 18 de setembro de 2010; Fonte: <a href="http://www.rarexoticseeds.com/Fruits/Graines_Anonna_Muricata_Seeds_Soursop_Corosollier">http://www.rarexoticseeds.com/Fruits/Graines_Anonna_Muricata_Seeds_Soursop_Corosollier</a> .....	<b>36</b>
<b>Figura 10</b>	<i>Annona muricata</i> L. Fonte: <a href="http://www.maniadeamazonia.com.br">www.maniadeamazonia.com.br</a> . Acessado em 20 de agosto de 2012.....	<b>38</b>

<b>Figura 11</b>	Desenho esquemático dos ramos, folhas, frutos e sementes (fotos) da <i>Annona muricata</i> L. (Graviola) (Fontes: FOTO e desenhos <a href="http://botgard.bio.uu.nl/seedlist/Images/Annona%20muricata%2083GR00169.jpg">http://botgard.bio.uu.nl/seedlist/Images/Annona%20muricata%2083GR00169.jpg</a> ; <a href="http://content6.eol.org/content/2009/04/20/22/28822_large.jpg">http://content6.eol.org/content/2009/04/20/22/28822_large.jpg</a> ; <a href="http://www.reservaecocerradobrasil.org/">http://www.reservaecocerradobrasil.org/</a> ; acessado em 25 de setembro de 2011).....	<b>39</b>
<b>Figura 12</b>	Acetogeninas isoladas da família Annonaceae.....	<b>43</b>
<b>Figura 13</b>	Alcalóide reticulina isolado da família Annonaceae.....	<b>45</b>
<b>Figura 14</b>	Extrato acetônico da <i>Annona muricata</i> L. Fonte. LabNOE –UFC.....	<b>58</b>
<b>Figura 15</b>	Placa de 96 poços com DMSO. Fonte. LabNOE –UFC.....	<b>60</b>
<b>Figura 16</b>	Placa com Alamar blue. Fonte. LabNOE –UFC.....	<b>62</b>
<b>Figura 17</b>	Animais em manutenção. Fonte. LabNOE –UFC.....	<b>63</b>
<b>Figura 18</b>	Coleta de sangue em camundongos Swiss. Fonte LabNOE-UFC....	<b>65</b>
<b>Figura 19</b>	Animal transplantado. Fonte LabNOE-UFC.....	<b>68</b>
<b>Figura 20</b>	Animal em tratamento por via oral. Fonte LabNOE-UFC.....	<b>68</b>
<b>Figura 21</b>	Fotomicrografia do tumor de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A ) foi tratado com veículo de diluição da substância TWEEN 80 (1 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). AMSA-F2 foi administrada nas doses de 7,5 (C) 15 e 30mg/kg/dia gavagem (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.....	<b>81</b>
<b>Figura 22</b>	Fotomicrografia do fígado de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância TWEEN 80 (1 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). AMSAF2 foi administrada nas doses de 7,5 (B), 15 e 30mg/kg/dia v.o. (D e E). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.....	<b>82</b>
<b>Figura 23</b>	Fotomicrografia do baço de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (TWEEN 80 (1 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle	

positivo (E). AMSAF2 nas doses de 7,5 (C) , 15 (D) 15 E 30 (B)mg/kg/dia v.o.. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 200x e 400x..... **83**

**Figura 24** Fotomicrografia do rim de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (TWEEN 80 (1 %)). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (E e F). AMSAF2 nas doses de 7,5 (B) , 15 (C) 15 E 30 (D)mg/kg/dia v.o..Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x..... **84**

**Figura 25** Fotomicrografia do Estômago de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (TWEEN 80 (1 %)). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (D). AMSAF2 nas doses de 7,5 (B) e 30 (C)mg/kg/dia v.o. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 100x..... **85**

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Efeito da AMSA-F2 nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/Kg/dia v.o. sobre a proliferação tumoral de camundongos (*Mus musculos*) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento. C: o controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga TWEEN 80( 1%). 5-FU: o 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi utilizado como controle positivo. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de 10 animais. \*p < 0,01, \*\*p<0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet..... **77**
- Gráfico 2** Número de plaquetas após tratamento por 07 dias com extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* (AMSAF2). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média ± erro padrão da média (E.P.M) ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade:  $1159 \times 10^3 / \mu\text{L}$  (SUCKOW *et al.*, 2006)..... **89**
- Gráfico 3** Número de leucócitos totais após tratamento por 07 dias com extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* (AMSAF2). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média ± erro padrão da média (E.P.M) ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade:  $12,43 \times 10^3 / \mu\text{L}$  (SUCKOW *et al.*, 2006)..... **89**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Utilização Etnofarmacológica da Graviola no Brasil e no Mundo..	<b>47</b>
<b>Tabela 2</b>	Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.....	<b>58</b>
<b>Tabela 3</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do extrato acetônico AMSAF2 frente às linhagens tumorais humanas de leucêmica (HL-60) , glioblastoma (SF-295), Ovário (OVCAR-8) e .colon (HCT-8) e linfócitos.Valores originados de 3 experimentos independentes e apresentados em valores de $CI_{50}$ obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%. A doxorubicina foi usada como controle positivo.....	<b>72</b>
<b>Tabela 4</b>	Relatório contendo os dados dos ensaios do teste de toxicidade aguda pelo método Up and Down.....	<b>75</b>
<b>Tabela 5</b>	Dados dos experimentos usando o método Up and Down.....	<b>75</b>
<b>Tabela 6</b>	Resultados estatísticos dos ensaios de toxicidade aguda usando o método Up and Down.....	<b>76</b>
<b>Tabela 7</b>	Peso dos animais inicial e final dos animais e do tumor nos dias de tratamento (10 dias) .O quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi utilizado como controle positivo. * $p < 0,01$ . Dados apresentam a média $\pm$ E.P.M. a, ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo de animais saudáveis por ANOVA seguido por Newman-Keuls (n = 10). .....	<b>78</b>
<b>Tabela 8</b>	Efeito da AMSAF2 nas doses de 7,5mg/Kg, 15mg/Kg e 30mg/Kg/dia v.o. sobre o peso úmido relativo dos órgãos de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento. C: o controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga TWEEN 80(1%). O quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi utilizado como controle positivo. * $p < 0,01$ . Dados apresentam a média $\pm$ E.P.M. a, ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo de animais saudáveis por ANOVA seguido por Newman-Keuls (n = 10).....	<b>80</b>
<b>Tabela 9</b>	Efeito do extrato etanólico isolado da planta <i>Annona muricata</i> (AMSAF2) sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos <i>Mus musculus</i> transplantados com Sarcoma 180. ALT = Alanina aminotransferase, AST = aspartato transaminase, Ureia e Creatinina. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni e correspondem à média $\pm$ E.P.M. de cinco animais. a, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo de animais saudáveis.....	<b>87</b>

**Tabela 10** Efeito do extrato etanólico isolado da planta *Annona muricata* (AMSAF2) sobre os parâmetros Hematológicos de sangue periférico de camundongos *Mus musculus* transplantados com Sarcoma 180. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni e correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de cinco animais. a,  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo de animais saudáveis.....

## RESUMO

*Annona muricata*, conhecida popularmente como gravioleira, é uma planta usada amplamente na medicina popular na forma de chás e infusões para o tratamento de diversas doenças, como o câncer. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade e a atividade antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata*. O presente estudo foi realizado frente a um painel de 4 linhagens de células tumorais, as células HL-60, HCT-116, SF-295 e OVCAR-8 obtiveram os valores de  $IC_{50}$  0,1944 $\mu$ g/mL, 0,1488 $\mu$ g/mL, 0,0601 $\mu$ g/mL e 0,0987  $\mu$ g/mL respectivamente. Na análise frente a eritrócitos de camundongos obtivemos a  $IC_{50}$  de 9,23 $\mu$ g/mL. O estudo de toxicidade aguda foi realizado *in vivo* e a  $DL_{50}$  foi de 310,2 mg/kg. O estudo da atividade hemolítica foi feita utilizando suspensão de eritrócitos de camundongos não causando lise. O estudo da avaliação antitumoral nas doses (7,5; 15 e 30mg/kg/dia por via oral) em camundongos transplantados com Sarcoma 180 revelou atividade em todas as doses, causando uma redução de 48,41% do crescimento tumoral na maior dose. As análises do fígado e rins revelaram que houve algumas alterações no fígado, como esteatose e necrose focal sugerindo toxicidade hepática nos camundongos tratados com o extrato acetônico das sementes da *Annona muricata*. Essas alterações são, entretanto, consideradas de possível reversão do tecido com a descontinuidade do tratamento ou adequação da dose. As análises bioquímicas, revelaram um aumento nos níveis séricos da creatinina nas doses de 15 e 30 mg/kg/dia. Nos testes hematológicos não houve alterações nos grupos tratados com o extrato acetônico das sementes da *Annona muricata*. Os resultados mostraram poucas alterações dos animais nos parâmetros físicos, bioquímicos e hematológicos, mostrando que o extrato é bem tolerado e pouco tóxico.

Palavras-chave: *Annona*, *Annona muricata*, Sarcoma 180, Crescimento tumoral.

## ABSTRACT

*Annona muricata*, popularly known as soursop, is a plant widely used in folk medicine as teas and infusions for the treatment of various diseases such as cancer. The aim of this study was to cytotoxicity evaluate the antitumor activity of the acetone extract of the seeds of *Annona muricata*. This study was conducted with a panel of four tumor cell lines, HL-60 cells, HCT-116, SF-295 and OVCAR-8 IC<sub>50</sub> values obtained 0.1944 µg/ ml, 0.1488 µg/mL, 0.0601 µg/mL and 0.0987 µg/mL, respectively. In the analysis across from erythrocytes of mice obtained the IC<sub>50</sub> of 9.23 µg/mL. The acute toxicity study was conducted in vivo and DL<sub>50</sub> was 310.2 mg/kg. The study of hemolytic activity was performed using cell suspension from mice without causing lysis. The evaluation study antitumor doses (7.5, 15 and 30mg/kg/day orally) in mice transplanted with Sarcoma 180 showed activity at all doses, causing a reduction of 48.41% of tumor growth at the highest dose . Analyses of liver and kidney revealed that there were some changes in the liver, such as steatosis and focal necrosis suggesting liver toxicity in mice treated with acetone extract of the seeds of *Annona muricata*. These changes are, however, considered the possible reversal of the tissue with treatment discontinuation or dose adjustment. Biochemical analysis revealed an increase in serum creatinine at doses of 15 and 30 mg/kg/day. In haematological tests there were no changes in the groups treated with acetone extract of the seeds of *Annona muricata*. The results showed little change in physical parameters of the animal, biochemical and hematological showing that the extract is well tolerated and less toxic.

Keywords: *Annona muricata*, Sarcoma 180, Tumor growth.

# ***Introdução***

## 1 Introdução

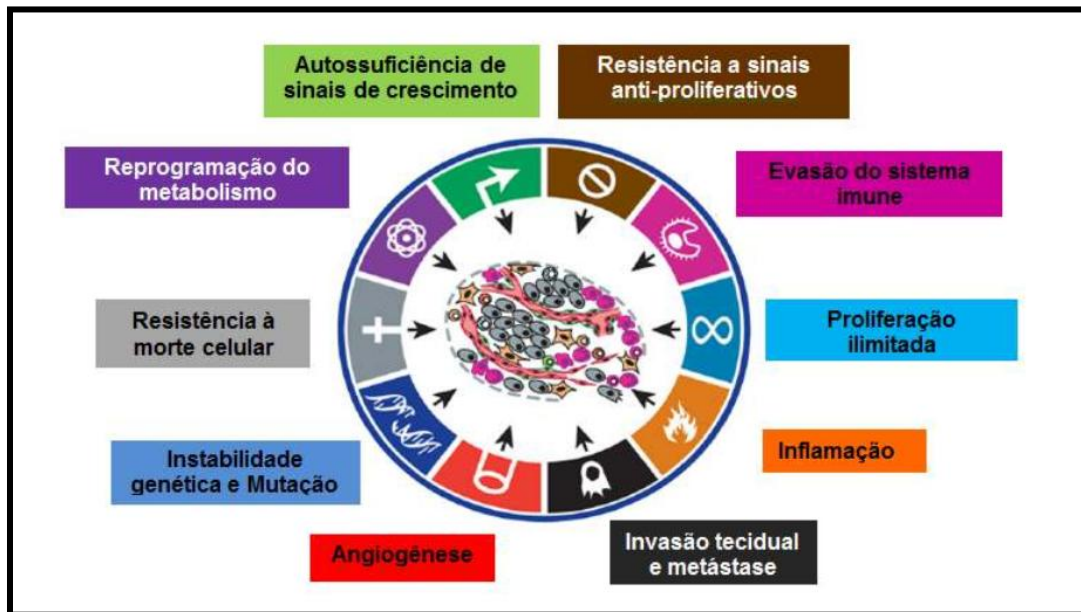
### 1.1 Câncer

O câncer tem afligido os seres humanos ao longo de sua história, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor, é uma das doenças que mais causam temor na sociedade. Não é surpresa que desde os primórdios os médicos têm escrito sobre o câncer. Alguns dos primeiros registros de câncer foram encontrados em tumores ósseos fossilizados, em múmias do Egito Antigo e manuscritos antigos. A descrição mais antiga sobre o Câncer (embora esse termo não tenha sido utilizado) data de aproximadamente 1600 a.C no Egito e foi encontrada no papiro de Edwin Smith que descreve oito casos de úlceras e tumores de mama tratados com cauterização utilizando uma ferramenta chamada de “broca de fogo” (PAPAC, 2001; KUMMAR *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005;).

O Câncer é considerado um conjunto de doenças complexas caracterizadas pela instabilidade genética e capacidade de se replicar descontroladamente. Existem mais de cem tipos de câncer e subtipos de tumores que podem ser encontrados em órgãos específicos. Entre as alterações (mutações) presentes em tumores malignos podemos destacar: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade à inibição de fatores de crescimento, inibição da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, invasão de tecidos e metástase. Além disso, os tumores evoluíram de forma a garantir apoio nas células do estroma, a atrair novos vasos sanguíneos, e, finalmente, adquiriram estratégias para escapar da detecção imunológica (HANAHAN & WEINBERG, 2011; KNOWLES & SELBY, 2005; BALDUCCI, 2007; KROEMER & POUYSSEGUR, 2008; LUO *et al.*, 2009). LUO *et al.*, 2009 adicionam outras características fenotípicas para as células cancerígenas, que são: estresse metabólico, proteotóxico, mitótico, oxidativo e de dano ao DNA **(Figura 1)**.

Muitas dessas características fenotípicas foram adquiridas por meio de alterações genéticas que envolveram mutações com ganho de função e/ou ampliação de oncogenes juntamente com a perda de função e/ou silenciamento epigenéticos de genes supressores de tumor (HANAHAN & WEINBERG, 2002; LUO *et al.*, 2009).

**Figura 1:** Características essenciais das células tumorais



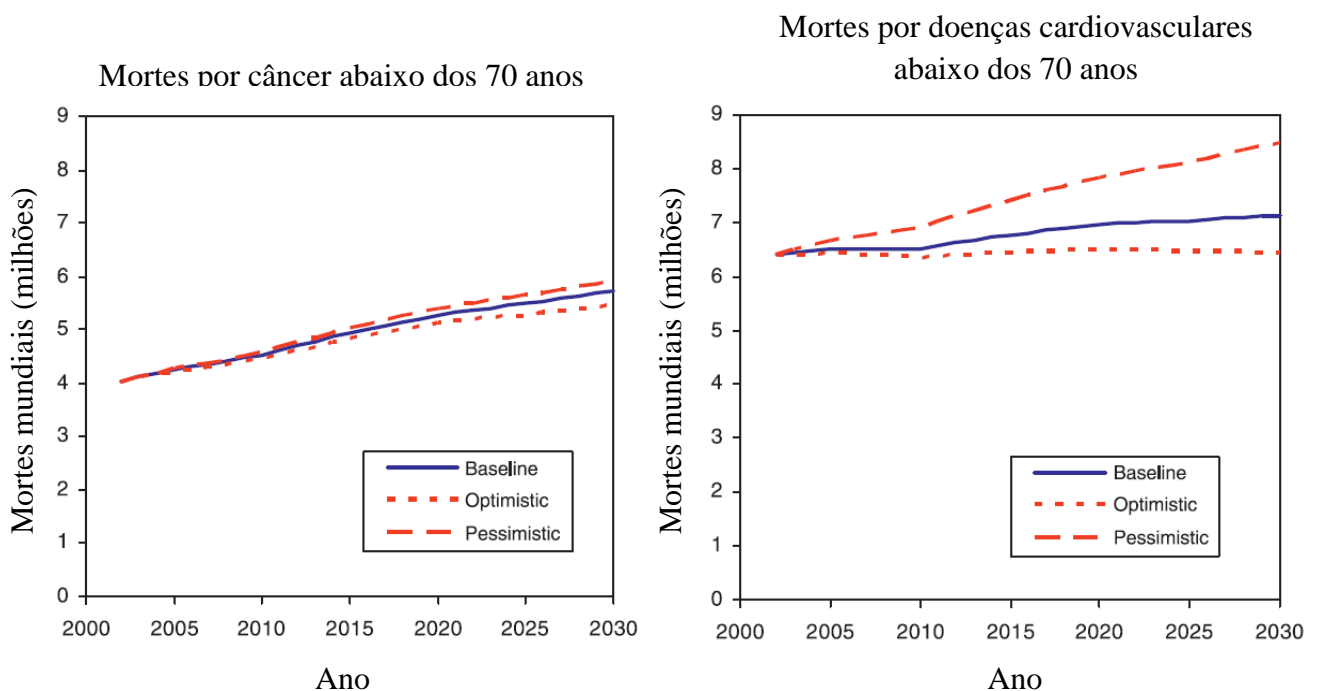
Fonte: Adaptado de (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Essas mutações são resultados, frequentemente, de erros ocorridos durante a replicação do DNA e podem ocorrer, também, por exposição a misturas químicas complexas encontradas no ambiente ou no nosso estilo de vida e nas dietas. A “carcinogênese química” é dividida conceitualmente em quatro etapas: iniciação, promoção, conversão para a malignidade e progressão tumoral. As mudanças genéticas resultante da interação química-DNA é definida como iniciação. Com o passar do tempo, ocorrem mudanças genéticas adicionais, oncogenes tornam-se ativos e genes supressores de tumor juntamente com genes de reparo do DNA tornam-se inativos, levando a uma instabilidade genômica. Com a continuidade do processo, o cenário direciona-se para as transformações malignas (expressão de fenótipos malignos), progressão tumoral e metástase (WEINBERG, 2008; KUMMAR *et al.*, 2004; RIEGER, 2004; BERTRAM, 2001).

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes saudáveis. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções; assim, por exemplo, a invasão neoplásica dos pulmões gera alterações respiratórias; com isto há a disfunção orgânica que pode levar à falência do órgão ou, em casos mais graves, leva à morte do paciente (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O câncer é a primeira maior causa de morte no mundo em países desenvolvidos, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/Organização Mundial da Saúde (OMS), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Para o ano de 2015 espera-se que ocorram cerca de 60,8 milhões de óbitos em todo o mundo, destes, 9,2 milhões (15,13%) serão de câncer; já para o ano de 2030, se espera que 11 milhões (17,5%) das causas de mortes mundiais sejam de câncer (FLEMING, 2003; HEALTH STATISTICS AND INFORMATICS DEPARTMENT, 2008; BOYLE & LEVIN, 2008; INCA, 2012). **Figura 2**

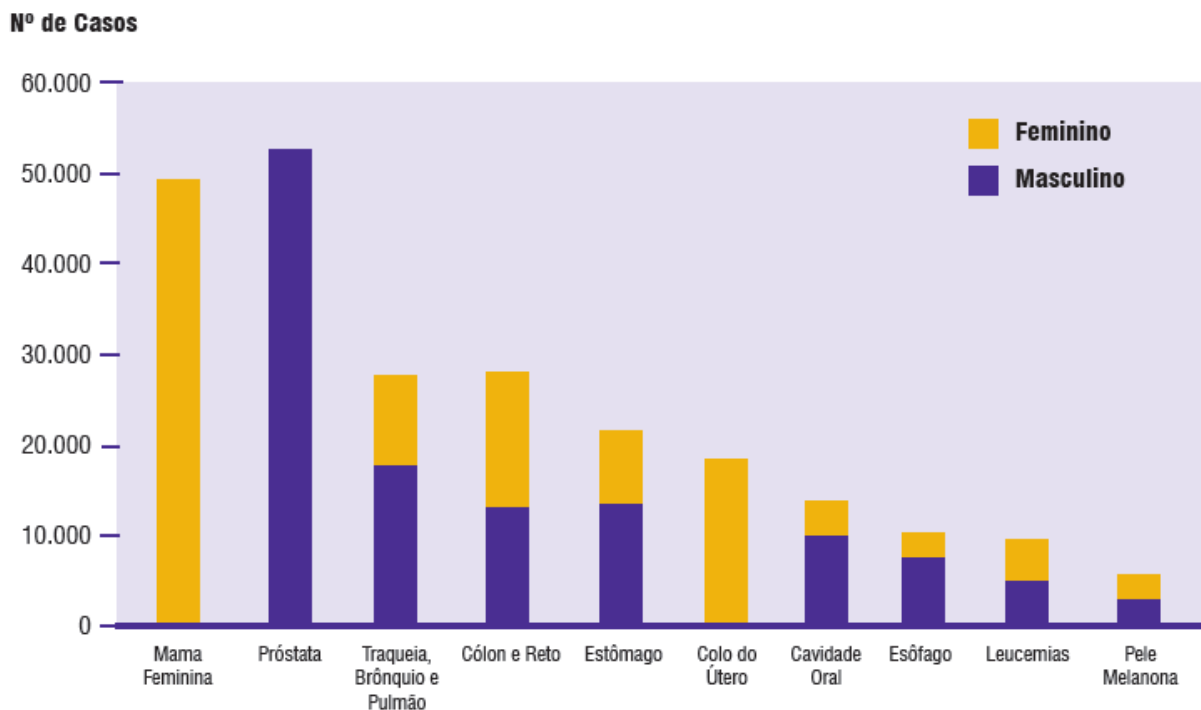
**Figura 2-** Comparação entre os números de mortes mundiais para enfermidades cardiovasculares e câncer no período de 2002-2030 para a população mundial **abaixo dos 70 anos**. Fonte: Adaptato de Mathers & Loncar, 2006.



No Brasil, as estimativas, para o ano de 2012, serão válidas também para o ano de 2013, e apontam para a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude

observada para a América Latina. Em 2012, são esperados 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2012) (**Figura 3**).

**Figura 3:** Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012, exceto pele não melanoma, na população brasileira. Fonte: INCA, 2012.



Diante de tal cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na pesquisa e na gestão do SUS (INCA, 2012).

## 1.2 Produtos Naturais

A natureza é uma fonte atrativa de compostos farmacologicamente ativos candidatos ao tratamento de patologias devido a enorme diversidade química encontrada nas milhões de espécies de plantas, animais e microorganismos (ROCHA *et al.*, 2001).

No século passado diversas classes de produtos naturais foram isoladas e caracterizadas. Estas descobertas, juntamente com a elucidação de mecanismos biológicos e bioquímicos de ação terapêutica, têm sido fundamentais para o trabalho da química orgânica e medicinal, sendo, portanto áreas complementares e co-dependentes, similar ao conceito chinês de Yin & Yang: um não está presente ou suficiente sem o outro (**Figura 4**) (LEE, 2010). Por exemplo, entre 1981 e 2002, 5% das 1.031 novas entidades químicas aprovadas pelo FDA (*“Food and Drug Administration”*) eram produtos naturais, e outros 23% eram moléculas derivadas de produtos naturais (CLARDY & WALSH, 2004).



**Figura 4:** Complementaridade da Química e Biologia. Química Medicinal é uma arte que combina a Química e a Biologia no descobrimento de novas drogas. Adaptado de LEE, 2010.

Os produtos naturais são metabólitos secundários, produzido por plantas, bactérias, protozoários e animais em resposta a estímulos externos como: mudança nutricional, infecção, competição e predação. Muitos desses metabólitos já foram isolados e os compostos ativos biologicamente possuem grande potencial terapêutico (CHIN, *et al.*, 2006; PESSOA *et al.*, 2006).

Os produtos naturais têm demonstrado ser uma fonte garantida e eficiente de novos agentes anti-neoplásicos. Assim, NEWMAN & CRAGG mostraram que 63% dos anti-neoplásicos introduzidas nos últimos 25 anos são produtos naturais ou

derivados de produtos naturais. Uma análise feita por BUTLER, 2004 lista que 79 agentes anti-câncer derivados de produtos naturais ou análogos de produtos naturais entraram em ensaio clínico nos anos de 2005-2007. Os produtos naturais não fornecem apenas novas drogas eficazes, mas também trazem um entendimento sobre novos mecanismos de ação no tratamento do câncer. (KINGSTON, 2009).

### 1.2.1 Produtos Naturais Anti-Câncer Originados de Plantas

A procura por produtos naturais com propriedades anti-câncer remonta, pelo menos, ao papiro de Ebers em 1550 a.C. Porém, o período em que se intensificaram os estudos nessa área é muito mais recente, a começar por Hartwell e colaboradores por volta dos anos 1960 (SRIVASTAVA, 2005).

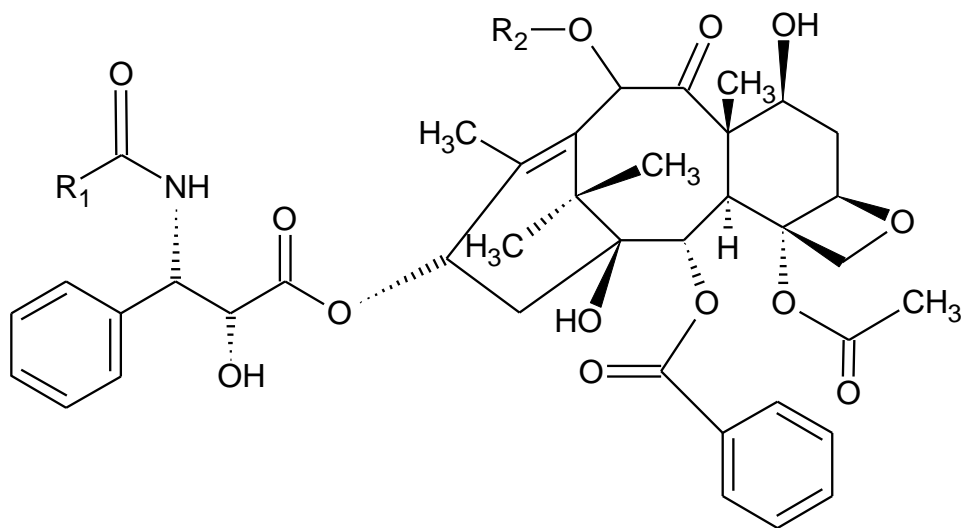
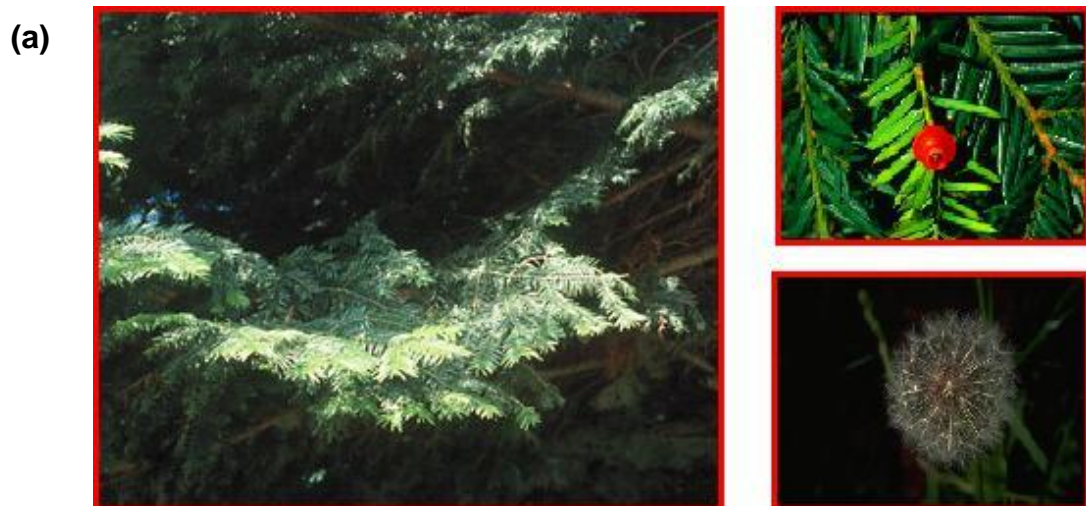
Um programa de triagem para agentes antitumorais a partir de plantas foi iniciado em 1960 sob a supervisão de Dr. Jonathan L. Hartwell do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em parceria com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Nesse programa, mais de 600 espécies de plantas foram coletadas nos estados de Califórnia, Washington e Oregon, incluindo casca, galhos, folhas e frutos de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) (**Figura 5a**) (Taxaceae) no estado Washington (PAZDUR *et al.*, 1993; WALL & WANI, 1996; SANTOS, 1998; CRAGG & NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).


Mais de 60% dos agentes anti-câncer usados na clínica são derivados de fontes naturais como: plantas, organismos marinhos e microorganismos (CRAGG & NEWMAN, 2005). Entre os compostos derivados de plantas mais relevantes que têm sido úteis no tratamento do câncer temos: paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>) e docetaxel; alcalóides da vinca, a vimblastina e vincristina; os derivados da camptotecina, topotecan e irinotecan, e os derivados da podofilotoxina, etoposídeo e tenoposídeo (CRAGG & NEWMAN, 2005).

O paclitaxel é um diterpenóide polioxigenado (**Figura 5b**) da família dos taxanos, encontrado inicialmente na casca da planta nativa do Pacífico *Taxus brevifolia* Nutt. Foi isolado em Junho de 1966 e apresentou atividade antitumoral contra tumor de Walker e atividade citotóxica contra as linhagens de leucemia L1210 e L1534 (PAZDUR *et al.*, 1993; WALL & WANI, 1996; SANTOS, 1998; CRAGG & NEWMAN, 2005; REDDY *et al.* 2003; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

Desde, então, mais de 300 taxóides já foram isolados e caracterizados em plantas do gênero *Taxus*. O Taxol<sup>®</sup> foi uma droga desenvolvida pelo NCI e em 1992 a indústria farmacêutica Bristol-Myers Squibb<sup>®</sup> recebeu, através do FDA (U.S. Food and Drug Administration), a aprovação para comercializá-lo para o tratamento de Câncer de ovário, metástase em mama, câncer de pulmão e sarcoma de Kaposi em uma dose de 135mg/m<sup>2</sup>. A grande desvantagem do taxol é a sua baixa biodisponibilidade e baixa solubilidade em água. Docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>) (**figura 5c**) é um derivado semi-sintético do taxol com uma atividade anticâncer mais potente e com melhor solubilidade em água; o uso dessa droga está associado com vários efeitos colaterais como: supressão de medula óssea, reações de hipersensibilidade, vômitos, alopecia, etc (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

O paclitaxel atua como um agente estabilizante de microtúbulos; enquanto que outras drogas anti-câncer atuam desestabilizando estas proteínas. Normalmente, o monômero tubulina é polimerizado à microtubulina que por sua vez é despolimerizada à tubulina, processo este que ocorre em equilíbrio. O paclitaxel liga-se à tubulina não permitindo o processo de despolimerização. Isso faz com que os feixes de microtúbulos sejam anormais e não ocorra formação do fuso mitótico. Células cancerosas, frequentemente, apresentam mau funcionamento do ponto de checagem do fuso e, ao tentar se dividir dentro de uma circunstância instável ou desfavorável, são levadas à morte (PAZDUR *et al.*, 1993; WALL & WANI, 1996; SANTOS, 1998; CRAGG & NEWMAN, 2005; REDDY *et al.* 2003; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).



Paclitaxel **(b)** – R<sub>1</sub> =  ; R<sub>2</sub> = COCH<sub>3</sub>  
 Docetaxel **(c)** - R<sub>1</sub> = OC(CH<sub>3</sub>); R<sub>2</sub> = H

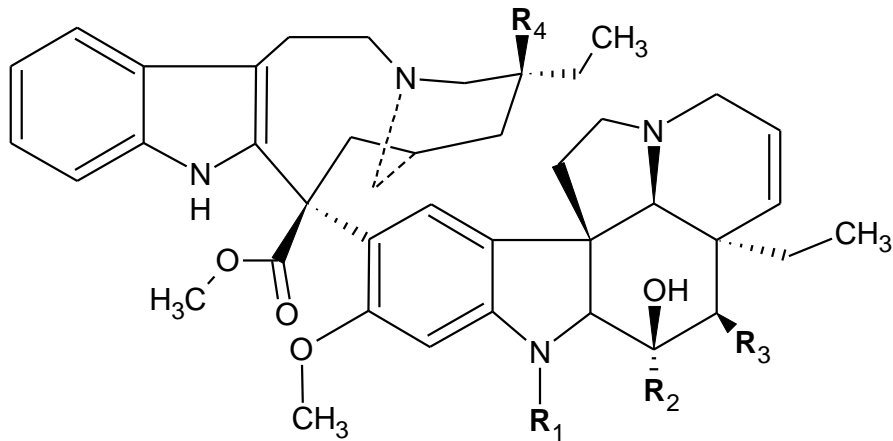
**Figura 5.** *Taxus brevifolia* (a); estruturas químicas do paclitaxel (b) e docetaxel (c).

Os alcalóides da vinca, Vimblastina e Vincristina (**Figura 6b e 6c**), isolados da planta *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae) (**Figura 6a**), foram utilizados por muitas culturas para o tratamento de diabetes. Em prospecção da planta como fonte potencial de hipoglicemiantes orais, notou-se que os extratos causavam leucopenia e depressão de medula óssea em ratos; e posteriormente, verificou-se sua atividade contra leucemia linfocítica em camundongos (CRAGG & NEWMAN, 2005).

Apesar de a planta ser originalmente endêmica de Madagascar, as amostras utilizadas na descoberta da Vimblastina e Vincristina foram coletadas na Jamaica e Filipinas. Mais recentemente, alguns análogos dessas substâncias foram semi-sintetizados, Vindesina e Vinorelbina (**Figura 6d e 6e**). Esses agentes são usados em combinação com outros quimioterápicos para uma variedade de cânceres, incluindo leucemias, linfomas, câncer avançado de testículo, câncer de mama e pulmão e Sarcoma de Kaposi (FAHY *et al.*, 1997; CRAGG & NEWMAN, 2005; KRZAKOWSKI *et al.*, 2007).

Os alcalóides da vinca ligam-se à tubulina, impedindo a polimerização dos microtúbulos e conseqüente formação do fuso mitótico, resultando na parada do ciclo celular durante a mitose (LING *et al.*, 1996; MANN, 2002).

(a)



Vimblastina **(b)** –  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$ ;  $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$ ;  $R_4 = \text{OH}$

Vincristina **(c)** –  $R_1 = \text{COH}$ ;  $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$ ;  $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$ ;  $R_4 = \text{OH}$

Vindesina **(d)** –  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{CONH}_3$ ;  $R_3 = \text{OH}$ ;  $R_4 = \text{OH}$

Vinorelbina **(e)** –  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$ ;  $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$ ;  $R_4 = \text{H}$

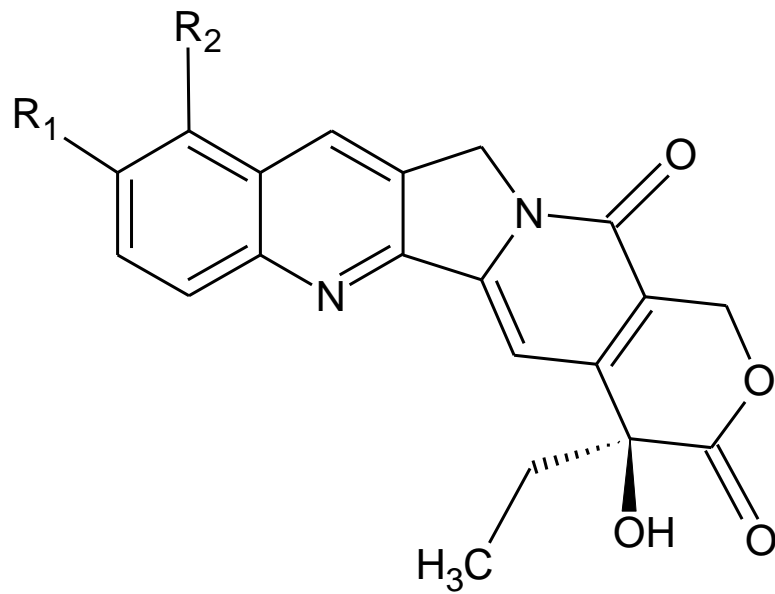
**Figura 6.** *Catharanthus roseus* (a); estruturas químicas da Vimblastina (b), Vincristina (c), Vindesina (d) e Vinorelbina (e).

No início dos anos 1960, a descoberta da Camptotecina (**Figura 7b**) pelos pesquisadores WALL & WANI como um fármaco antineoplásico e de modo de ação única, inibindo a topoisomerase I, acrescentou uma nova dimensão no campo da quimioterapia (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). A camptotecina é um alcalóide do grupo dos quinolinoalcalóides e foi isolada primeiramente da árvore nativa da China *Camptotheca acuminata* Decne. (Nyssaceae) (**Figura 7a**), conhecida também como “árvore da alegria” e “árvore do amor”. Essa substância pode ser encontrada em diferentes partes da planta, como, raízes, galhos e folhas (PAZDUR *et al.*, 1993; WALL & WANI, 1996; ROCHA *et al.*, 2001; ZHANG, 1998; MANN, 2002; CRAGG & NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

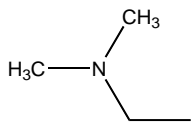
Estudos preliminares “*in vitro*” revelaram atividade antitumoral em células leucêmicas de camundongo o que logo tornou o alcalóide um possível agente antitumoral. A molécula da Camptotecina tornou-se tão importante que, entre os anos de 1966-2004, mais de 3.000 trabalhos científicos sobre ela foram publicados. Atualmente, os primeiros análogos da Camptotecina, Topotecan (Hycantin<sup>®</sup>) (**Figura 7c**) e Irinotecan (Camptosar<sup>®</sup>) (**Figura 7d**), são comercializados pelas indústrias farmacêuticas Glaxo-SmithKline<sup>®</sup> e Pfizer<sup>®</sup>, respectivamente, para o tratamento de câncer de ovário e cólon retal (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

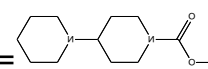
O principal alvo da Camptotecina na célula é a enzima topoisomerase I, enzima responsável pelo relaxamento do DNA durante a replicação. A camptotecina liga-se a esse complexo DNA-topoisomerase, deixando-o estável, e impedindo que as duas fitas do DNA se separem e possam então ser replicadas e transcritas (PAZDUR *et al.*, 1993; WALL & WANI, 1996; ROCHA *et al.*, 2001; ZHANG, 1998; MANN, 2002; CRAGG & NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

(a)



Camptotecina (**b**) –  $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$

Topotecan (**c**) –  $R_1 = H$ ;  $R_2 =$    $R_2 =$

Irinotecan (**d**) -  $R_1 =$  ;  $R_2 = CH_2CH$

**Figura 7.** *Camptotheca acuminata* (a); estruturas químicas da Camptotecina (b), Topotecan (c) e Irinotecan (d).

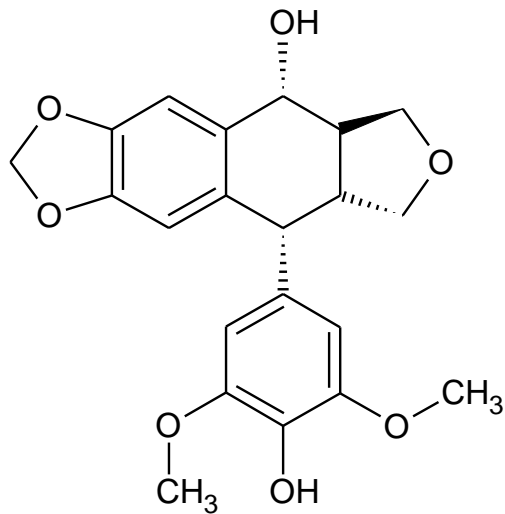
A Podofilotoxina (**Figura 8b**) é uma lignina bioativa que foi isolada primeiramente por Podwysstzki em 1880, a partir da planta norte americana *Podophyllum peltatum* Linnaeus (Berberiadaceae) (**Figura 8a**) vulgarmente conhecida como “maçã americana”. Posteriormente, ela foi isolada de várias outras espécies como *P. emodi* Wall e *P. pleianthum*. Essas plantas foram muito utilizadas por americanos e asiáticos no tratamento de câncer de pele e verrugas (ROCHA *et al.*, 2001; MANN, 2002; CRAGG & NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

Podofilotoxina possui atividade citotóxica em várias linhagens de células cancerígenas e é eficaz no tratamento de vários tumores como: tumores de Wims, vários tumores genitais, tumores de pulmão e linfomas. Seu principal mecanismo de ação é a inibição da polimerização dos microtúbulos, causando parada do ciclo celular em metáfase, e bloqueio de atividade da topoisomerase II. As tentativas de uso em neoplasias humanas não tiveram êxito devido ao fato da mesma apresentar vários efeitos colaterais como: náuseas, vômitos, danos aos tecidos normais, etc. ( CRAGG & NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

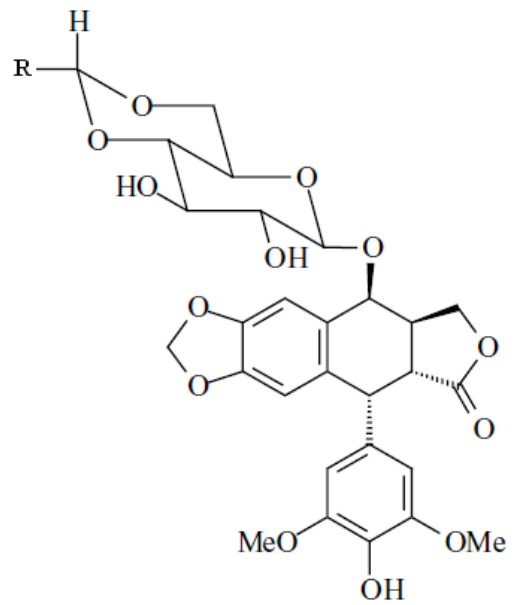

Extensas modificações na estrutura foram realizadas para obter agentes antitumorais mais potentes e menos tóxicos, o que resultou em dois compostos semi-sintéticos: etoposídeo (**Figura 8c**) e tenoposídeo (**Figura 8d**). Esses, por sua vez, são amplamente utilizados no tratamento de linfomas, leucemia aguda, câncer testicular, pulmonar, ovário, bexiga, cérebro, etc. (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

Essas modificações na estrutura da Podofilotoxina mudaram o mecanismo de ação dos dois semi-sintéticos, que passaram a apresentar somente atividade inibitória sobre a topoisomerase II (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

(a)



Podofilotoxina (b)

Etoposídeo (c) – R = CH<sub>3</sub>Tenoposídeo (d) – R = 

**Figura 8.** *Podophyllum peltatum* (a); estruturas químicas da Podofilotoxina (b), Etoposídeo (c) e Tenoposídeo (d).

### 1.3 Planta estudada: *Annona muricata* L.

A família Annonaceae compreende grande número de gêneros e espécies, a maioria nativa das regiões tropicais ou subtropicais. Possuem gineceu apocárpico, estames livres e numerosos, distribuídos espiraladamente em torno do receptáculo floral e polinização realizada predominantemente por besouros ( FAEGRI & PIJL, 1980; VIDAL HERNÁNDEZ, 1993, MOSCA, *et al.*, 2006).

A família *Annonaceae* é composta por aproximadamente 120 gêneros, dos quais apenas três, *Annona*, *Rollinia* e *Duguetia*, produzem frutos comestíveis, todos originários de regiões tropicais da Ásia, África e América. O gênero *Annona* é o mais importante com mais de 50 espécies. Muitas dessas espécies têm interesse como frutíferas comerciais (JOLY, 1979; CRANE & CAMPBELL, 1990; MOSCA, *et al.*, 2006).

No Brasil, apenas as espécies do gênero *Annona* são cultivadas comercialmente, sendo uma das mais importantes a *Annona muricata* L., conhecida popularmente como gravioleira, e o fruto conhecido por Graviola, Araticum de Comer, Araticum Grande, Araticum Manso, Araticum, Jaca, Jaca de Pobre, Coração de Rainha, Jaca do Pará, Jaqueira Mole, Condessa. O fruto graviola é conhecido pelos antigos aborígenes haitianos como *Anon*. Na Holanda é conhecida como *Zuurzak*, na Alemanha como *Sauersack*, *Stachel-Annone* e *Stachelannone*, no México como *Anona amarilla*, *Cabeza de Negro* e *Zapote de Viejas*; *Soursop* na língua inglesa, *Guanábana*, *Guanábano*, *Catuch* e *Zapote agrio* em espanhol; *Cachiman Épineux*, *Cachiman Morreux*, *Corossol Épineux*, *Sapotille*, *Corossolier*, *Corossol* em francês, *Brazilian pawpaw*, *Prickly Custard Apple*, *Soursap*, *Soursapi* e *Soursop* em inglês (ANTOUN, *et al.*, 1993; BRANCH; SILVA, 2003; FEO, 1992; MORS, *et al.*, 2000; <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?3492>).

### 1.3.1 Características Botânicas

#### 1.3.1.1 Taxonomia

**Reino:** *Plantae*

**Divisão:** *Spermatophyta*

**Sub-Divisão:** *Angiospermae*

**Classe:** *Dicotyledoneae (Magnoliatae)*

**Ordem:** *Ranales*

**Sub-Ordem:** *Magnoliales*

**Família:** *Annonaceae*

**Gênero:** *Annona*

**Espécie:** *Annona muricata L.*

**Sinonímia:** *Annona macrocarpa; Annona bonplandiana; Annona cearensis; Guanabanus muricatus (L) M. Gómez*

**NOME CIENTÍFICO:** *Annona muricata L.*

**NOME POPULAR:** Gravioleira (a árvore); Graviola (a fruta)

#### 1.3.1.2 Habitat

Considerada como originária das Antilhas por Oviedo (1526, citado por Patiño em 1963), a gravioleira ocorre em toda América Tropical, mais especificamente da América Central e Vales Peruanos, e daí distribuída para todas as regiões tropicais do mundo. É resistente ao solo pobre e ocorre mais frequentemente nas áreas ao nível do mar (0 m) a 1.200 m de altitude (FALCÃO *et al.*, 1982; MANICA, 1997).

### 1.3.1.3 Descrição Botânica

A gravioleira (**Figura 9**) é uma árvore de pequeno porte, com altura de 3,5-8 m, copa pequena, de ramificação assimétrica e de folhagem compacta. As folhas são inteiras, simples, alternas, pecioladas, ovaladas, oblongas ou elípticas, coriáceas, duras, de pecíolos curtos, de cor verde-escuro-brilhante na parte superior e verde-amarelada na parte inferior, medindo de 5 a 18 cm de comprimento por 2 a 7 cm de largura, quando adultas (MANICA, 1997; MOSCA, *et al.*, 2006).

**FIGURA 9.** *Annona muricata* L. Acessado em 18 de setembro de 2011; Fonte: [http://www.rarexoticseeds.com/Fruits/Graines\\_Anonna\\_Muricata\\_Seeds\\_Soursop\\_Corosollier](http://www.rarexoticseeds.com/Fruits/Graines_Anonna_Muricata_Seeds_Soursop_Corosollier)

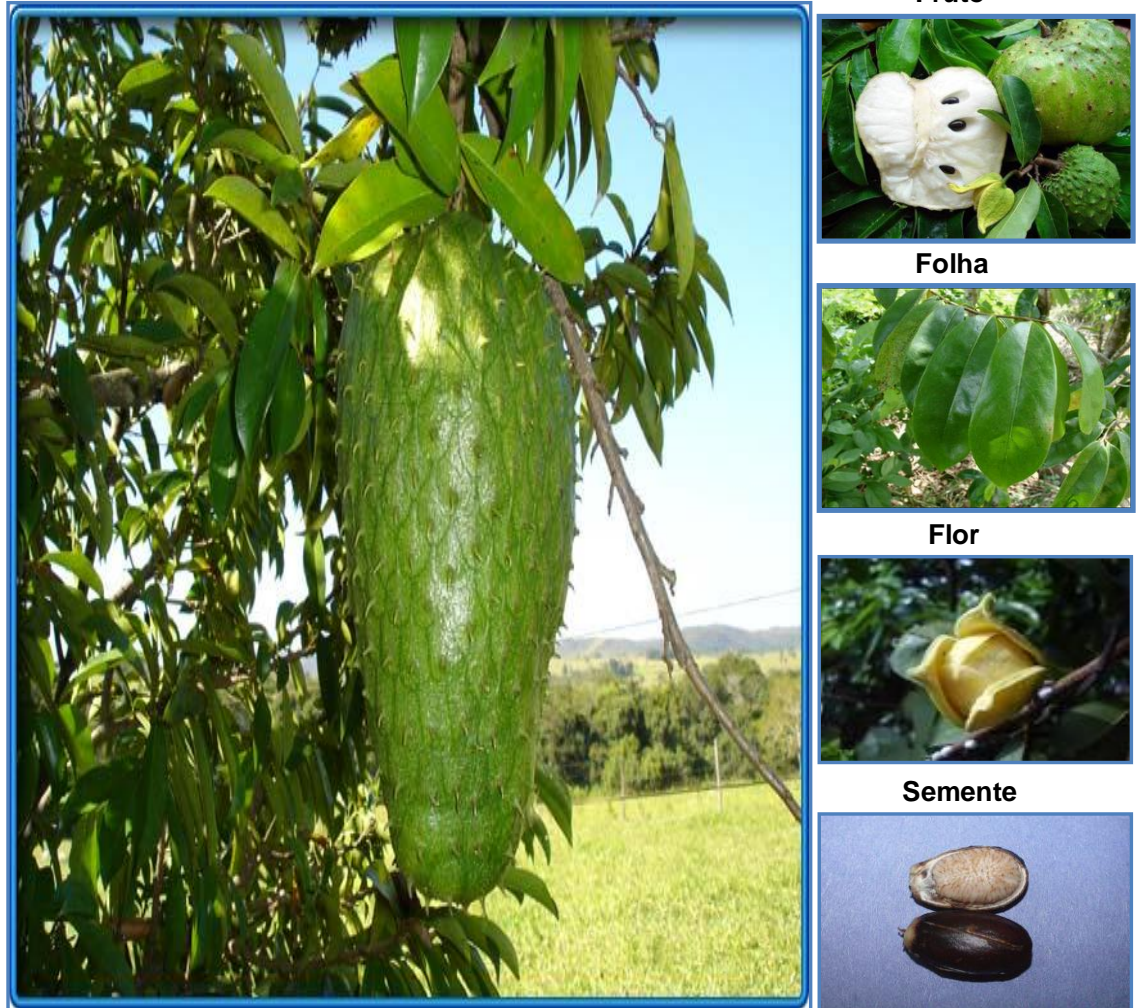


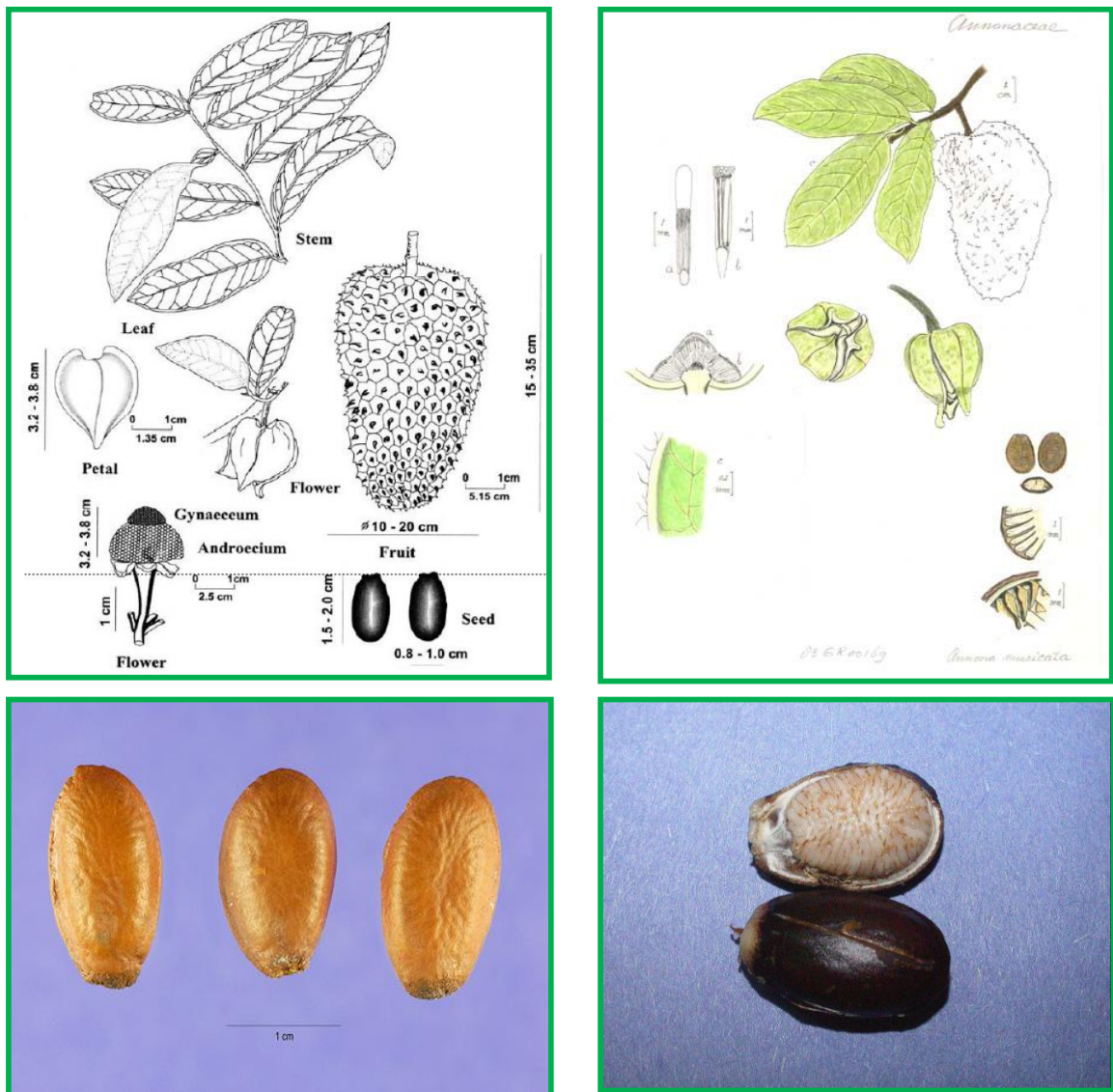
As flores no estágio de “capulho” tem um formato subgloboso ou piramidal, são hermafroditas, grandes, solitárias, actinomorfas, diclamídeas, com cheiro forte, de cor verde-escuro quando em crescimento e verde clara quando próximas da antese. Quando abertas, são amareladas, amarelo-enxofre ou creme, com seis

pétalas grossas e carnosas, côncavas, até 4 centímetros de comprimento e 3 centímetros de largura, cordadas na base e acuminadas no ápice, as interiores um pouco menores e menos espessas, imbricadas. Distribuídas em pedúnculos curtos axilares ou diretamente do tronco, solitárias ou agrupadas de 2 a 4 flores, originadas de raminhos curtos dos ramos de plantas velhas que, após a fecundação, formam cachos de frutos, conhecidos como graviola **(Figura 10)**.

O fruto é uma baga composta, frutos múltiplos ou sincarpo, carnosos, grande, ovóide ou cordado-oblongo, podendo ter até 30 cm de comprimento por 20 cm de diâmetro, chegando a pesar 10 kg ou mais. A casca é delgada, de aparência reticulada de coloração verde-escura, quando o fruto está em desenvolvimento e de cor verde clara brilhante em frutos maduros, possuindo espículas carnosas, moles e recurvadas, correspondendo cada uma a um carpelo. A polpa é formada por gomos de coloração branca, perfumada, muito sucosa, ligeiramente ácida e muito aromática, de sabor agradável; sementes numerosas, negras ou marrons, brilhantes **(Figura 11)**. (FALCÃO *et al.*, 1982; MOSCA *et al.*, 2006).

**Figura 10.** *Annona muricata* L. Fonte: [www.maniadeamazonia.com.br](http://www.maniadeamazonia.com.br) .Acessado em 20 de agosto de 2012.





**Figura 11.** Desenho esquemático dos ramos, folhas, frutos e sementes (fotos) da *Annona muricata* L. (Graviola) (Fontes: FOTO e desenhos).

A gravioleira (*Annona muricata* L.) é uma das importantes frutíferas cultivadas no Nordeste Brasileiro, principalmente nos Estados da Paraíba, Ceará, Pernambuco e Bahia, sendo seus frutos utilizados na fabricação de suco, sorvetes, compotas, geléias, doces, iogurte e cremes. Possui grande valor comercial sendo industrializado em vários países (SACRAMENTO, *et al.*, 2003).

#### 1.3.1.4 Constituintes

A *Annona muricata* L. foi estudada por vários pesquisadores, que determinaram seus constituintes químicos, teor de carboidratos, lipídeos, ácidos graxos, proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, vitaminas e sais minerais. Os frutos são ricos em carboidratos com baixíssimos teores de gorduras, e não é considerado como de grande valor protéico.

A composição e o valor nutritivo de cada 100 gramas de polpa é de: Água – 78 a 85,3%; Proteínas – 0,62 a 1,7 g; Lipídios – 0,2 a 0,7 g; Glicídios – 11,5 a 18,2 g; Acidez – 0,8 a 3,0 %; Açúcar total – 10,1 a 16,8 %; pH – 3,6 a 4,2; Taninos – 3,6 a 4,2 g; Calorias – 60; Fibra – 1,10 a 4,21 g; Cálcio – 22,0 a 41,6 mg; Fósforo – 28 a 78,4 mg; Ferro – 0,5 a 6,0 mg; Vitamina A – 20 U.I.; Vitamina B1 – 0,1 a 1,0 mg; Vitamina B2 – 0,05 a 0,07 mg; Niacina – 0,9 mg; Vitamina C – 10,5 a 57,0 mg; Aminoácidos Triptofano – 11 mg; Metionina – 7 mg; Lisina – 60 mg (PAULL, 1983; CASTRO *et al.*, 1984; MORTON, 1987; SACRAMENTO *et al.*, 2003, SOUZA, *et al.*, 2008).

#### 1.3.1.5 Pesquisa Fitoquímica

O metabolismo secundário da graviola produz um grupo de fitoquímicos bioativos, onde se destacam as acetogeninas que estão presentes nas folhas, na casca do caule e nas sementes (FERAS *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 1996; PAULL, 1983; CASTRO *et al.*, 1984; MORTON, 1987; SACRAMENTO *et al.*, 2003).

A transformação química qualitativa mais marcante que ocorre na maturação dos frutos da gravioleira é a decomposição de carboidratos, notadamente a conversão de amido em açúcares solúveis. Essa transformação tem efeito no sabor e na textura dos frutos (CHITARRA & CHITARRA, 1990; MOSCA, *et al.*, 2006).

O metabolismo secundário da *Annona muricata* L. produz grupos de fitoquímicos bioativos, como os alcalóides, compostos fenólicos, óleos essenciais, flavonóides, terpenos e acetogeninas, estas são exclusivas do gênero (PONTES *et al.*, 2004). 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, taninos.

#### 1.4 As Acetogeninas

A maioria dos estudos da fitoquímica de Annonaceae não se concentra mais nos alcalóides, mas numa nova classe de compostos extremamente bioativos que são referidos como Acetogeninas anonáceas (RUPPRETCH *et al.*, 1990; FANG *et al.*, 1993).

As acetogeninas são metabólitos secundários obtidos pela via do ácido acético, derivados de ácidos graxos de cadeia longa exibindo expressiva atividade biológica e tem sido considerado como importantes alternativas para o desenvolvimento de drogas antitumorais. Bioquimicamente, as acetogeninas são um grupo de metabólitos secundários constituído por uma longa cadeia hidrocarbônica, geralmente, C<sub>35</sub>-C<sub>37</sub>, sustentando um anel terminal  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturado, às vezes rearranjado à cetolactona, comum a três anéis tetrahydrofuranos localizados ao longo da cadeia hidrocarbônica, onde podem ser encontradas também funções oxigenadas (hidroxilas, acetoxilas, cetonas, epóxidos, tetrahydrofuranos e tetrahydropiranos), podendo estar presentes ligações duplas e triplas (ALALI *et al.*, 1998; BERMEJO *et al.*, 2005; LEITE, 2009).

A primeira acetogenina isolada foi a uvaricina, em 1982, com propriedades antitumorais. A partir de então, o interesse por essas substâncias vem crescendo, principalmente pela variada ação biológica que apresentam e por serem candidatas promissoras para um futuro de geração de drogas contra tumores quimioterápicos-resistentes (JOLAD *et al.*, 1982; WRIGHT, 2005).

Já foram descritas mais de 400 acetogeninas, isoladas de sementes, frutos, caules e folhas da planta e muitas delas com suas estruturas químicas estabelecidas (ARROYO *et al.*, 2005; GLEYE *et al.*, 1998; ESPOSTI *et al.*, 1994; HOPP *et al.*, 1996; LANDOLT *et al.*, 1995; OBERLIES *et al.*, 1997; ALALI *et al.*, 1999; GLEYE *et al.*, 2000; CHANG; WU, 2001; GONZÁLES-COLOMA *et al.*, 2002; LIAW *et al.*, 2002; CHIU *et al.*, 2003; BERMEJO *et al.*, 2005; CHIH *et al.*, 2001; LIAW *et al.*, 2005;

SANTOS *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2008; KOJIMA; TANAKA, 2009). Alguns exemplos de acetogeninas são: Annocatalina; annohexocina, annomonicina, annomontacina; annomuricata A e B; annomuricinas A, B, C, D, E, F, annomutacina, anonacina (múltiplos iso, cis, um, etc.), annonacinona, annopentocina, cohibina A, B, C e D; corepoxilona; coronina; corrossolina; corrossolona; donhexocina; epomuricenina A e B; epomuricenina; gigantetrocina A e B; gigantetrocinona (cis, trans); goniotalamicina; javoricina; montanacina, montecristina; muracina A, B, C, D, E, F, G; muricapentocina; muricatalicina; muricatenol, muricatetrocina A e B; muricata D; muricatocina A, B e C; muricina H e I; muricoreacina; murihexocina 3; murihexocina A, B e C; murihexol; murina; murisolina; reticulatacina; robustocina; rolina; rolliniastatina 1 e 2; sabadelina; solamina; uvariamicina I e IV; xylomaticina (RIESER *et al.* 1991; RIESER *et al.* 1993; WU *et al.* 1995a; WU *et al.* 1995b; WU *et al.* 1995c; WU *et al.* 1995d; ZENG *et al.*, 1996a; ZENG *et al.*, 1996b; RIESER *et al.* 1996; GLEYE *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1998a; KIM *et al.*, 1998b; FERAS *et al.*, 1999; ALALI *et al.*, 1999; LIAW *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2002). (Figura 12)

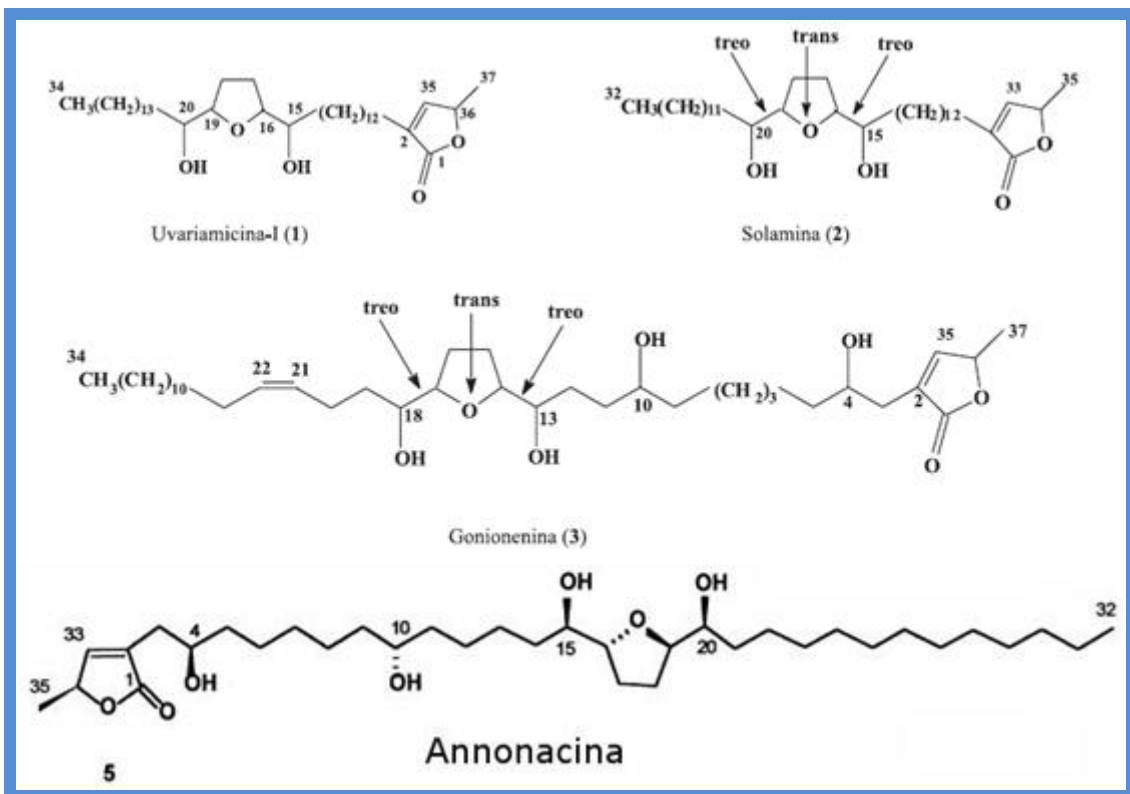
As acetogeninas são classificadas de acordo com as quantidades de anéis tetraidrofurânicos (THF) e de subunidades de  $\gamma$ -lactonas. Elas podem ser mono-THF, bis-THF adjacentes, bis-THF não adjacentes, as que não possuem anéis THF e as não clássicas, acetogeninas que possuem anel tetrahidropirânico. Nas estruturas das acetogeninas podem variar o padrão do anel lactônico. Eles são classificados em  $\gamma$ -lactonas substituídas, cetolactonas (*cis* ou *trans*) ou anel hidroxilado (RUPPRECHT *et al.*, 1990).

Algumas avaliações de citotoxicidade com relação à estrutura-atividades (SAR) biológicas já foram estudadas para as acetogeninas anonáceas (RUPPRECHT *et al.*, 1990; FANG *et al.*, 1993). Estes estudos mostraram que:

- ✓ 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.
- ✓ As unidades hidroxila são extremamente importantes para a bioatividade destes compostos. A acetilação ou a preparação de outros derivados destes

grupos reduzem a atividade citotóxica. Redução das carbonilas cetônicas da esquamona resulta em um aumento substancial da citotoxicidade.

- ✓ A subunidade  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturadas é essencial para a atividade citotóxica. Redução de ligação dupla diminui a atividade.
- ✓ A estereoquímica da molécula é fundamental para a relação estrutura-atividades. A mudança na estereoquímica de um centro assimétrico pode resultar em aumento na atividade citotóxica. A asimicina é um bilhão de vezes menos ativa que a bulatacina, devido a sua estereoquímica.
- ✓ A presença de dióis vicinais e dupla ligação ao longo da cadeia também aumentam a atividade.



**Figura 12** - Acetogeninas isoladas da família Annonaceae

As acetogeninas são conhecidas por serem compostos com potente citotoxicidade. Foi demonstrado que o mecanismo de ação das acetogeninas está relacionado com a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH): ubiquinonaredutase no complexo I, que é a proteína ligada à membrana do sistema

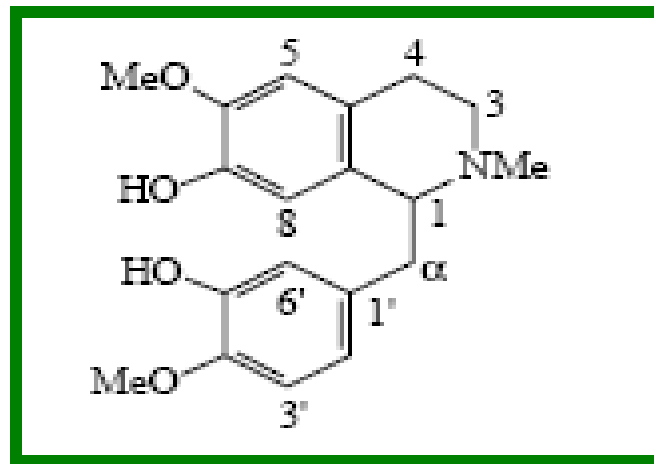
de transporte de elétrons mitocondrial e à NADH oxidase ligada à ubiquinona nas membranas plasmáticas das células cancerosas (ALALI *et al.*, 1999).

Acetogeninas anonáceas são agora consideradas as mais potentes e eficazes em concentrações nanomolares dentre os diversos inibidores do complexo mitocondrial I. Por enquanto, ainda não há trabalhos demonstrando os mecanismos moleculares destes compostos, porém Shimada *et al.* (1998a; 1998b) e Miyoshi *et al.* (1998) usaram membranas lipossomais e partículas vesiculares submitocondriais, respectivamente. Estes experimentos poderiam explicar e verificar se os perfis das relações estruturas-atividades estão corretos, ou mudar drasticamente o entendimento da significância da estereoquímica relativa e absoluta dos sistemas de anéis tetrahydrofuranos ou tetrahidropiranos. Shimada *et al.* encontraram que as acetogeninas, contendo moléculas com anéis tanto mono-adjacente, bis-adjacente ou bis-THF não-adjacente, tiveram seus anéis THF residentes nas regiões interfaciais das membranas lipídicas. Foi concluído que os grupos THF servem como âncoras hidrofílicas nas membranas lipídicas. Foi encontrado também que a posição do anel THF de ancoragem ao longo da cadeia da acetogenina determina a profundidade de penetração do grupo funcional lactona na bicamada lipídica. Desta forma, o anel de lactona, amarrado a porções espaçadoras de diferentes comprimentos, penetra no bicamada lipídica a diferentes profundidades, agindo diretamente nos sítios das proteínas receptoras, e adaptando-se à geometria de tipos de células específicos. Esta seria a explicação para a seletividade de tipos celulares observados nestes compostos (ALALI *et al.*, 1999).

## 1.5 Alcalóides

Vários alcalóides foram identificados na *Annona muricata* L., entre os quais se destacam: annonina, anomuricina, anomurina, asimilobina, anomonicina, anonina, aterospermina, aterosperminina, coclaurina, coreximina, estefarina, muricina, muricinina, nornuciferina, reticulina (alcalóide principal), tiramina, tetrahydrobenzilisoquinolinas (LEBOEUF *et al.*, 1981; HASRAT *et al.*, 1997; KOTAKE *et al.*, 2004).

A reticulina ( $C_{19}H_{23}NO_4$ ) é um alcalóide benzilisoquinólico (**Figura 13**) sendo conhecida como precursor comum na rota biossintética da morfina e papaverina, e estruturalmente relacionado à papaverina, agente espasmolítico (MARTIN *et al.*, 1993). Além disso, é descrito que a reticulina apresenta efeito vasorelaxante por inibir o influxo de cálcio através dos canais cálcio dependente de voltagem; apresenta efeito no sistema dopaminérgico central, e ação bloqueadora neuromuscular (WATANABE *et al.*, 1981; MARTIN *et al.*, 1993).



**Figura 13.** Alcalóide reticulina isolado da família Annonaceae.

## 1.6 Outros Constituintes

Ácidos cítrico, oxálico, cafeico, cumárico, esteárico, linoléico, málico,  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e ácido oléico; anonol, campesterol, citrulina, dextrose, etanol, fitosteróis ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol), frutose, ipuranol, manganês, leucoantocianinas, sacarose, taninos (PAULL *et al.*, 1983; MOSCA, *et al.*, 1997; MOSCA, *et al.*, 2006).

## 1.7 Uso na Medicina Tradicional

A Graviola tem uma longa e rica história de uso como medicamento tradicional pelos ameríndios centro e sul-americanos, muito antes da descoberta da América. Praticamente todas as partes da planta (casca, folhas, raízes, flores, fruta e sementes) são utilizadas para o tratamento de vários tipos de doenças, em diversas

partes do mundo, principalmente em países tropicais. Segundo a medicina popular, todas as partes da árvore da graviola são utilizadas na medicina natural, ou seja, a casca, raízes, folhas, flores e as sementes do fruto, com propriedades diferentes às diversas partes dela. Geralmente o fruto ou seu suco é tomado contra vermes e parasitas. As sementes esmagadas são usadas como vermífugos anti-helmínticos. As cascas e as raízes são consideradas sedativas, antiespasmódicos, hipotensivos, antitumorais e para os nervos. As raízes, as cascas e as folhas são utilizadas para diabetes, como sedativo e antiespasmódico. O chá da folha é para problemas do fígado e no combate ao catarro e o óleo que sai do fruto é misturado com óleo de azeitona para combater a nevralgia, reumatismo e artrites (LE COINTE, 1947; FENG, 1962; MORTON, 1968; MISAS, 1979; MORTON, 1980; BRANCH; SILVA, 1983; WENIGER *et al.*, 1986; 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). A utilização etnofarmacológica no Brasil e no mundo está relacionada na **Tabela 1**.

### 1.8 Principais Usos da Graviola na Medicina Popular

Câncer; Antimicrobiano de amplo espectro; Antifúngico nas dermatomicoses superficiais; Parasitoses intestinais; Infestações por ectoparasitas; Hipertensão; Hipoglicemiante; Depressão, estresse e distúrbios do sistema nervoso (ALMEIDA, 2005; ALONSO, 1998; ANTOUN *et al.*, 1993; BRANCH; SILVA, 1983; FEO, 1992; MORS *et al.*, 2000).

**Tabela 1.** Utilização Etnofarmacológica da Graviola no Brasil e no Mundo. *Fonte: Adaptado de The Healing Power of Rainforest Herbs by Leslie Taylor, 2005.*

PAÍS	USO ETNOFARMACOLÓGICO
Brasil	Analgésico, Anti-helmíntico, Antiespasmódico, Adstringente, Broncodilatador, Calmante, Antitussígeno, Hipoglicemiante, Antidiarréico, Antiinflamatório, Emético, Antitérmico, Antiespasmódico, Hepatoprotetor, Antinevrálgico, Antiparasitário e Antireumático.

<b>Caribe</b>	Antiespasmódico, Antitérmico, Antigripal, Digestivo, Ansiolítico, Sedativo, Ectoparasiticida, Antiasmático, Antidiarréico, Anti-Hipertensivo, Galactagogo, Vermífugo e no tratamento do Escorbuto.
<b>Curaçao</b>	Colerético, Ansiolítico e Sedativo.
<b>Haiti</b>	Estimulante, Cicatrizante, Antitussígeno, Antidiarréico, Emético, Antitérmico, Antigripal, Galactagogo, Ansiolítico, Vermífugo, Pediculicida, Sedativo, Antiespasmódico, Gastroprotetor, Digestivo e no tratamento da Pelagra.
<b>Jamaica</b>	Antiespasmódico, Estimulante, Broncodilatador, Diurético, Antitérmico, Cardiotônico, Anti-hipertensivo, Galactagogo, Calmante, Parasiticida, Sedativo e Vermífugo.
<b>Malásia</b>	Adstringente, furúnculo, Antitussígeno, Antidiarréico, Antifúngico, Anti-hipertensivo, Antireumático, Hemostático.
<b>México</b>	Adstringente, Antidiarréico, Antitérmico, Expectorante, Antifúngico nas Dermatomicoses e Antiescorbúico.
<b>Panamá</b>	Anti-helmíntico, Antidiarréico, Antiácido, Diurético, Pesticida, Gastroprotetor e Vermífugo.
<b>Peru</b>	Parasiticida, Antiespasmódico, Antiinflamatório, Hipoglicemiante, Antidiarréico, Antitérmico, Anti-hipertensivo, Digestivo, Inseticida, Ectoparasiticida, Gastroprotetor e Sedativo.
<b>Trinidad</b>	Depurativo, Estimulante, Antigripal, Galactagogo, Anti-Hipertensivo e Ansiolítico.
<b>Outros</b>	Analgésico, Antiinflamatório, Antiasmático, Adstringente, Anticâncer, Antidepressivo, Colerético, Antidiarréico, Antitérmico, Cardiotônico, Inseticida, Diurético, Galactagogo, Hepatoprotetor, Antimalárico, Expectorante, Pediculicida, Pesticida, Ectoparasiticida, Antifúngico nas Dermatomicoses, Antiescorbúico, Sedativo, Digestivo, Gastroprotetor e Tranqüilizante.

## 1.9 Propriedades Farmacológicas

- ✓ **ANTIBACTERIANA:** extratos metanólico, hexânico e de acetato de etila obtido do caule, casca e sementes apresentam efeito bactericida em *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* e *S. albus* (VIEIRA *et al.*, 2010).
- ✓ **ANTIMALÁRICA:** o extrato de folha tem mostrado atividade antimalárica, *in vitro*, contra *Plasmodium falciparum* (GBEASSOR *et al.*, 1990; ANTOUN *et al.*, 1993).
- ✓ **ANTIVIRAL:** o extrato aquoso de caule tem efeito antiproliferativo sobre células infectadas, *in vitro*, com HIV, o extrato etanólico de casca tem efeito sobre o vírus da herpes simplex 1, enquanto que o extrato da raiz apresenta atividade contra o tipo simplex 2 *in vitro* (PADMA *et al.*, 2001).
- ✓ **CICATRIZANTE:** as folhas contêm ácido aminobutírico e a poupa é rica em ácido málico. O ácido málico é um ácido carboxílico encontrado naturalmente em frutas como a maçã e pêra que apresenta atividade anti-séptica e também é empregado na regeneração de ferimentos e queimaduras (ALONSO, 1998).
- ✓ **FUNGICIDA:** o chá das folhas apresenta atividade contra *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagraphytes* e *Trichophyton rubrum* (HEINRICH *et al.*, 1992).
- ✓ **MOLUSCICIDA:** extratos etanólico de caule, casca e folhas têm ação contra *Biomphalaria glabrata*, o caramujo responsável pela transmissão da esquistossomose (SANTOS *et al.*, 2001; LUNA *et al.*, 2006).
- ✓ **PARASITICIDA:** os extratos metanólico, hexano, acetato de etila de sementes, caules e casca apresentam atividade biocida contra *Entamoeba histolytic* (diarréia), *Nippostrongylus brasiliensis*, *Molinema dessetae*, *Leishmania trypanosoma*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania promastigotes* (BORIES *et al.*, 1991; HEINRICH *et al.*, 1992; ALALI *et al.*, 1998; JARAMILLO *et al.*, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2006).
- ✓ **SISTEMA NERVOSO CENTRAL:** alguns alcalóides apresentam efeito modulador do SNC. A reticulina é um estimulador do SNC, enquanto a estafarina e a aterospermina atuam como sedativo. 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. O mecanismo de ação desses alcalóides parece estar associado aos receptores para a hidroxitriptamina. O extrato dos frutos apresenta efeito neutralizador de estresse cerebral indicando ter um potencial adaptógeno (HASRAT *et al.*, 1997; N'GOUEMO *et al.*, 1997).

- ✓ **CITOTÓXICA (*in vitro*):** as acetogeninas apresentam efeito citotóxico sobre algumas linhagens de células tumorais como adenocarcinoma prostático; carcinoma pancreático (PACA-2), leucemia murina L1210 e P388, adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231 e MCF-7) e células tumorais de pulmão (A-549). Estas substâncias apresentam alta seletividade citotóxica e o mecanismo de ação está associado à inibição da NADH oxidase da membrana plasmática da célula tumoral. Esse mecanismo ocorre através da inibição do complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase) no sistema de transporte eletrônico mitocondrial, inibindo a fosforilação oxidativa, resultando na diminuição dos níveis de ATP celular e inibindo o desenvolvimento de células tumorais. A inibição da enzima NADH oxidase nas membranas plasmáticas das células neoplásicas, resulta também na diminuição da busca de ATP celular. As acetogeninas são descritas como um dos mais potentes inibidores do transporte de elétrons em mamíferos. Através dos mecanismos de ação supracitados, as acetogeninas diminuem a fosforilação oxidativa e a produção citosólica de ATP, cuja privação induz as células tumorais a apoptose (LIAW *et al.*, 2002; LOPEZ, 1979; OBERLIES *et al.*, 1995; OBERLIES *et al.*, 1997; TORMO *et al.*, 2003; KOJIMA *et al.*, 2004).
- ✓ Além disso, as células neoplásicas na fase S do ciclo celular são mais vulneráveis à ação das acetogeninas. A anonacina 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 (YUAN *et al.*, 2003).
- ✓ **ADJUVANTE NA QUIMIOTERAPIA:** trabalhos experimentais *in vitro* com células neoplásicas demonstraram a inibição do mecanismo de resistência a múltiplas drogas que ocorre em pacientes submetidos à quimioterapia do câncer. O mecanismo dessa resistência ocorre em função da Glicoproteína-P que atua como uma bomba retirando a molécula do quimioterápico do interior da célula mesmo antes da sua ação. Como esse mecanismo é ATP dependente, a redução do ATP provocada pelas acetogeninas pode contribuir

para reduzir ou mesmo suprimir a atividade da Glicoproteína-P e, dessa forma, auxiliar na quimioterapia do câncer (NICOLAS *et al.*, 1997; OBERLIES *et al.*, 1997).

- ✓ **OUTRAS ATIVIDADES:** o extrato aquoso e o etanólico de folhas e cascas apresentaram atividades hipoglicemiante, relaxante muscular e antiespasmódica (ADEWOLE & OJEWOLE, 2009; FEO, 1992; LUNA, 2009).

### 1.10 Justificativa do trabalho

Com intuito de esclarecer os efeitos farmacológicos da planta e sugerir-la como possível fitoterápico, realizamos o teste de citotoxicidade e determinação da redução do crescimento tumoral pela determinação da dose letal para 50% dos animais ( $DL_{50}$ ), do extrato acetônico das sementes bruto por via oral em camundongos, uma vez que esse conhecimento é exigido pela ANVISA para que o produto seja registrado como fitomedicamento. A ausência de dados toxicológicos e o uso popular generalizado do chá de graviola foram os fatos principais que motivaram a execução deste trabalho.

# **Objetivos**

## 2 Objetivo

### 2.1 Objetivo Geral

- Avaliar atividade citotóxica e o potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L, em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L.(AMSAF2) em células tumorais de diferentes linhagens (ensaio do MTT e Alamar blue);
- Avaliar a atividade hemolítica do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L.(AMSAF2) em eritrócitos de camundongos;
- Determinar a DL<sub>50</sub> do extrato acetônico das sementes *Annona muricata* L.
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L.(AMSAF2) em camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180;
- Analisar as características histopatológicas dos órgãos (rim, fígado, estômago e baço) de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180, tratados por 7 dias com o extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L.(AMSAF2);
- Analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180, tratados por 7 dias com extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L.(AMSAF2).

***Materiais e***

***Métodos***

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais

##### Equipamentos

- ✓ Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2<sup>®</sup>.
- ✓ Agitador de tubo, Donner AD 8850<sup>®</sup>.
- ✓ Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di<sup>®</sup>.
- ✓ Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212<sup>®</sup>.
- ✓ Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206<sup>®</sup>.
- ✓ Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403<sup>®</sup>.
- ✓ Deionizador de água Milli-Q, Milipore<sup>®</sup>.
- ✓ Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter<sup>®</sup>.
- ✓ Incubadora de células, (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator) NUAIRETS Autoflow<sup>®</sup>.
- ✓ Fluxo laminar, VECO<sup>®</sup>.
- ✓ High Throughput Screening (HTS)/ Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter<sup>®</sup>.
- ✓ Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070<sup>®</sup>.
- ✓ Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/ PZO-Labimex Modelo Studar lab<sup>®</sup>.
- ✓ Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot<sup>®</sup>.
- ✓ Micrótopo, Slee Mainz<sup>®</sup>.
- ✓ PHmetro, Micronal B474<sup>®</sup>.
- ✓ Pipetas automáticas, Gilson<sup>®</sup>.

##### Soluções

- ✓ Azul de Tripan 10%
  - 10 mg de azul de tripan (Vetec<sup>®</sup>)
  - PBS q.s.p. 100 mL de solução
  
- ✓ Formaldeído 10%

- 100 mL de formaldeído (Dinâmica<sup>®</sup>)
- Água deionizada q.s.p. 1L
- ✓ Hematoxilina 0,1%
  - 0,5 g de hematoxilina (Doles<sup>®</sup>)
  - 10 mL de Glicerina (Labsynth<sup>®</sup>)
  - 25 g de sulfato de alumínio (Labsynth<sup>®</sup>)
  - 0,1 g de iodeto de potássio (Labsynth<sup>®</sup>)
  - Água destilada q.s.p. 500 mL solução
- ✓ MTT
  - 20 mg de MTT (Sigma<sup>®</sup>)
  - PBS q.s.p. 100 mL solução
- ✓ Solução fisiológica Ringer-lactato (Laboratórios Biosintética<sup>®</sup>)
- ✓ Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab<sup>®</sup>)
- ✓ Solução salina
  - 8,5 g Cloreto de sódio (0,85%) (Labsynth<sup>®</sup>)
  - 1,11 g Cloreto de Cálcio (10 mM) (Reagen<sup>®</sup>)
  - Água destilada q.s.p. 1L solução
- ✓ Tripsina 0,25%
  - 50 mL de tripsina 2,5% (Cultilab<sup>®</sup>)
  - 0,125 g EDTA (Proquímios<sup>®</sup>)
  - 450 mL PBS
- ✓ Xilol 10%
  - 100 mL formaldeído
  - Água destilada q.s.p. 1L

## Reagentes e Fármacos

- ✓ Álcool etílico (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Corante de Leishman (Cinética<sup>®</sup>)
- ✓ Cloreto de sódio (Labsynth<sup>®</sup>)
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO) (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Doxorrubicina (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Estreptomicina 10 mg/mL (Cultilab<sup>®</sup>)

- ✓ Ficoll (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Fitohemaglutinina (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Meio de cultura de células RPMI 1640 (Cultilab<sup>®</sup>)
- ✓ Penicilina-estreptomicina (Cultilab<sup>®</sup>)
- ✓ Penicilina 10.000 U.I./mL (Cultilab<sup>®</sup>)
- ✓ Resazurina (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Triton X-100 (Isifar<sup>®</sup>)
- ✓ 5-Fluorouracil, 25mg/Kg (ICN FARMACÊUTICA)

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Material vegetal, extração e isolamento da AMFA-2**

O procedimento de isolamento da substância foi realizado na Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) da Universidade Federal do Ceará.

### **3.2.2 Material vegetal**

As sementes de *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) selecionadas para este estudo foram coletadas na fazenda Iolla no município de Trairí – CE. Encontrase depositada no herbário Prisco Bezerra, sob número 49002, da Universidade Federal do Ceará. Foi coletada por OLIVEIRA, B. R. C. em 29/04/2011, no município de Trairí (estado do Ceará) cuja latitude é 3°22'15,98"S e longitude de 39°17'34,46"W. O rendimento do extrato acetônico bruto foi de 17,4%.

### **3.2.3 Obtenção do extrato acetônico das sementes de *A. muricata* (AMSA).**

Após a coleta 2,80 Kg das sementes de *Annona muricata*, depois de secas e moídas, foram submetidas à extração com acetona a frio por 72 horas. O extrato foi concentrado por meio de destilação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo, obteve-se um extrato viscoso e de coloração amarela. O processo descrito anteriormente foi repetido por mais duas vezes, sendo o tempo de

extração das sementes, neste segundo momento, por apenas de 24 horas. 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 (**Figura 14.a**). A fase mais densa de cor amarelo claro, viscosidade baixa e menor volume foi denominada de *Annona muricata* sementes acetônico Fase 1 - AMSAF1. A fase intermediária de cor marrom e viscosidade elevada denominada AMSAF2. O sobrenadante e majoritário de coloração amarelo- avermelhado denominada AMSAF3. (**Figura 14.b**).

**OBS.** Inicialmente, achou-se que separação de fases poderia tratar-se de água resultante do processo de extração o que teria ocasionado à emulsificação do mesmo. O extrato AMSA foi dissolvido novamente em acetona e tratado com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para remoção da água. O material foi concentrado novamente, não havendo mudanças significativas. Por entender que no material há uma grande possibilidade de haver metabólitos secundários diferentes em cada fase optou-se por separá-las em frações diferentes designadas como segue:

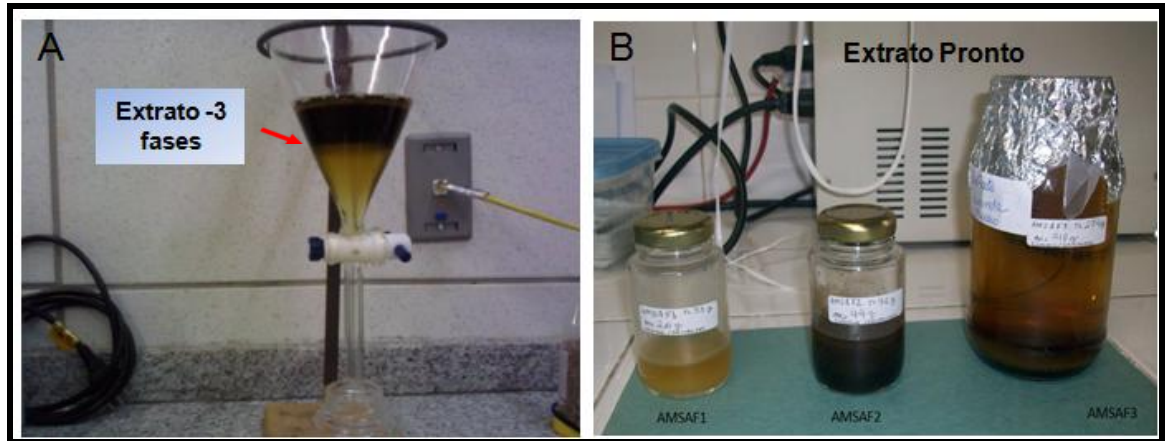
AMSAF1 – É a fase mais densa. De cor amarelo claro e de viscosidade baixa. É a fração com menor volume (m = 26 g).

AMSAF2 – É a fase intermediária. De cor marrom e viscosidade elevada (m = 44 g).

AMSAF3 – É a fase menos densa. De cor amarelo avermelhado de viscosidade baixa. É a fração com maior volume (m = 418 g).

Rendimento 17,4%.

**Figura 14 a, b** – Extrato acetônico da *Annona muricata L.* Fonte. UNIFAC



### 3.3 Modelos Biológicos

#### 3.3.1 Linhagens celulares

As células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade estão listadas quanto ao tipo histológico e a origem na **Tabela 2**.

**Tabela 2** - Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade. Fonte. LabNOE -UFC

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Origem	Concentração de plaqueamento
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	$0,3 \times 10^6$
SF- 295	Glioblastoma	Humana	$0,1 \times 10^6$
HCT- 116	Carcinoma de cólon	Humana	$0,7 \times 10^5$
OVCAR-8	Ovário	Humana	$0,1 \times 10^6$

### 3.3.1.1 Obtenção e cultivo das células tumorais

A linhagem tumoral foi gentilmente cedida pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL) em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, tendo sido observado o crescimento celular com ajuda do microscópio de inversão a cada 24 horas.

## 3.4 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas - Teste do MTT(3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-YL)-2,5 DIFENILTERTRAZOLIM BROMETO)

### 3.4.1 Princípio do teste

A avaliação do efeito citotóxico dos compostos testes em células tumorais humanas foi realizada pelo Teste do MTT após 24 h de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosmann em 1983 para estimar a proliferação e a sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade (PESSOA *et al.*, 2000; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2008) e baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

### 3.4.2 Procedimento experimental

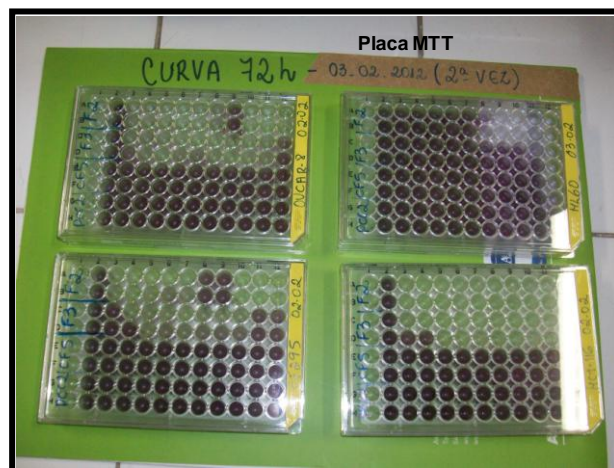
O extrato AMSAF2 foi testado nas linhagens celulares descritas na tabela 04 para a determinação de suas CI<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular), como descrito a seguir.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, para células de HL-60,  $0,1 \times 10^6$  células/mL, para SF-295 e OVCAR-8 e  $0,7 \times 10^5$  células/mL, para HCT-116.

Para as células tumorais de HL-60, o extrato AMSAF2 é adicionado logo após o plaqueamento; já para SF-295, OVCAR-8 e HCT-116 o extrato é adicionado somente após 24 h de incubação. O extrato foi pesado e dissolvido em DMSO puro estéril ficando na concentração de 5 µg/mL foi adicionados a cada poço, utilizando o HTS (*high-throughput screening*), e as placas incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 0,25 µg/mL. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO (0,4%).

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio RPMI 1640) e a placa foi re-incubada por 3 horas, em estufa a 37 °C e a 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspenso em 150 µL de DMSO (**Figura 15**). Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm (MOSMANN *et al.*,1983)

**Figura 15-** Placa de 96 poços com DMSO. *Fonte.* LabNOE –UFC



### 3.4.3 Análise dos dados

O composto foi testado em diluição seriada, em triplicata. Foi registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinadas suas  $CI_{50}$  (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando, o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

### 3.5 Atividade Citotóxica em Linfócitos-Teste Alamar blue

A atividade citotóxica do extrato AMSAF2 frente a linfócitos de camundongos *Swiss* foi determinada através do método do Alamar Blue. A técnica do Alamar blue faz uso de um indicador de óxido-redução (redox), o Alamar Blue ou resazurina (azul e não fluorescente) que é reduzido por células viáveis a resorufina (róseo e altamente fluorescente) (ZHI-JUN *et al.*, 1997) (**Figura 16**). No ensaio do Alamar blue é quantificado apenas a redução da resazurina a resorufina. O Alamar blue é um indicador sensível da função mitocondrial (SPRINGER *et al.*, 1998).

Para tanto, os linfócitos foram incubados em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de  $CO_2$  durante 48 h antes da adição do extrato AMSAF2 nas concentrações finais de 0,039-5 µg/ml. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de  $CO_2$  a 37°C. Ao término deste, foram adicionados 10 µl de solução estoque (0,312 mg/ml) de Alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich Co) em todos os poços e incubados por 4 horas em estufa a 5% de  $CO_2$  a 37°C. Em seguida, a absorbância foi determinada nos comprimentos de onda de 570nm (estado oxidado) e 595nm (estado reduzido), utilizando um leitor multiplaca (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter). A porcentagem de Alamar blue reduzido foi calculada segundo a fórmula: % reduzido =  $A_{LW} - (A_{HW} \times R_O) \times 100$ , onde:

$A_{LW}$  = representa a leitura do estado oxidado.

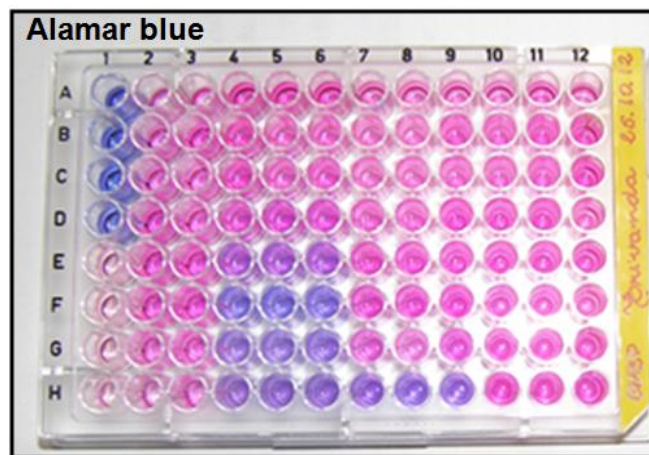
$A_{HW}$  = representa a leitura do estado reduzido

$R_O$  = representa a divisão  $AO_{LW} / AO_{HW}$ .

$AO_{LW}$  = representa a absorbância do meio sozinho subtraído da absorbância do meio com Alamar blue em baixo comprimento de onda.

$AO_{HW}$  = representa a absorbância do meio sozinho subtraído da absorbância do meio com Alamar blue em alto comprimento de onda.

**Figura 16-** Placa com Alamar blue. *Fonte.* LabNOE -UFC



### 3.5.1 Análise dos dados

O extrato AMSAF2 foi testado em diluição seriada, em triplicata. Sua  $CI_{50}$  e seu intervalo de confiança foi calculado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software)

## 3.6 Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

### 3.6.1 Obtenção e manutenção dos animais

#### Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* albino (*Mus musculus*) oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Estes foram alojados dentro de gaiolas de polipropileno e grades metálicas apropriadas em pequenos grupos do

mesmo sexo (não excedendo 10 animais por gaiola). A temperatura do local foi de  $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ . A iluminação foi artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os animais tiveram livre acesso à alimentação (ração específica) e água (**Figura 17**).

Foram utilizados animais machos adultos, jovens, saudáveis e que não tenham sido anteriormente submetidos a processos experimentais. O número de animais utilizados foi reduzido ao mínimo cientificamente aceitável. No início do estudo, a variação de massa dos animais foi à mínima possível, não excedendo  $\pm 25\%$  da massa média de cada grupo.

Os animais foram identificados de forma inequívoca, e foram aclimatados às condições do biotério durante pelo menos cinco dias. A dor e o sofrimento dos animais no decurso dos ensaios foram minimizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará.

**Figura 17.** Animais em manutenção. *Fonte.* LabNOE -UFC



### 3.7 Determinação da Atividade Hemolítica em Eritrócitos de Camundongos

Esta metodologia, segundo Costa-Lotufo *et al.* (2002), permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

#### 3.7.1 Procedimento experimental

O sangue foi coletado de três camundongos Swiss (*Mus musculus*) por via orbital (**Figura 18**) sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl<sub>2</sub> 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2 %. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10 %. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL da substância teste. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 1 % (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 1,56 a 200 µg/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2 °C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/3 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm.

**Figura 18-** Coleta de sangue em camundongos *Swiss*. Fonte. LabNOE -UFC



### 3.7.2 Análise dos resultados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 2 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3.8 Manutenção do tumor Sarcoma 180 em camundongos

O animal de manutenção ou doador foi anestesiado com éter etílico e sacrificado por meio de deslocamento cervical. Fez-se o procedimento asséptico com álcool iodado e, em seguida, coletou-se o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem das células. Os animais receptores foram inoculados com  $2 \times 10^6$  células/0,5 mL na região intraperitoneal. O procedimento é realizado a cada 10 dias.

### **3.9 Investigação da Toxicidade Oral Aguda do Extrato Acetônico das Sementes de *A. muricata* (AMSAF2) Pelo Método Up-and-Down**

Para a realização do teste de toxicidade oral agudo conhecido como *up-and-down* (OECD 425) foram utilizados camundongos (n=6), pesando entre 25-35 g.

Os animais foram mantidos em jejum alimentar por 2 horas antes da administração do extrato acetônico. O extrato acetônico foi diluído em Tween 80 (surfactante), uma vez que não é solúvel por si só em meio aquoso, obtendo-se uma suspensão bem homogênea. O percentual de Tween 80 será 1% para a preparação das doses de 175 mg/kg e 550 mg/kg.

Foi utilizado um programa estatístico preconizado pela OECD 425 (AOT425StatPgm) que indica qual a dose deve ser administrada no animal seguinte de acordo com desfecho (morte ou sobrevida) do animal anteriormente tratado com a substância em estudo. Após a administração de cada dose, foram observados os efeitos tóxicos que porventura pudessem ser manifestados devido à ingestão do AMSAF2 tais como alterações de pêlo, pele e mucosas, comportamento, taquicardia, ptose, convulsões, diarreia, letargia e coma serão observados por 15, 30 e 60 minutos bem como 24 horas após o tratamento. Todos os animais ainda foram observados diariamente, durante um período de 14 dias após a primeira administração, sendo posteriormente sacrificados para a retirada dos órgãos (fígado, pulmão, cérebro, estômago, baço, rim e coração) e análise histológica dos mesmos. No teste de toxicidade aguda no extrato de *Annona muricata* L apresentou valor para a dose letal média (DL<sub>50</sub>) de 310,2 mg/Kg. Com o intervalo de confiança de 175 a 550 mg/Kg.

#### **3.9.1 Análise Estatística**

Para análise dos dados obtidos após 24 horas e 14 dias da administração do extrato, os mesmos foram plotados no programa AOT425StatPgm. O intervalo de confiança aceito foi de 95%.

### 3.10 Determinação da atividade antitumoral *in vivo* do extrato acetônico (AMSAF2) em camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180.

A avaliação da atividade antitumoral está relacionada à regressão total de tumores nos animais, à redução no crescimento dos tumores e ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os animais não tratados. SCHABEL et al., 1977 demonstraram que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral. O tumor utilizado foi o Sarcoma 180, o qual foi descoberto em 1914 no 'Crocker Laboratory (Columbia University, New York), sendo originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos. Inicialmente o tumor foi classificado como um carcinoma mamário, mas por volta de 1919, após a realização de vários transplantes subcutâneos, o tumor assumiu a forma de sarcoma, e desde então mantém-se inalterado.

#### 3.10.1 Procedimento Experimental

Para a avaliação do efeito antitumoral do extrato AMSAF2 foram utilizados camundongos (*Mus musculus* Swiss) machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). Esses animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n = 10 para cada grupo) com pesos variando entre 30 e 40 g ( $p > 0,05$ ).

O modelo tumoral - tumor sólido do tipo Sarcoma 180 - foi utilizado com 10 dias de implantação na região axilar direita. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizada assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal e preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas  $2 \times 10^6$  céls/0,5 mL na região axilar esquerda dos camundongos (**Figura 19**). Após 24 h de inoculação, o tratamento foi iniciado e realizado durante 7 dias consecutivos, utilizando como controle negativo, o veículo

de diluição (TWEEN 80 1 %) e como controle positivo, o quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia) por via intraperitoneal (i.p.). A AMSAF2 foi testada nas doses de 7,5 ,15 e 30 mg/kg/dia, por via oral, com seu respectivo grupo controle negativo TWEEN 80- 1 % v.o.(**Figura 20**).

Todos os grupos foram mantidos sob as mesmas condições e sob regime de ingestão “*ad libitum*” de ração comercial (Purina, São Paulo) e água clorada durante todo o período do experimento.

No final do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus órgãos (rins, baço, fígado e estômago) e tumores dissecados para avaliação do peso relativo e da atividade antitumoral, respectivamente.

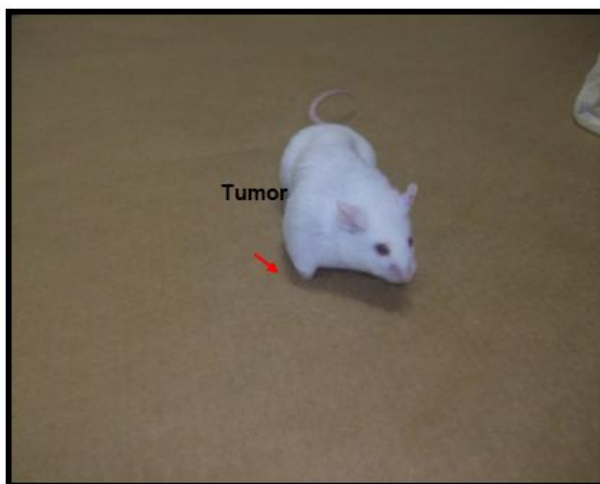
O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde: A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados

**FIGURA 19-** Animal transplantado  
Fonte. LabNOE –UFC



**FIGURA 20-**Animal em tratamento  
Fonte. LabNOE -UFC



### 3.10.2 Análise dos dados

Os resultados (peso relativo dos órgãos e peso dos tumores) foram expressos como média ± E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas

entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **3.11 Observações histopatológicas da atividade antitumoral do extrato AMSAF2 em camundongos transplantados com Sarcoma 180.**

#### **3.11.1 Princípio do teste**

A técnica de coloração hematoxilina e eosina (H/E) permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise morfológica e histopatológica de tecidos dos animais tratadas permitem identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir os efeitos tóxicos causados pela droga.

#### **3.11.2 Procedimento Experimental**

Imediatamente após a dissecação, os órgãos e os tumores foram armazenados em formol 10 % para posterior análise macroscópica em relação à cor, tamanho e presença de focos hemorrágicos. Em seguida, os tecidos foram processados, embebidos em parafina e secções de 3-5  $\mu\text{m}$  de espessura foram preparadas em lâminas. Depois de fixadas em formol 10 %, desparafinizadas em xilol por 15 min e desidratadas em álcool em crescentes concentrações, as lâminas foram lavadas em água destilada, coradas com H/E e examinadas em microscópio óptico (x400).

#### **3.11.3 Análise dos Dados**

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle tratados com Tween 80 1%. O registro das alterações celulares foi feito por fotografia em microscopia óptica.

### **3.12 Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos**

A determinação dos parâmetros hematológicos avalia possíveis mudanças na concentração de leucócitos totais e na contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos). Os testes bioquímicos avaliaram a função renal através dos parâmetros séricos de dois marcadores da integridade renal, a uréia e a creatinina. Para investigação de dano no hepatócito é determinada, no soro dos animais, a atividade da alanina amino transaminase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), enzimas de elevada atividade no hepatócito, sendo importantes marcadores de dano neste órgão.

#### **3.12.1 Procedimento experimental**

O sangue foi coletado do plexo orbital, imediatamente antes do sacrifício dos animais. Em seguida, foram colocados 20 $\mu$ L de sangue em 380 $\mu$ L de solução de Turk para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer em microscópio ótico. Para a contagem diferencial de leucócitos foram feitas lâminas do sangue, que foram submetidas à contagem em microscópio ótico.

Para análise bioquímica foram utilizados kits da LABTEST® sistemas para diagnóstico, seguindo-se o método descrito por este fabricante.

# ***Resultados***

## 4 Resultados

### 4.1 Estudo da Atividade Citotóxica- MTT e Alamar blue

A avaliação da atividade citotóxica do extrato AMSAF2 pelo método do MTT foi avaliada em quatro linhagens de células tumorais. após 72 horas de exposição. A maior concentração testada do extrato foi de 5 µg/mL.

As  $CI_{50}$ , determinadas após 72 h de incubação com o extrato AMSAF2, está representada na **Tabela 3**. Os valores de  $CI_{50}$  variaram de 0,06 a 1,194 µg/mL nas linhagens tumorais. O extrato de AMSAF2 apresenta um elevado potencial citotóxico em todas as linhagens quando comparado com o controle positivo a doxorubicina.

**Tabela 3** – Atividade citotóxica *in vitro* do extrato acetônico AMSA F2 frente às linhagens tumorais humanas de leucemica (HL-60), glioblastoma (SF-295), Ovário (OVCAR-8), colon (HCT-8) e linfócitos.

AMOSTRAS TESTADAS	Linhagens Tumorais			
	HL-60	SF295	OVCAR-8	HCT-116
	$CI_{50}$ - µg/mL (IC 95 %)			
AMSAF2	0,194 0,11 - 0,34	0,060 0,058 - 0,063	0,098 0,055 - 0,176	0,14 0,09 - 0,23
Dox	0,07 0,06 - 0,08	0,03 0,34 - 0,66	0,27 0,19 - 0,25	0,08 0,03 - 0,05

Valores originados de 3 experimentos independentes e apresentados em valores de  $CI_{50}$  obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%. A Dox foi usada como controle positivo.

## 4.2 Estudo da Atividade Citotóxica Alamar blue

A avaliação da atividade citotóxica do AMSAF2 pelo método do Alamar blue foi feito com células de eritrócito de camundongos, após 72 horas de exposição. O valor da  $CI_{50}$  nas células linfocitárias foi de 9,23  $\mu\text{g/mL}$ .

## 4.2 Atividade Hemolítica

Os estudos de atividade hemolítica foram feitos usando suspensão de eritrócitos de camundongos a 2%. O extrato AMSAF2 não foi capaz de lisar células vermelhas até a concentração máxima testada (200  $\mu\text{g/mL}$ ) nos tempos de 1h, 2h e 4h, sugerindo que a atividade citotóxica não seja causada por danos à membrana celular.

## 4.3 Toxicidade Aguda pelo método do Up and Down

O AMSAF2 foi testado seguindo o método Up and Down. Foram utilizados seis camundongos fêmeas para a estimativa da  $DL_{50}$  do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L. em cada ensaio realizado.

O primeiro animal foi tratado com a dose de 175mg/kg, que foi a recomendada pelo programa estatístico. Após 24h da administração, observou-se que o animal sobreviveu. A dose administrada no próximo animal foi 550mg/kg, de acordo com o software utilizado. Entretanto, aproximadamente 3h após a administração, verificou-se a morte do segundo animal. Com esse resultado, a dose subsequente administrada ao terceiro animal foi a de 175mg/kg e após 24h da gavagem houve sobrevida. Seguindo, a sequência de doses estipulada pelo programa estatístico, administrou-se as doses de 550mg/kg, 175mg/kg e 550mg/kg para os animais 4, 5 e 6, respectivamente. Destacando-se que o quarto e o sexto animal morreram antes do período de 24 horas.

Durante o período de experimentação foram realizadas algumas observações no que diz respeito às mudanças de comportamento e alguns sinais indicativos de

toxicidade, sendo a redução do comportamento geral, piloereção e movimentos estereotipados os que mais se destacaram.

É importante ressaltar que após 14 dias da administração do AMSAF2, os animais que sobreviveram não apresentaram mais nenhuma alteração além das já descritas. Durante a retirada dos órgãos foram visualizadas alterações macroscópicas dos animais que sobreviveram, ou seja, aqueles tratados com as doses de 175mg/kg.

Os animais que sobreviveram até o 14<sup>o</sup> dia de experimento foram acompanhados quanto a sua massa corporal, uma vez que esse dado pode ser utilizado com um indicador de toxicidade.

O relatório está apresentado na **Tabela 4** os dados dos experimentos na **Tabela 5** e o resultado estatístico final na **Tabela 6**.

**Tabela 4-** Relatório contendo os dados dos ensaios do teste de toxicidade aguda pelo método Up and Down.

Relatório DL <sub>50</sub> - AMSAF2	
Programa Estatístico	AOT425statpgm (Versão: 1.0)
Resultados dos Testes e recomendações	Toxicidade Oral Aguda (Teste Guia OECD 425)
Data	Sexta, 24 de agosto de 2012, 10:53:23 PM
Dados de preenchimento da amostra	DL <sub>50</sub> AMSAF2.dat
Última modificação	24/08/12 10:53:23 PM
Teste/Substância	AMSAF2 DL <sub>50</sub>
Tipo de teste	teste principal
Dose limite (mg/kg)	2000
DL <sub>50</sub> assumida (mg/kg)	Desconhecida
Valor de sigma assumido sigma (mg/kg)	0,5
Progressão de doses recomendadas	2000, 550, 175, 55, 17.5, 5.5, 1.75
Critério de parada	5 reversões em 6 testes

**Tabela 5-** Dados dos experimentos usando o método Up and Down. Onde (X = morreu, O = Sobreviveu).

Dados dos experimentos					
Ensaio 1	Ensaio 2	Dose Usada (mg/Kg)		Morte/Sobrevivência	
(n° animais)	(n° animais)				
1	1	175		O	O
2	2	550		X	X
3	3	175		O	O
4	4	550		X	X
5	5	175		O	O
6	6	550		X	X

**Tabela 6-** Resultados estatísticos dos ensaios de toxicidade aguda usando o método Up and Down.

Estatística estimada baseada nos resultados	
DL50 estimada	310,2 (Baseada em um sigma assumido de 0,5)
IC 95%	175-550

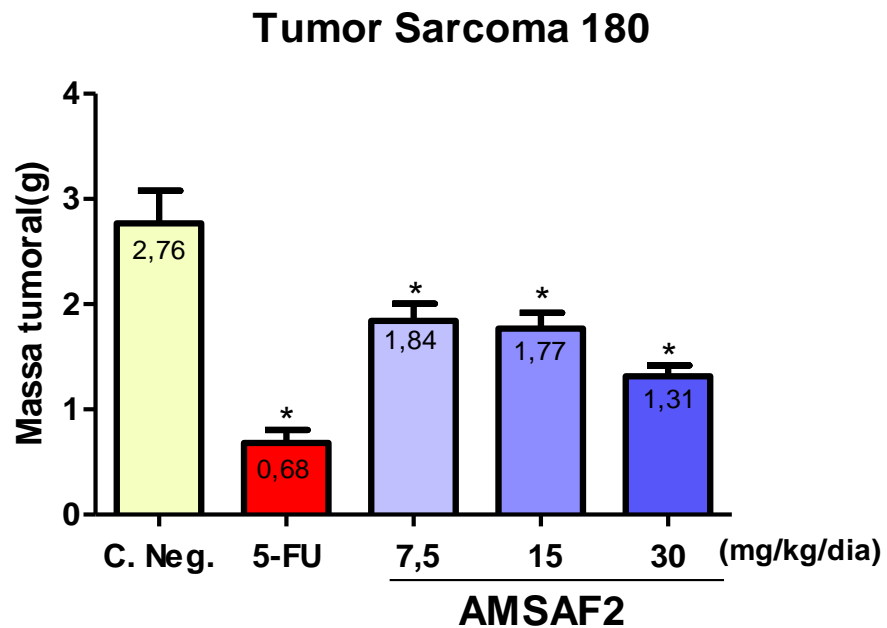
#### 4.4 Avaliação da atividade antitumoral da AMSAF2 em camundongos transplantedados com Sarcoma 180.

A avaliação da atividade antitumoral do extrato AMSAF2 foi realizada em camundongos *Mus musculus* Swiss utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180. O extrato foi administrado nos animais pela via oral nas dosagens (7,5; 15 e 30 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. No 9º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada do tumor, estômago, fígado, baço e rins.

Nas três doses testadas, o extrato acetônico AMSAF2 foi capaz de diminuir significativamente o crescimento da massa tumoral em relação ao controle negativo TWEEN 80 1%. O peso médio dos tumores dos animais tratados com TWEEN 80 1% foi de  $2,767 \pm 0,31$  enquanto que nos animais tratados com 7,5; 15 e 30mg/kg/dia do AMSAF2 por via oral foi de  $1,84 \pm 0,16g$ ,  $1,77 \pm 0,14g$  e  $1,316 \pm 0,10g$  respectivamente (**Gráfico 1**). Dessa maneira foi possível determinar os percentuais de inibição do crescimento tumoral. O AMSAF2 administrado por via oral inibiu em 30,90%, 33,27% e 48,41% o crescimento do tumor nas doses de 7,5; 15 e 30mg/kg/dia, respectivamente. O 5-FU inibiu em 69,55 % do crescimento tumoral.

A avaliação do peso dos animais foi realizado no início do tratamento e no final do tratamento no 9º dia. Não houve diferença significativa do grupo controle para os três grupos tratados. (**Tabela 7**)

**Gráfico 1-** Efeito do AMSA-F2 nas doses de 7,5;15 e 30 mg/Kg/dia v.o. sobre a proliferação tumoral de camundongos (*Mus musculos*) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento.



O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga TWEEN 80( 1%). 5-FU: o 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi utilizado como controle positivo. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais. \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet.

**Tabela 7** – Peso dos animais inicial e final dos animais e do tumor nos dias de tratamento (07 dias).

<b>Tratamento</b>	<b>Dose</b> (mg/kg/dia)	<b>Peso Inicial</b> <b>dos animais</b> (g) 100g de massa corpórea	<b>Peso Final</b> <b>dos animais</b> (g) 100g de massa corpórea	<b>Massa</b> <b>Tumoral</b> g/100g de peso bruto
<b>Controle</b>	-			
TWEEN 80(1%)		33 ± 1,1	42 ± 1,7	2,76 ± 0,3
<b>5-FU</b>	25 i.p.	25 ± 1,2	29 ± 1,3	0,68 ± 0,12
<b>AMSAF2</b>	7,5 v.o.	35 ± 0,0	38,5 ± 1,5	1,84 ± 0,16
	15 v.o.	36 ± 0,6	38 ± 1,5	1,77 ± 0,14
	30 v.o.	39 ± 0,6	41 ± 2,1	1,31 ± 0,10

O quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi utilizado como controle positivo. \*p<0,01. Dados apresentam a média ± E.P.M. a, (p < 0,05) quando comparado com o grupo de animais saudáveis por ANOVA seguido por Newman-Keuls (n = 10).

#### 4.5 Análise macroscópica e histopatológica dos órgãos.

A análise macroscópica mostrou que não havia lesões nos órgãos retirados dos animais de todos os grupos. Os pesos dos órgãos dos animais tratados com o extrato AMSAF2 nas doses de 7,5 mg/Kg, 15mg/Kg e 30mg/Kg não demonstraram diferença significativas quando comparados com os do grupo controle, sendo notável apenas um pequeno aumento no tamanho do estômago (p < 0,05) dos animais tratados na dose de 7,5 mg/Kg, em comparação com o controle negativo (**Tabela 8**).

As análises histopatológicas dos tumores retirados de camundongos tanto do grupo dos animais com o tumor tratados com TWEN 80 (1%), como dos outros grupos tratados com o extrato AMSAF2, mostraram neoplasia maligna mesenquimal composta por células poligonais exibindo anisocariose, pleomorfismo celular e nuclear, figuras mitóticas área de necrose e coagulação (**Figura 21 A, B C e D**).

As análises histopatológicas dos fígados o grupo tratado com a dose de 7,5 mg/Kg/dia v.o. já apresenta algumas alterações morfológicas, além disso no grupo de 15mg/Kg/dia v.o. é visualizada esteatose e necrose focal sugerindo toxicidade hepática. Porém não houve diferença entre as doses de 15 e 30. Apesar da desorganização dos cordões de hepatócitos em nenhum grupo observou-se fibrose intersticial, portanto há possibilidade de regeneração do tecido com a descontinuidade do tratamento ou adequação da dose o extrato AMSAF2 (**Figura 22 A,B C e D**).

Na análise do baço, encontramos as mesmas alterações para todos os grupos. Muita congestão de polpa vermelha e aumento (de forma subjetiva) no número de megacariócitos(**Figura 23 A, B, C,D e E** ).

Os cortes histológicos dos rins mostram arquitetura glomerular preservada para todos os grupos. A dose de 15mg/Kg/dia v.o. mostra alterações morfológicas mais intensas do que o de 7,5mg/Kg/dia v.o. Não há diferenças entre os grupos de 15mg/Kg/dia v.o. e 30mg/Kg/dia v.o. As alterações indicam dificuldades do rim na filtração principalmente de proteínas(**Figura 24 A,B,C,D, E e F** ).

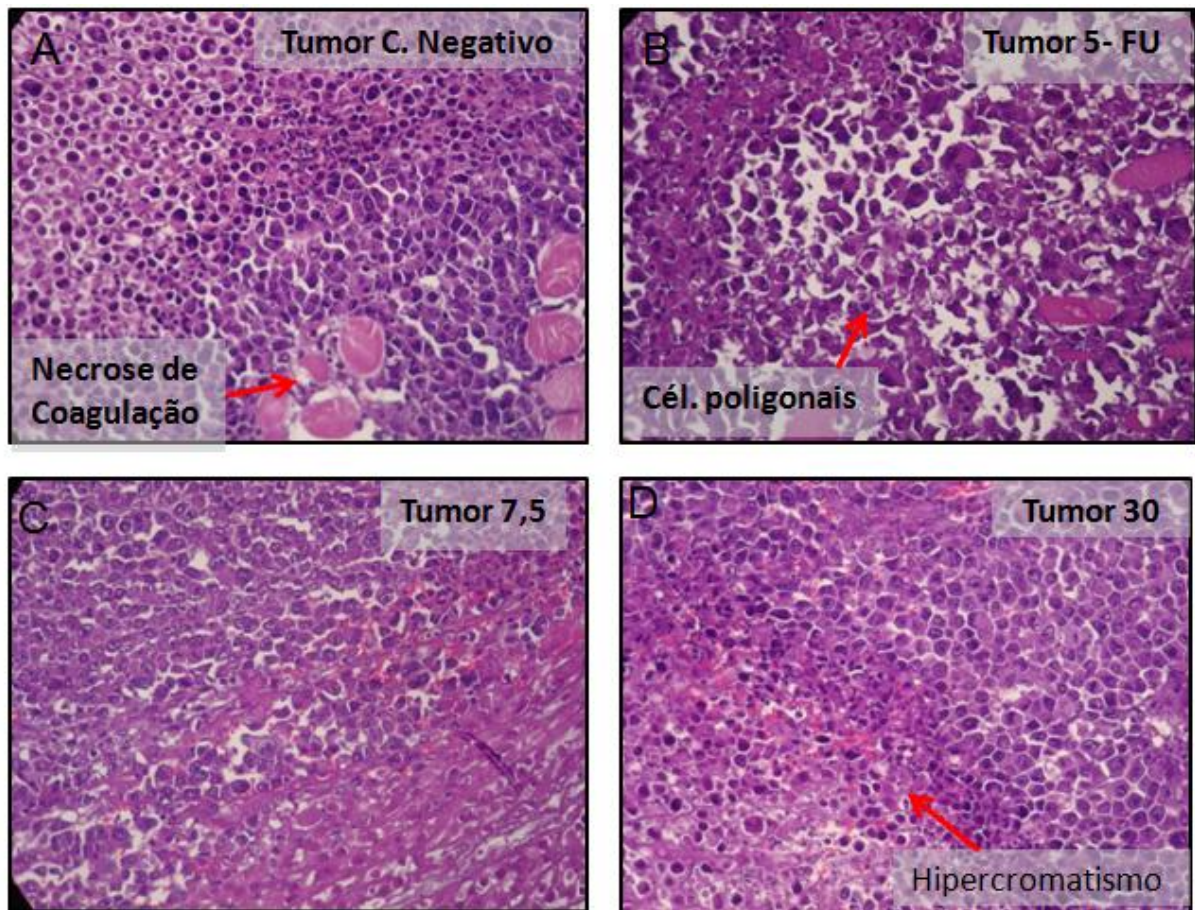
Os cortes histológicos do estômago tanto na estrutura cárdia e fúndica não encontramos alterações histológicas (**Figura 25 A,B,C eD** ).

**Tabela 8** – Efeito da AMSAF2 nas doses de 7,5mg/Kg, 15mg/Kg e 30mg/Kg/dia v.o. sobre o peso úmido relativo dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento.

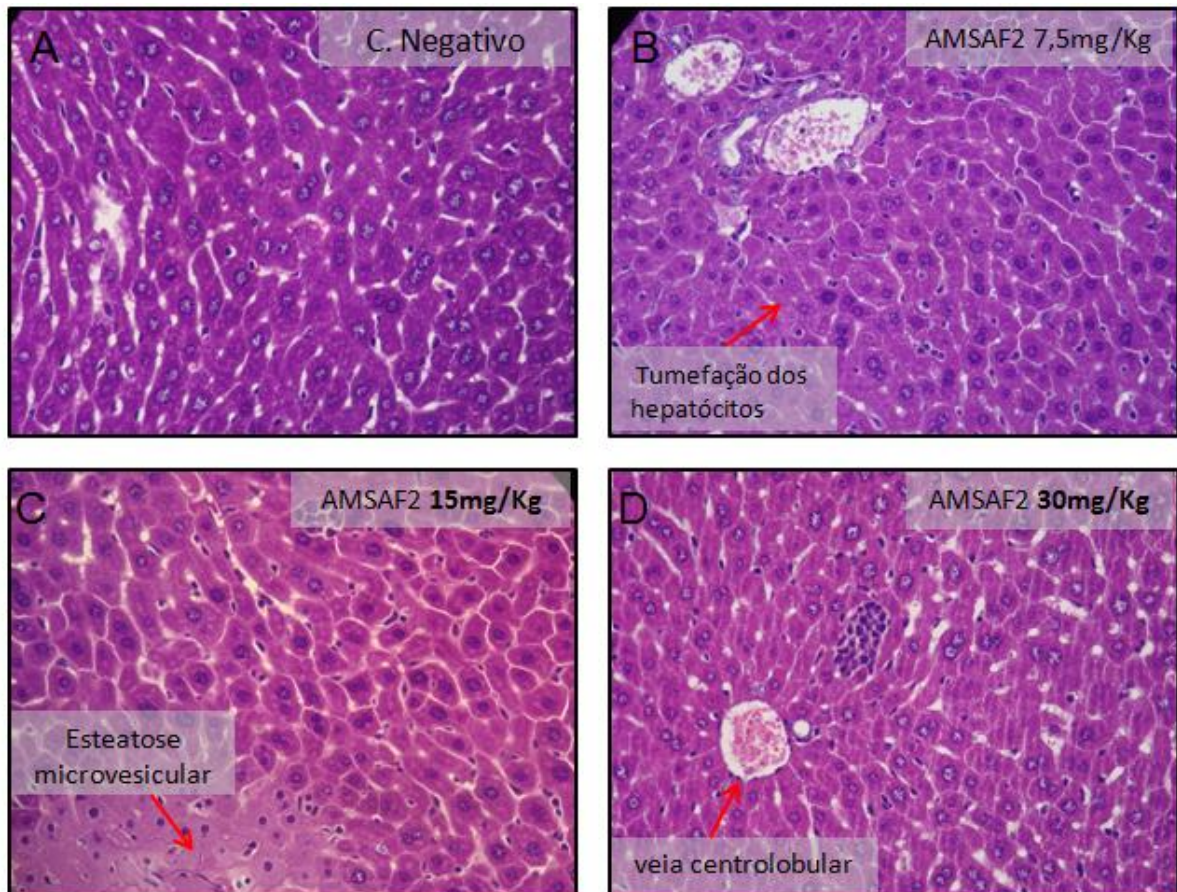
Grupo	Dose (mg/kg/dia)	Fígado	Estômago	Baço	Rim
		Peso relativo (g/100 g)			
Controle negativo	-	1,76 ± 0,19	0,30 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,55 ± 0,02
5-FU	20	1,30 ± 0,12	0,38 ± 0,02	0,16 ± 0,05	0,42 ± 0,01
AMSAF2	7,5	1,73 ± 0,14	0,35 ± 0,07	0,17 ± 0,09	0,53 ± 0,01
	15	1,58 ± 0,21	0,36 ± 0,08	0,17 ± 0,01	0,47 ± 0,01
	30	1,97 ± 0,21	0,39 ± 0,06	0,17 ± 0,01	0,57 ± 0,01

C: o controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga TWEEN 80(1%). O quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi utilizado como controle positivo. \* $p < 0,01$ . Dados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. a, ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo de animais saudáveis por ANOVA seguido por Newman-Keuls ( $n = 10$ ).

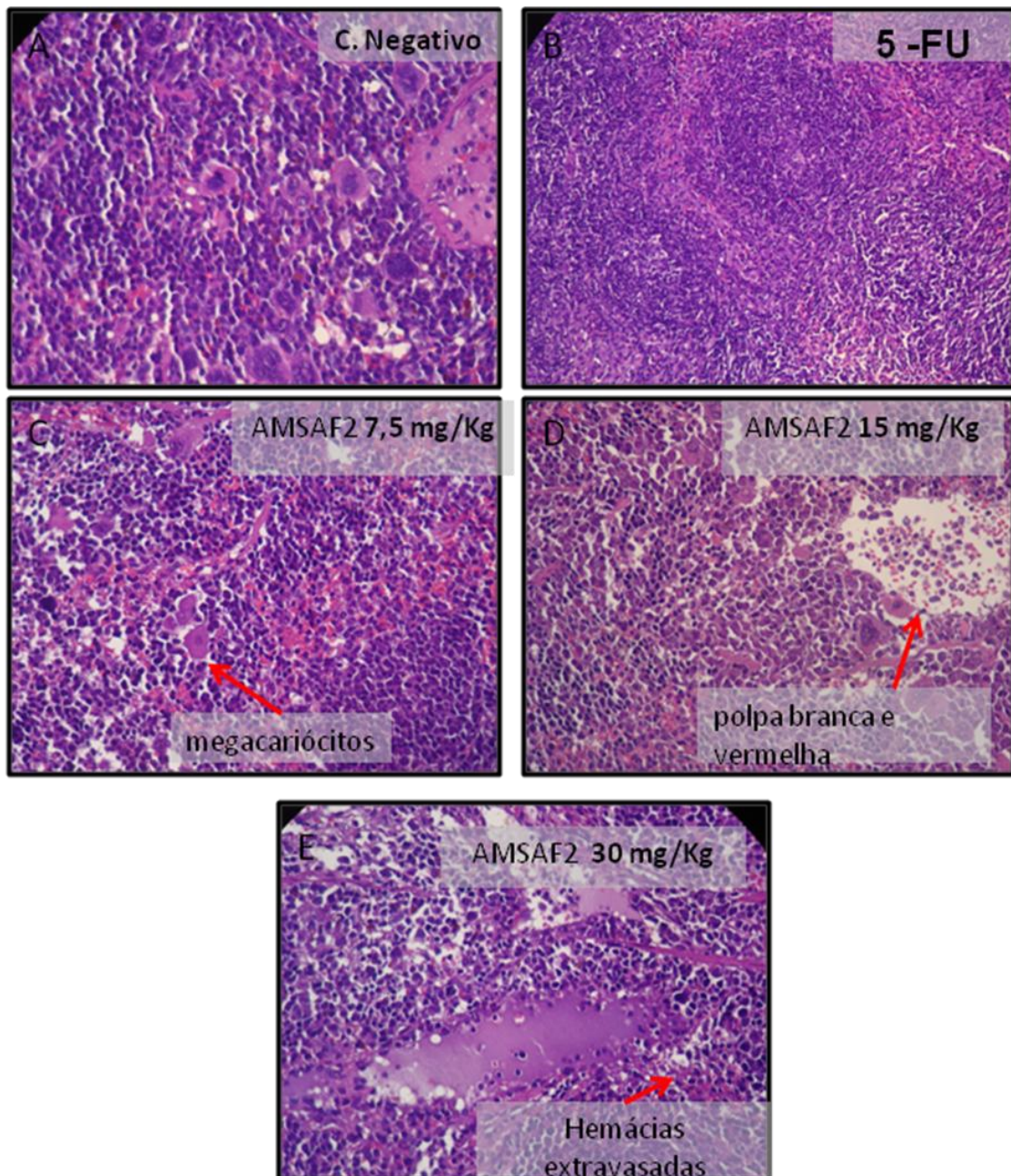
**Figura 21-** Fotomicrografia do tumor de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância TWEEN 80 (1 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). AMSAF2 foi administrada nas doses de 7,5 (C) 15 e 30mg/kg/dia gavagem (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x



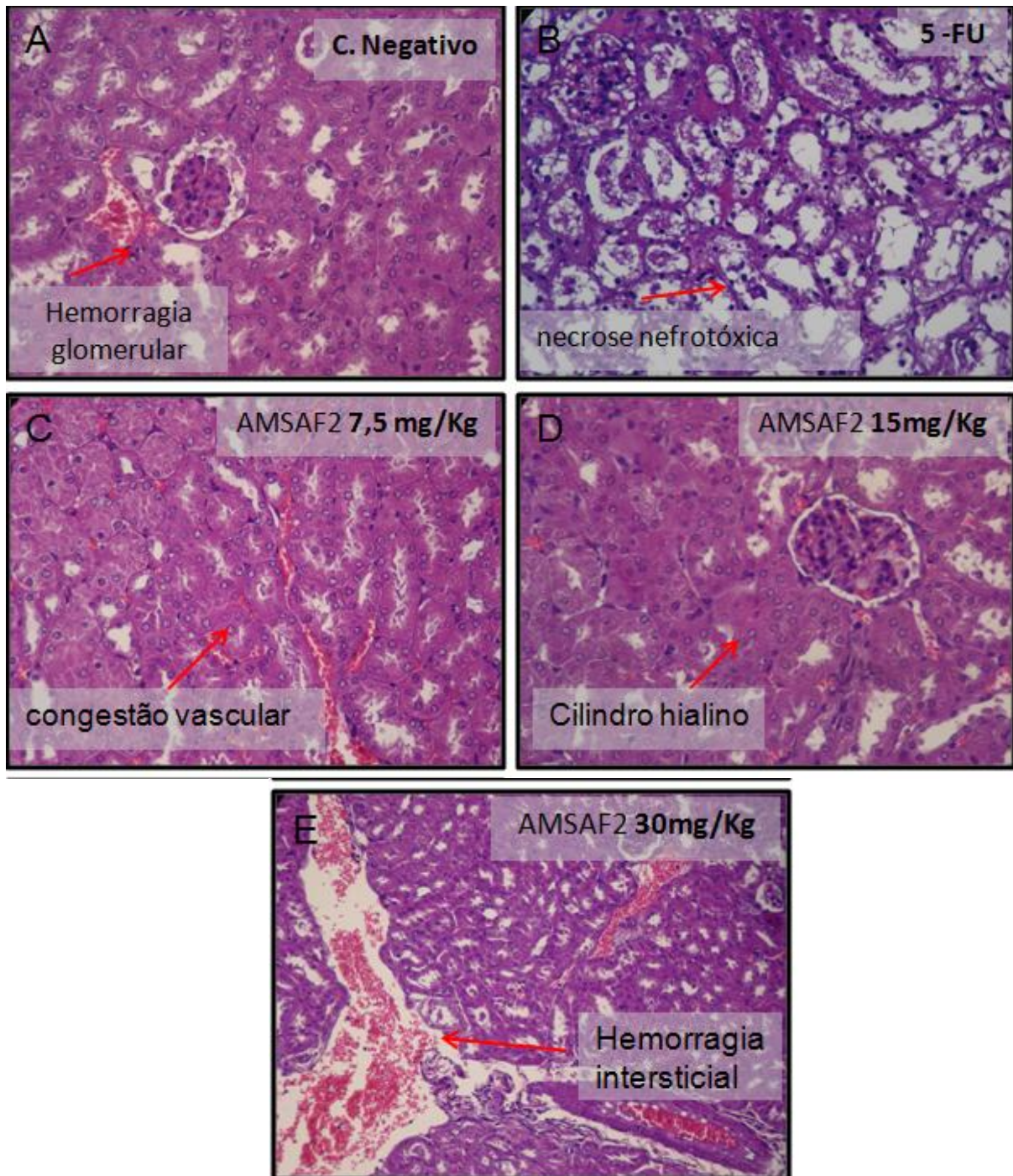
**Figura 22-** Fotomicrografia do Fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância TWEEN 80 (1 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo. AMSAF2 foi administrada nas doses de 7,5 (B), 15(C) e 30mg/kg/dia v.o. (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



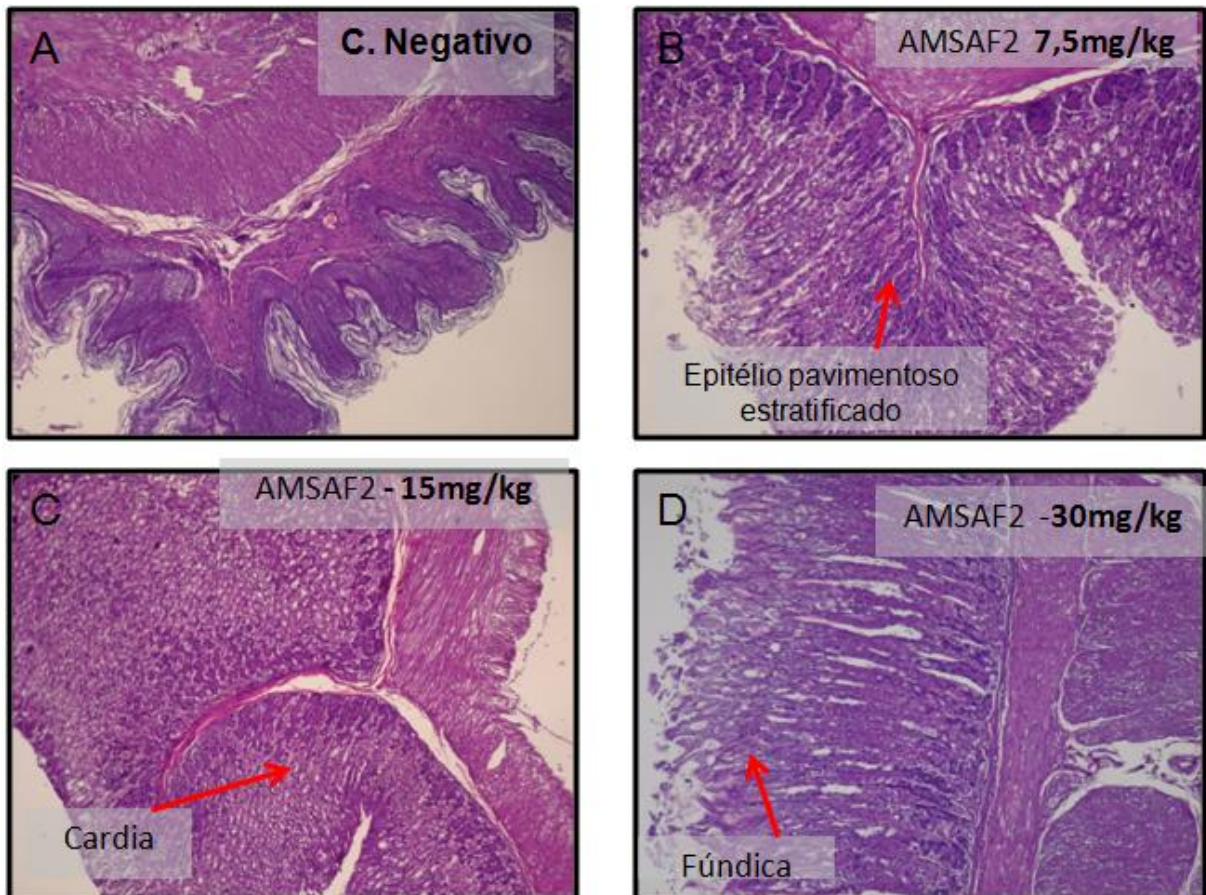
**Figura 23-** Fotomicrografia do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (TWEEN 80 (1 %)). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (E). AMSAF2 nas doses de 7,5 (C) , 15 (D) 15 E 30 (B)mg/kg/dia v.o.. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 200x e 400x.



**Figura 24** - Fotomicrografia do rim de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (TWEEN 80 (1 %)). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). AMSAF2 nas doses de 7,5(C),15(D) e 30(E)mg/kg/dia v.o. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x



**Figura 25**-Fotomicrografia do Estômago de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (TWEEN 80 (1 %)). AMSAF2 nas doses de 7,5 (B) 15mg/kg/dia (C) e 30mg/Kg/dia v.o. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 100x.



#### 4.6 Determinação dos parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

Foi realizada a análise bioquímica do sangue dos camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 e observou-se que os animais tratados pela via oral com AMSAF2 na dose de 7,5; 15 e 30 mg/Kg/dia com relação as enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) o grupo com tumor tratado com TWEEN 80 (1 %) não apresentaram alterações nos níveis séricos. Nas dosagens da função renal analisado, a uréia, em relação ao grupo controle não apresentou alteração no nível sérico, já a creatinina nas doses 15 e 30 mg/Kg/dia ( $0,46 \pm 0,012$ ) e ( $0,46 \pm 0,011$  mg/dL) respectivamente apresentou um discreto aumentos nos níveis séricos desta enzima ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo dos animais saudáveis ( $0,387 \pm 0,02$  mg/dL), o que representa uma toxicidade renal, e que não foi encontrado no grupo tratado com AMSAF2 por via oral (**Tabela 9**).

A partir da análise hematológica, observou-se que o número de plaquetas e de leucócitos totais não foi alterado em nenhum dos grupos tratados, ao contrario do 5-FU ( $p > 0,05$ ) (**Gráfico 2 e 3**).

Na contagem diferencial, a porcentagem de neutrófilos nos grupos tratados com tumor quando comparado com o grupo dos animais tratados com TWEEN 80 (1%) por via oral ( $p < 0,05$ ) não houve diferença significativa (**Tabela 10**).

**Tabela 9-** Efeito do extrato acetônico isolado da planta *Anona muricata* (AMSAF2) sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos *Mus musculus* transplantados com Sarcoma 180. ALT = Alanina aminotransferase, AST = aspartato transaminase, Ureia e Creatinina

Parâmetros bioquímicos	Controle negativo TWEEN 80 1%	5-FU (25 mg/kg/dia)	AMSAF2		
			7,5 mg/kg/dia	15 mg/kg/dia	30 mg/kg/dia
AST (U/L)	157,5 ± 13,85	80,38 ± 7,1*	137,7 ± 7,0	140,6 ± 11,34	125,4 ± 9,4
ALT (U/L)	30,6 ± 2,3	29,63 ± 3,03	39,6 ± 2,3	36,0 ± 1,9	34,38 ± 1,75
Ureia (mg/dL)	41,50 ± 4,1	40,25 ± 1,3	37,10 ± 4,8	41,30 ± 3,6	40,75 ± 2,5
Creatinina (mg/dL)	0,38 ± 0,07	0,45 ± 0,018	0,38 ± 0,04	0,46 ± 0,03*	0,45 ± 0,05*

Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni e correspondem à média ± E.P.M. de cinco animais,  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo de animais saudáveis.

**Tabela 10** - Efeito do extrato acetônico isolado da planta *Annona muricata* (AMSAF2) sobre os parâmetros Hematológicos de sangue periférico de camundongos *Mus musculus* transplantados com Sarcoma 180.

Parâmetros hematológicos	Controle Negativo	5-Fluoracil (25 mg/kg/dia)	AMSAF2		
	TWEEN 80 1%		7,5 mg/kg/dia	15 mg/kg/dia	30 mg/kg/dia
Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	6,53 $\pm$ 0,27	8,43 $\pm$ 0,40	7,24 $\pm$ 0,45	7,23 $\pm$ 0,26	7,38 $\pm$ 0,48
Hemoglobina (g/dL)	11,33 $\pm$ 0,49	12,88 $\pm$ 0,56	12,22 $\pm$ 0,78	11,65 $\pm$ 0,36	12,65 $\pm$ 0,35
Hematócrito (%)	37,08 $\pm$ 1,74	50,54 $\pm$ 2,07	40,83 $\pm$ 2,65	38,82 $\pm$ 1,33	40,30 $\pm$ 2,55
RDW (%)	14,25 $\pm$ 1,02	13,30 $\pm$ 1,39	14,37 $\pm$ 2,49	13,67 $\pm$ 2,92	14,87 $\pm$ 1,80
VCM (fL)	56,77 $\pm$ 2,33	60,11 $\pm$ 4,07	56,35 $\pm$ 3,69	53,67 $\pm$ 0,83	54,63 $\pm$ 3,47
HCM (pg)	17,35 $\pm$ 0,27	15,24 $\pm$ 0,30	16,87 $\pm$ 0,43	16,12 $\pm$ 0,26	16,75 $\pm$ 0,42
CHCM (g/dL)	30,60 $\pm$ 0,45	25,49 $\pm$ 0,77	29,75 $\pm$ 0,77	30,07 $\pm$ 0,26	30,67 $\pm$ 1,21
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1279 $\pm$ 58,33	827,6 $\pm$ 78,01	1331 $\pm$ 56,99	1523 $\pm$ 147,0	1323 $\pm$ 69,28
Leucócitos totais ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5,11 $\pm$ 0,65	1,13 $\pm$ 0,14	3,31 $\pm$ 0,32	4,56 $\pm$ 0,79	4,08 $\pm$ 0,53
Segmentados (%)	45 $\pm$ 8,46	14,25 $\pm$ 5,09	46 $\pm$ 8,28	55,67 $\pm$ 9,68	54,67 $\pm$ 4,08
Linfócitos (%)	44,33 $\pm$ 3,44	84,50 $\pm$ 2,0	53,0 $\pm$ 3,4	44,0 $\pm$ 3,99	44,84 $\pm$ 1,68
Monócitos (%)	0,5 $\pm$ 0,22	0,0	0,3 $\pm$ 0,21	0,0	0,1 $\pm$ 0,016
Eosinófilos (%)	0,2 $\pm$ 0,16	0,0	0,5 $\pm$ 0,34	0,3 $\pm$ 0,21	0,3 $\pm$ 0,21

Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni e correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de cinco animais,  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo de animais saudáveis

Gráfico 3 -Número de plaquetas **após tratamento por 07 dias com extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* (AMSAF2)**. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade:  $1159 \times 10^3/\mu\text{L}$  (SUCKOW *et al.*, 2006).

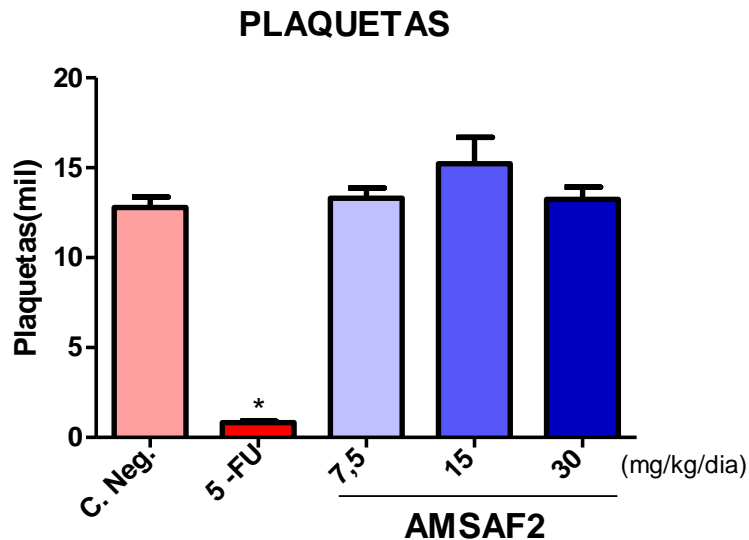
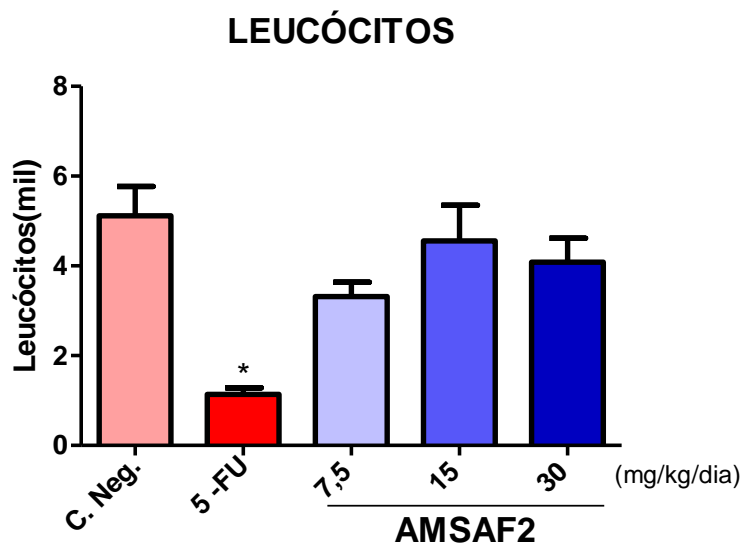


Gráfico 4-Número de leucócitos totais **após tratamento por 07 dias com extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* (AMSAF2)**. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade:  $12,43 \times 10^3/\mu\text{L}$  (SUCKOW *et al.*, 2006).



# ***Discussão***

## 5. Discussão

A utilização de plantas no tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (BALLADRIN *et al.*, 1993). Nos últimos 25 anos, de todos os compostos bioativos descobertos, 63% são produtos naturais, derivados deles ou possuem estruturas baseadas em produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2007). O valor dos produtos naturais pode ser avaliado por três critérios: (1) taxa de introdução de novas entidades químicas, (2) número de doenças tratadas e/ou evitadas pela molécula e (3) frequência no uso e no tratamento da doença.

Uma forma de buscar novas substâncias com propriedades antitumorais é através de *screening* com modelos *in vitro*. Neles são determinados a citotoxicidade das substâncias de forma rápida e eficaz (CRAGG & NEWMANN, 2005). Neste contexto, os testes em linhagens celulares humanas substituíram os ensaios com células leucêmicas *in vivo*, mostrando mais rapidez, economia e reprodutibilidade (FORNELLI *et al.*, 2004; SHOEMAKER *et al.*, 1984; VENDITI, 1983). Entretanto, aqueles compostos com mecanismos de ação dependente do hospedeiro ou que sofrem processos de metabolização não são detectados nesses testes.

Outra fonte de busca de agentes anticâncer a partir de fontes vegetais iniciou-se por volta dos anos cinqüenta com a descoberta de vários agentes citotóxicos. Segundo o FDA, 75% das drogas aprovadas e utilizadas no tratamento do câncer provêm de produtos naturais (NEWMAN *et al.*, 2003; CRAGG & NEWMAN, 2005; CHIN *et al.*, 2006; HARVEY, 2008). Há um grande número de agentes anti-neoplásicos derivados de vegetais sob avaliação pré-clínica e clínica (SRIVASTAVA *et al.*, 2005), e apesar do desenvolvimento da química combinatória e da modelagem molecular, a quimioterapia do câncer ainda permanece desalentadora, devido à múltipla resistência às drogas e aos sérios efeitos colaterais resultantes das similaridades morfológicas e fisiológicas entre as células normais e transformadas, o que torna difícil evitar a toxicidade advinda do tratamento (KAMB, 2005). Por isso, é importante identificar moléculas naturais com potencial atividade terapêutica para a realização de futuros estudos clínicos e que sirvam de fonte de conhecimento para a

síntese de novos compostos com atividade tumoral mais efetiva e menos tóxica e/ou novos mecanismos de ação.

A planta *Annona muricata* L. vem despertando a atenção dos cientistas pelo fato de ser utilizada por diferentes culturas em várias partes do mundo, sendo considerada como uma fonte potencial de compostos anticâncer. Tradicionalmente são utilizadas as folhas para diversas doenças. Muitos compostos bioativos e fitoquímicos têm sido encontrados na graviola, e suas propriedades têm sido estudadas desde a década de 1940. Vários estudos científicos realizados por diversos pesquisadores têm validado o uso popular da graviola (FENG et al., 1962; MEYER, 1982).

O extrato etanólico de sementes de araticum (*Annona crassiflora*) também foi estudado e, segundo Santos et al. (1996) ele apresentou citotoxicidade *in vitro* para células de carcinoma de pulmão e melanoma. Partindo deste relato na literatura nosso estudo também demonstrou citotoxicidade.

Revisando a literatura, foi encontrado apenas relatos a respeito de estudos citotóxicos sobre *Annona muricata* L. Porém, há trabalhos que mostram que o consumo de *Annona muricata* e *Annona squamosa* pode estar relacionado à presença de um parkinsonismo atípico que foi evidenciado na população da ilha de Guadalupe, no Caribe (CAPARROS-LEFEBVRE & ELBAZ, 1999). Segundo Champy et al. (2004) a annonacina, bem como outras acetogeninas, pode causar a neurodegeneração em ratas e estar relacionada a esse dano.

Três grupos separados de pesquisadores isolaram as acetogeninas da graviola, que demonstraram significativa atividade antitumoral e propriedades anticancerosas, além da toxicidade seletiva contra várias linhagens celulares tumorais *in vitro*, sem causar danos às células normais (ZENG et al., 1996; RIESER et al., 1996; 1993; 1991; WU et al., 1995a; 1995b; 1995c; 1995d). Muitas das acetogeninas têm demonstrado seletiva toxicidade contra vários tipos de células tumorais em doses bastante baixas como em as células do carcinoma pancreático e prostático (PACA-2 e PC-3) (KIM et al., 1998; HOPP et al., 1997; 1996), carcinoma pulmonar (A-549) (ZENG et al., 1996; WU et al., 1995a; WU et al., 1995b; WU et al., 1995c), adenocarcinoma de mama resistente a múltiplas drogas (MCF-7/Adr) (WU et al., 1995c; OBERLIES et al., 1997), carcinoma epidermóide (LIAW et al., 2002),

células HepG2 (células de hepatoma humano) (CHANG *et al.*, 2001; 2003; BETANCUR-GALVIS *et al.*, 1999), células Hep 2,2,15 (hepatoma celular causado por hepatite B) (LIAW *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2001), linfoma humano (JARAMILO *et al.*, 2000).

Diante deste fato, foi coletado o material vegetal, as sementes, na fazenda Iolla no município de Trairí – CE também demonstrou potente atividade citotóxica. Quando testada em diferentes linhagens celulares e em tumor sólido. Em nosso estudo a  $CI_{50}$  desse extrato em linhagens celulares, especialmente em HL-60 (Leucemia) foi de 0,194  $\mu\text{g/mL}$ , na SF-295 (Glioblastoma) e OVCAR-8 (Ovário) foi de 0,060  $\mu\text{g/mL}$  e 0,098  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente e na HCT-116 (Carcinoma) de 0,14  $\mu\text{g/mL}$ .

Cultura de células de mamíferos, dentre elas a linhagem leucêmica de HL-60 representam uma importante ferramenta exaustivamente utilizada nos estudos dos efeitos de uma droga sobre a proliferação e densidade celular, a progressão do ciclo e a indução de morte celular (PAILARD *et al.*, 1999; MILITÃO *et al.*, 2006). Esta linhagem derivou de sangue periférico de um paciente com leucemia promielocítica aguda, caracterizada, cultivada e estabelecida inicialmente por COLLINS *et al.* (1977).

Por outro lado, testamos o extrato contra linfócitos de camundongos para verificar o quanto essa substância poderia ser tóxica em nosso organismo, e observamos que a  $IC_{50}$  foi 9,23  $\mu\text{g/mL}$ . Embora deva considerar-se relevante tal citotoxicidade frente às células normais, vale ressaltar que, tomados em conjunto, os valores de  $CI_{50}$  para HL-60 pode ser traduzida numa maior sensibilidade das células leucêmicas ao AMSAF2, cerca de 47 vezes mais citotóxica em detrimento das células normais. Segundo alguns autores, na avaliação do potencial citotóxico de uma substância, é de fundamental importância à utilização de células normais, tais como os linfócitos, para avaliar a seletividade da droga teste para células normais ou tumorais (ZUCO *et al.*, 2002; ANAZETTI *et al.*, 2003).

Diante de nossos resultados, acredita-se na presença de acetogeninas, no extrato estudado, pois o mesmo apresentou citotoxicidade *in vitro* para diferentes células. Embora não encontramos nenhum relato feito na literatura em relação à citotoxicidade de *Annona muricata* contra linfócitos humanos.

Nem sempre os efeitos observados *in vitro* podem ser extrapolados para modelos *in vivo*, desta forma é necessário estudar os efeitos desse composto em sistemas biológicos completos. Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intricada patogênese do câncer em seres humanos. De fato, a maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos é fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento do câncer em camundongos, uma vez que esses organismos são modelos acessíveis e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos (KAMB, 2005). Fundamentando no uso de tumores experimentais para a identificação de substâncias com potencial antitumoral, a atividade *in vivo* do composto AMSAF2 foi avaliada utilizando camundongos transplantados com Sarcoma 180. O Sarcoma 180 é um tumor original de camundongo e uma das linhagens celulares mais frequentemente usadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (LEE *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 2006).

Pode-se citar como exemplo, um polissacarídeo isolado do fungo *Ganoderma lucidum*, que não foi capaz de impedir a proliferação do tumor *in vitro*, mas quando administrado no animal com Sarcoma 180, foi capaz de inibir até 61,88% na maior dose utilizada, de 200 mg/kg (CAO & LIN, 2004). Já foi demonstrado que ambos os alginatos isolados da alga *Sargassum vulgare* (SVLV e SVHV) apresentam potente atividade antitumoral em modelo murino de sarcoma 180, tanto quando administrados por via intraperitoneal, como por via oral, a qual apresentou uma inibição pelo alginato SVHV de 66,2% para a dose de 50 mg/m<sup>2</sup>/dia e de 88,8% na dose de 100 mg/m<sup>2</sup>/dia (SOUSA *et al.*, 2008).

Para podermos avançar em nosso estudo, foi necessário testar nosso extrato em três doses, mas para isso faz-se necessário o cálculo da DL<sub>50</sub>.

O teste da DL<sub>50</sub> foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a *Digitallis* e a Insulina. Entretanto, na década de setenta, este teste, que tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais dos grupos testes começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. Este teste tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drugs*

*Administration* (FDA), responsáveis pela a aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas. (KRYSIK; RYDZYNSKI,1997; STAMMATI *et al.*, 2005; GUBBELS-VAN HAL *et al.*, 2005).

Em 1981, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD) incorporou o Teste da DL<sub>50</sub> em suas diretrizes. Entretanto, neste período foi amplamente aceito que precisão estatística juntamente com dados, como a inclinação da curva dose-resposta, intervalo de confiança da DL<sub>50</sub>, e sinais tóxicos, não seriam necessários para propostas de avaliação de risco.

Em 1984 Iain Purchase articulou a criação de um grupo de trabalho na Sociedade Britânica de Toxicologia. Este grupo propôs um novo método para a avaliação da toxicidade aguda oral, o qual evitava utilizar o critério morte dos animais como o objetivo final e propôs a observação do aparecimento de sinais claros de toxicidade decorrentes da exposição a uma série de doses fixas. Este método ficou conhecido como o Teste da Dose Fixa (TDF), avaliado por agências internacionais, sendo posteriormente publicado em 1990 (VAN DENHEUVEL *et al.*, 1990).

Em 1998, surgiu o Teste “*Up and Down*” (TUD) sendo, também, posteriormente recomendado pela OECD, este teste sugere objetiva estimar o valor da DL<sub>50</sub> testando seqüencialmente animais individuais, com a dose para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, dependendo do resultado prévio do animal anterior. Assim utilizando o método “*Up and Down*” o AMSAF2 revelou uma DL<sub>50</sub> de 310,2 mg/kg de peso corpóreo, sendo considerado de mediano toxicidade de acordo com as categorias de toxicidade estabelecidas por Hodge & Sterner (1944), baseadas para prováveis DL<sub>50</sub> para o homem, as quais permanecem até os dias atuais. Apesar da dose testada, via oral, ser menor que à DL<sub>50</sub>, o extrato AMSAF2 se mostrou atóxico quando administrado, evidenciando que o fator comumente responsável pela sua toxicidade pode estar sendo degradado pelo trato gastrointestinal, fato que explicaria sua menor toxicidade via oral.

O procedimento de obtenção do extrato testado neste trabalho sugere que a menor citotoxicidade revelada pelo extrato degradada deve-se a sua boa absorção

em meio ácido. Com base neste achado, decidiu-se avaliar a atividade antitumoral da AMSAF2 em três doses distintas de 7,5; 15 e 30mg/kg/dia, todas administradas via oral por gavagem. Esse tratamento oral se mostrou eficaz em reduzir a massa tumoral.

Os resultados do presente trabalho confirmam a atividade antitumoral *in vivo* do extrato AMSAF2, que quando administrado por via oral, inibiu em 48,41%, 33,27% e 30,90 % o crescimento do tumor nas doses de 30,15 e 7,5mg/kg/dia, respectivamente. Esses dados sugerem que esse composto contribua para as propriedades terapêuticas descritas para diferentes formulações de *Annona muricata* L.

Muitas drogas anti-câncer são administradas v.o. ou v.i. A intraperitoneal é a mais rápida e direta, uma vez que garante uma completa biodisponibilidade. A biodisponibilidade oral de drogas está sujeita a barreiras de absorção e aos efeitos de primeira passagem. Como resultado, agentes orais têm, caracteristicamente, variações farmacocinéticas maiores que aqueles administrados no peritônio. Em um estudo com o etoposídeo, o coeficiente de variação foi quase dobrado quando esse antitumoral foi usado v.o. No TGI, a absorção de drogas é governada por diversos fatores como a área de superfície absorptiva, tempo de trânsito, fluxo sanguíneo e pelo pH gástrico e intestinal, além da possibilidade de metabolização e transporte (UNDEVIA *et al.*, 2005).

Um dos aspectos mais fáceis e lógicos de serem avaliados quando o organismo é submetido a um tratamento é o ganho de peso corpóreo. O peso dos camundongos submetidos à administração do AMSAF2(oral) mostra que em nenhuma das três doses interferiu no crescimento dos animais, (BARDOCZ *et al.*, 1996). O TWEEN 80 (Sorbitol Polioxietileno 80) é um surfactante(rico em gordura) não-iônico derivado do éster sorbitol solúvel em água utilizado como agente emulsificante e dispersante em produtos medicinais. Devido a essas propriedades o TWEEN 80 é usado como veículo. Outra evidência *in vivo* que aponta toxicidade de substâncias são as alterações pós-tratamento (aumento ou diminuição) no peso relativo dos órgãos (BARDOCZ *et al.*, 1996). Dos órgãos dissecados, em nenhuma das três doses apresentaram alterações de importância estatística ( $p < 0,01$ ). O

extrato também pode ser outra fonte de gorduras, uma vez que a acetona utilizada para extraí-lo também dissolve substâncias relativamente apolares.

Alguns produtos medicinais naturais têm efeitos hepato e nefrotóxicos (LIN *et al.*, 2003; AKDOGAN *et al.*, 2003). Danos a esses órgãos frequentemente resultam em elevação nos parâmetros químicos clínicos (ADEDEJI *et al.*, 1981; KALLNER; TRYDING, 1989; STONARD; EVANS, 1995) tais como as enzimas AST e ALT e análises de bilirrubina total e conjugadas, uréia e creatinina (AKDOGAN *et al.*, 2003). Muitas dessas enzimas encontradas no soro não se originam do fluido extracelular. Durante o dano tecidual, algumas dessas enzimas caem no soro sanguíneo devido a alterações na permeabilidade das membranas celulares (WILLS, 1985). A mensuração dessas enzimas é uma valiosa ferramenta no diagnóstico clínico, fornecendo-nos informações sobre o efeito patológico das substâncias sobre alguns tecidos. As enzimas AST e ALT estão presentes no citossol das células hepáticas (SHAHJAHAN *et al.*, 2004). Danos à integridade estrutural dos tecidos sempre são refletidas com uma elevação de algumas dessas enzimas no soro.

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos mostrou que somente a dose de 15 e 30 mg/Kg aumentou a dosagem de creatinina durante o ensaio antitumoral que, embora tenha sido estatisticamente significativa, não foi uma diferença tão elevada. Este resultado indica que o extrato AMSAF2, mesmo na presença do tumor, pode reduzir a taxa de filtração renal. Alterando a capacidade renal de excreção do metabólito. Isto seria também um reflexo da integridade renal preservada dos camundongos tratados, corroborado pela não alteração nos níveis de ureia (ANIAGU *et al.*, 2005).

Creatina, uréia e ácido úrico são os principais produtos catabólicos do metabolismo dos músculos, proteínas e purinas respectivamente. A ausência de efeitos nesses parâmetros, assim como nos parâmetros hepáticos sugere que o AMSAF2 não causou inflamação ou constrição ao nível celular nos órgãos dos camundongos (AFOLAYAN *et al.*, 2009).

Os resultados dos estudos hematológicos do sangue dos animais mostraram que os animais tratados com o extrato AMSAF2, nenhuma das três doses apresentaram alterações de importância estatística ( $p < 0,01$ ). A manutenção dos níveis plaquetários sugere que o AMSAF2 não foi tóxico na medula óssea, afetando a produção das células que originam as plaquetas assim como não afetou as

proteínas envolvidas na cascata de coagulação sanguínea, como a trombopoeitina (LI *et al.*, 1999).

Ressaltamos a grande importância dos resultados obtidos com o veículo utilizado para dissolver o AMSAF2, o Tween 80 1%. Em nenhum dos parâmetros avaliados, seja bioquímico ou hematológico, o veículo teve resultados alterados, evidenciando que o veículo não exerce nenhum efeito tóxico sobre os animais e parece não influenciar na ação do extrato.

Na avaliação do potencial terapêutico de uma nova molécula, pode-se considerar tão importante ou mais a comprovação de sua segurança que da própria eficácia, uma vez que novas estratégias terapêuticas devem fundamentalmente incorporar uma melhoria nos efeitos tóxicos ou colaterais observados (MORAES *et al.*, 2003). Desta maneira, em paralelo a comprovação da atividade antitumoral *in vivo*, procedeu-se com uma avaliação toxicológica preliminar do AMSAF2, com base na análise das alterações histopatológicas em órgãos como fígado, baço e rins, e na alteração do peso corpóreo dos animais tratados.

Como o principal órgão detoxificador e metabolizador do corpo, o fígado está sujeito a danos por uma enorme variedade de substâncias químicas farmacêuticas e ambientais. Embora a maior parte da conversão metabólica das toxinas ocorra no fígado, células renais, células da mucosa intestinal e dos pulmões e até mesmo da pele também podem estar envolvidas (LIEBLER & GUENGERICH, 2005). De qualquer modo, mesmo lesões hepáticas substanciais ocorridas na presença de xenobióticos (como o 5-FU) são potencialmente reversíveis desde que a arquitetura do tecido conjuntivo se mantenha íntegra e capaz de favorecer a regeneração hepatocelular, ao ponto que mesmo após a morte de 50 % dos hepatócitos por lesão aguda, caso a matriz extracelular e seus componentes estejam intactos, ainda sim pode haver regeneração de lóbulos hepáticos inteiros (KUMAR *et al.*, 2005).

Os estudos histopatológicos dos animais tratados com AMSAF2 7,5;15 e 30 mg/kg/dia mostraram discreta hepatotoxicidade não dose-dependente representada por congestão venosa portal e esteatose microvesicular focal. A moderada hiperplasia das células de Kupffer vista nesses animais pode ser explicada pela ativação de células mononucleadas envolvidas na degradação eritrocitária, na fagocitose de detritos celulares, absorção de ferro ou por focos hemorrágicos devido

à congestão vascular. Além disso, esses macrófagos teciduais, quando ativados, liberam citocinas pró-inflamatórias que estão diretamente relacionadas à toxicidade tecidual local ou sistêmica (KUMAR *et al.*, 2004).

A nefrotoxicidade nos rins causada pelo AMSAF2 nas doses de 7,5; 15 e 30 mg/kg/dia se deve à moderada tumefação do epitélio tubular e intersticial. Discretas tumefações celulares foram vistos no grupo controle negativo e no tratado com 5-FU. A moderada tumefação do epitélio tubular indica leve toxicidade caracterizada por alterações incipientes e reversíveis, devido à arquitetura glomerular estar preservada.

A toxicidade ao baço causada pelo composto AMSAF2 foi evidenciada nas três doses, muita congestão de polpa vermelha e aumento (de forma subjetiva) no número de megacariócitos. Podendo está relacionado ao tumor e não ao tratamento. Para esclarecer terá que associar com outros dados que serão pesquisados.

No estudo histológico do estômago dos animais tratados v.o. tanto na cárdia com na parte fúndica não foram encontradas alterações histológicas resultantes de insultos tóxicos, sem focos hemorrágicos e mucosa e submucosa normais.

No geral, a ausência de eosinofilia acentuada, núcleos picnóticos, neutrófilos e membranas celulares desintegradas confirmam a inobservância de áreas necróticas isquêmicas ou apoptóticas na presença de insulto tóxico (AMSAF2) ou imunológico de caráter irreversível em todos os órgãos corados por H/E e analisados por microscopia óptica (KUMAR *et al.*, 2005), achados que comprovam a discreta toxicidade do AMSAF2.

De qualquer modo, os resultados *in vivo* demonstram o potencial antitumoral do extrato AMSAF2, chegando a inibir mais de 48% do crescimento tumoral sem causar graves danos tóxicos e irreversíveis nos animais. Segundo ORTHOLAND *et al.* (2004) um produto natural não necessariamente precisa ser o melhor composto para o uso na clínica. Esses compostos podem servir como protótipo para o desenvolvimento de outros fármacos que apresentem melhores características, como o aumento da atividade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e principalmente o aumento da seletividade, assim como, da redução dos efeitos adversos.

# ***Conclusão***

---

## 6 Conclusão

O extrato AMSAF2 obtido das sementes da *Annona muricata* L. possui atividade citotóxica, por demonstrar grande seletividade para células tumorais. Além disso, a redução de 48,41 % no crescimento tumoral e alterações histológicas apenas incipientes pelo extrato AMSAF2 e a moderada toxicidade sistêmica, ressaltam um promissor potencial antitumoral desse extrato.

# ***Bibliografia***

## 7 Referências Bibliográficas

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**, 22 (2), p. 11-16, 2003.

ADEWOLE, S.O. & OJEWOLE, J.A.O. Protective Effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Serum Lipid Profiles and Oxidative Stress in Hepatocytes of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. **Afr. J. Trad. CAM**, 6 (1): 30 – 41, 2009.

ADEDEJI, A. O. **Rapid interpretation of routine clinical tests**. Zaria, Nigeria: Asekome and Company, 1992. 1981, pp.16-31.

AFOLAYAN, A. J.; YAKUBU, M .T. Effect of *Bulbine natalensis* barker stem extract on the functional indices and histology of the liver and kidney of male Wistar rats. **J. Med. Food.**, 12(4): 814-820, 2009.

ALALI, F.Q., et al. Annonaceous acetogenins as natural pesticides; potent toxicity against insecticide-susceptible and resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). **J. Econ. Entomol.**, 91(3): 641-9, 1998.

ALONSO, J.R. **Tratado de Fitomedicina**. Isis Ediciones SRL, Buenos Aires, 1998.

ALMEIDA, J.; BALL, B. A. **Effects of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa**. *Animal Reproduction*, v.87, p.321-337, 2005.

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**. *Quim. Nova*, v. 28, p.118-129, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **The history of cancer**. Disponível em: [http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI\\_2\\_6x\\_the\\_history\\_of\\_cancer\\_72.asp?sitearea=&level](http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_6x_the_history_of_cancer_72.asp?sitearea=&level). Acessado em 19 de Novembro de 2012.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. **Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells**. *Toxicology*, v.188, p.261-274, 2003.

ANIAGU, S. O.; NWINYL, F. C.; AKUMBA, D. D.; AJOKU, G. A.; DZARMA, S.; IZEBE, K. S. Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. **African Journal of Biothechnology**, 4(1): 72-78, 2005.

ANTOUN, M.D., *et al.* Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactives. **Int. J. Pharmacog.**, 31(4): 255–58, 1993.

ARROYO, J.; PRASHAD, M.; VÁSQUEZ, Y. *et al.* Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *Annona muricata muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glândula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. **Ver. Per. Med. Exp. Salud. Publica**, v.22, n.4, p. 247-253, 2005.

AKDOGAN M, Kiliñç I, Oncu M, Karaoz E, Delibas N. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on kidney tissue in rats. *Hum Exp Toxicol*. **2003** Apr;22(4):213-9.

BALADRIN, M. F.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R.; *in: Human medicinal agents from plants* (ACS Symposium Series N° 534), Ame. Chem. Soc. Books, Washington, 1993.

BALDUCCI, L. **Molecular insight in cancer treatment and prevention**. *The Intern. Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, p. 1329-1336, 2007.

BARDOCZ, S., GRANT, G., PUSZTAI, A., FRANKLIN, M. F., CARVALHO, A. F. F. U. **The effect of phytohaemagglutinin on the growth, body composition, and**

**plasma insulin of the rat at different dietary concentrations.** *British J. Nutr.*, v.76, p.613-626, 1996.

BERTRAM, J.S. **The molecular biology of cancer.** *Molecular Aspects of Medicine*, v.21, p. 167-223, 2001.

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. **Nat Prod Rep.**, 22(2):269-303, 2005.

BENTACUR-GALVIS, L. *et al.* **Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94(4): 531-535, 1999.

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 Med.**, 57 (5): 434-436, 1991.

BOYLE, P.; LEVIN, B. **World Cancer Report 2008.** World Health Organization / International Agency for Research on Cancer, Lyon, 524p., 2008.

BRANCH, L.C. & SILVA, I.M.F. Folk Medicine of Alter do Chao, Para, Brazil. **Acta Amazonica**, 13(5/6):737-797, 1983.

BRITO, H. O.; NORTONHA, E. P.; MARTINS, L. M. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (Ata). **Rev. Bras. Farm.**, 89(3):180-184, 2008.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, 67(12): 2141-2153, 2004.

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ELBAZ, A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. Caribbean Parkinsonism Study Group. **Lancet**, 354(9175): 281-286, 1999.

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.

CARBAJAL, D.; CASACO, A.; ARRUZAZABALA, L.; GONZALEZ, R.; FUENTES, V. Pharmacological Screening of Plant Decoctions Commonly Used in Cuban Folk Medicine. **J. Ethnopharmacol.**, 33 (1/2): 21-24, 1991.

CHANG, F. R.; WU, Y. C. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.**, v.64, p.925-931, 2001.

CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. **Drug Discovery From Natural Sources**. The AAPS Journal, v.8, p.239-243, 2006.

CHIH, H.; CHIU, H. F.; TANG, K. S.*et al.* Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. **Life Sci.**, v.69, p. 1321-1331, 2001.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Armazenamento, pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 293 p., 1990.

CHIU, H. F.; CHIH, T. T; HSIAN, Y.M.*et al.*, Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular CAMP and c GMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. **Bioch. Pharm.**, v.65, n.3, p.319-327, 2003.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**. v. 432, p. 829 – 837, 2004.

COLLINS, S. J.; GALLO, R. C.; GALLAGHER, R. E. **Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture**. *Nature*, v.270, p.347-349, 1977.

COSTA-LOTUFO, L. V.; ARAÚJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; MORAES, M. E. A.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O. **Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from Hyptis martiusii Benth (Labiatae).** Pharmazie, v. 58, p. 78-79, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. **Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine.** Journal of Ethnopharmacology, v.99, p.21–30, 2005.

CRAGG, G. M., KINGSTON, D. G. I., NEWMAN, D. J. (Eds.). **Anticancer Agents from Natural Products.** Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL., 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D. J. **Plants as a source of anti-cancer and anti-HIV agents.** Ann. appl. Biol., v.143, p.127-133, 2003.

CRAGG, G. M; NEWMAN, D.J. **Plants as a source of anti-cancer agents.** Journal of Ethnopharmacology, v.100, p.72–79, 2005.

CRANE, J.H.; CAMPBELL, C.W. Origin and distribution of tropical and subtropical fruits. In: NAGY, S. SHAW, P.E.; WARDOWSKI, W.F. **Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties and uses.** Florida: Science Source, p. 11-20, 1990.

DAUD, S.B. **Chemical Constituents from Annona Murica (Linn.) And Garcinia Mangostana (Linn.) and Their Biological Activities.** Thesis presented to the Senate of University Putra Malaysia in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science, 2005.

DRAPER, H.H., HADLEY, M. **Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation.** Methods Enzymol 186:421-431, 1990.

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. **N. Engl. J. Med.**, n. 328, p. 246–252, 1993.

FAEGRI, K.; PIJL, L. van der. **The principles of pollination ecology**. 3.ed. Oxford. New York, Toronto. Ed. Pergamon, 1980.

FANG, X. P.; RIESER, M. J.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: an update review. **Phytochemistry Analysis**, 1(4): 27-48, 1993.

FALCÃO, M.A.; LLERAS, E.; LEITE, A.M.C. Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade da Graviola (*Annona muricata* L) na região de Manaus. **Acta Amazônica**, 12(1): 27-32, 1982.

FAHY, J.; DUFLOS, A.; RIBET, J.P.; JACQUESY, J.C.; BERRIER, C.; JOUANNETAUD, M.P.; ZUNINO, F. **Vinca alkaloids in superacidic media: a method for creating a new family of antitumor derivatives**. J. Am. Chem. Soc., v.119, p.8576-8577, 1997.

FENG, P.C. (1962). Pharmacological screening of some West Indian medicinal plants. **J. Pharm. Pharmacol.**, 14: 556-561.

FEO, V. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. **Fitoterapia**, 63: 417-440, 1992.

FERAS, Q., *et al.* Annonaceous acetogenins: Recent progress. **J. Nat. Prod.**, 62(3): 504-540, 1999.

FORNELLI, F, MINERVINI, F. & LOGRIECO, A. **Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9)**. J. Invert. Pathol., v. 85, p. 74-79, 2004.

FLEMING, S. **The molecular biology of cancer: the basics**. Surgery (Oxford), v.21, p.iii – vi, 2003.

GBEASSOR, M., *et al.* In vitro antimalarial activity of six medicinal plants. **Phytother. Res.**, 4(3): 115–17, 1990.

GLEYE, C., *et al.* Cis-mono tetrahydrofuran acetogenins from the roots of *Annona muricata* L. **J. Nat. Prod.**, 61(5): 576–9, 1998.

GONZÁLEZ-COLOMA, A.; GUADAN, A.; INÉS, C. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p.1028-1034, 2002.

GUBBELS-VAN HAL, W. M.; BLAAUBOER, B. J.; BARENTSEN, H. M.; HOITINK, M. A.; MEERTS, I. A.; VAN DER HOEVEN, J. C. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 42, n. 3, p. 284-295, 2005.

HANAHAN, D., WEINGERG, R.A. **The hallmarks of cancer**. Cell, 100, 57 – 70, 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: the next generation**. Cell , v.144, n.5, p. 646 - 674, 2011.

HARVEY, A. L. **Natural products in drug discovery**. Drug Disc. Today, v.13, p.894-901, 2008.

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. **J Pharm Pharmacol.**, Nov;49(11):1145-9, 1997.

HEALTH STATISTICS AND INFORMATICS DEPARTMENT. Disponível em: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/projections/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/index.html). Acessado em 14 de agosto de 2012.

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). **J. Ethnopharmacol**, 36 (1):81-85, 1992.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 98p., 2012.

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

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. R. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **J. Org. Chem.**, v.47, p. 3151-3153, 1982.

JOLY, A.B. **Botânica, introdução a taxonomia vegetal**. São Paulo. Ed. Nacional, 1979. 550p.

KALLNER, A.; TRYDRY, N. IFCC Guidelines to the evaluation of drugs effects in clinical chemistry. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigations**, 195: 1-29, 1989.

KAMB, A. **What's wrong with our cancer models?** Nature Review Drug Discovery, v.4, p.161-165, 2005.

KINGSTON, D.G.I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: *The Practice of Medicinal Chemistry*. **Ed. by Wermuth CG. Academic Press Limited**, 102 - 114, 2009

KNOWLES & SELBY. **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**, 4<sup>th</sup> ed., Oxford University Press Inc., New York, 532p., 2005.

KOJIMA, N.; TANAKA, T. Medicinal Chemistry of Annonaceous Acetogenins: Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Analogues. **Molecules**, v.14, p.3621-3661, 2009.

KOTAKE Y, OKUDA K, KAMIZONO M, MATSUMOTO N, TANAHASHI T, HARA H, CAPARROS-LEFEBVRE D, OHTA S. Detection and determination of reticuline and N-methylcoculaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, 25;806(1):75-8, 2004.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. **Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel.** *Cancer Cell*, v. 13, p. 472-482, 2008.

KRYSIAK, B.; RYDZYNSKI, K. Comparative studies on the usefulness of using a fixed dose and a stepwise method of dosing for evaluating acute chemical toxicity. **Med. Pr.**, v. 48, n. 5, p. 561-578, 1997.

KRZAKOWSKI, M., DOUILLARD, J., RAMLAU, R., JASSEM, J., SZCZESNA, A., ZATLOUKAL, P., PAWEL, J., HANSEN, O. E SUN, X. **Phase III study of vinflunine versus docetaxel in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) previously treated with a platinum-containing regimen.** *Journal of Clinical Oncology*, v.25, p.7511, 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease**, 7<sup>th</sup> edn., WB Saunders, China, 1552p., 2004.

LANDOLT, J. L.; AHAMMADSAHIB, K.I.; HOLLINGWORTH, R. M. *et al.* Determinations of structure-activity relationships of Annonaceous acetogenins by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria. **Chemico-Biological Interactions**, v.98, p. 1-13, 1995.

LEBOEUF M, LEGUEUT C, CAVÉ A, DESCONCLOIS JF, FORGACS P, JACQUEMIN H. Alkaloids of Annonaceae. XXIX. Alkaloids of *Annona muricata*. **Planta Med.** May;42(5):37-44, 1981.

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

LEE, Y. L., KIM, H. J., LEE, M. S., KIM, J. M., HAN, J. S., HONG, E. K., KWON, M. S., LEE, M. J. **Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. *Exp. Anim.* v.52, p.371-375, 2010.**

LIAW, C.C., CHANGE, F.R., LIN C.Y., CHON, C.J., CHIU, H.F., WU M. J.; WU, Y.C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. ***J. Nat. Prod.* 65:470-475, 2002.**

LIAO, W.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W.G. **The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, v. 48, p. 46-53, 2009.**

LIEBLER, D. C., GUENGERICH, F. P. **Elucidating Mechanisms of Drug-induced Toxicity. *Nat. Rev. Drug Discov.* v.4, p.410-420, 2005.**

LIN, T. J.; SU, C. C.; LAN, C. K.; JIANG, D. D.; TSAI, J. L.; TSAI, M. S. Acute poisonings with *Breynia officinalis*-an outbreak of hepatotoxicity. ***Journal of Clinical Toxicology*, 41: 591-594, 2003.**

LING, Y., EL-NAGGAR, A.K., PRIEBE, W.; PEREZ-SOLER, R. **Cell Cycle-Dependent Cytotoxicity, G2/M Phase Arrest, and Disruption of p34cdc2/Cyclin B1 Activity Induced by Doxorubicin in Synchronized P388 Cell. *Molecular Pharmacology*, v.49, p.832-841,1996.**

LI, J.; XIA, Y.; KUTER, D. J. Interaction of thrombopoietin with the platelet complements receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics. ***Br. J. Haematol.* 106: 345, 1999.**

LIPUN, V.; KUROKAWA, M.; SUTTISRI, R.; TAWEECHOTIPATR, P.; PRAMYONTHIN, P.; HATTORI, M.; SHIRAK, K. **Efficacy of Thai medicinal plant**

**extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo.** Antiviral Research, v.60, p.175-180, 2003.

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

LOPEZ, A., HUDSON, J.B. & TOWERS, G.H. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.**, 77, 189 - 196, 2001.

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. IV CONNEPI. Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará. 2009.

LUI, V. W.; WENTZEL, A. L.; XIAO, D; LEW, K. L.; SINGH, S. V.; GRANDIS, J. R. **Requirement of a carbon spacer in benzyl isothiocyanate-mediated cytotoxicity and MAPK activation in head and neck squamous cell carcinoma.** Carcinogenesis, v.24, p.1705–1712, 2003.

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

MAGALHÃES, H. I. F., VERAS, M. L., TORRES, M. R., ALVES, A. P. N. N., PESSOA, O. D. L., SILVEIRA, E. R., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O., PESSOA, C. **In vitro and in vivo antitumor activity of physalins B and D from *Physalis angulata*.** J. Pharm. Pharmacol., v.58, p.235-241, 2006.

MANICA, I. Taxonomia, morfologia e anatomia. In: SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I.V.B.; MORAIS, O.; REBOUÇAS, T.N.H. **Anonáceas: produção e mercado.** Vitória da Conquista: UESB, p. 20-35, 1997.

MANN, J. **Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future.** Nature Reviews, v.2, p.143-148, 2002.

MARTIN, M.L.; DIAZ, M.T.; MONTEIRO, M.J.; PRIETO, P.; ROMAN, L.S.; CORTES, D. Antispasmodic activite of bezylisoquinoline alkaloids analogous to papaverine. **Planta Medica**, v. 59, n. 1, p. 63-67, 1993.

MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas**, 2ª Ed. UFC, 1994. Matos FJA. Farmácias Vivas, Ed. UFC,2002.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R, PUTNAM, J. E, JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., & MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents **Planta Med.** 45, 31 – 34, 1982.

MISAS, C.A.J., *et al.* Contribution to the biological evaluation of Cuban plants. IV. **Rev. Cubana Med. Trop.** 1979; 31(1): 29–35.

MILITAO, G. C. G.; DANTAS, I. N. F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M. J. C.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. **Induction of apoptosis by pterocarpans from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells.** **Life Sci.**, v. 78, p. 2409-2417, 2006.

MORAES, M. O.; BEZERRA, F. A. F.; LOTUFO, L. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A. Avaliação Clínica da Eficácia e Segurança de Fitoterápicos no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v.1, p.30-38, 2003.

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

MORTON, J.F. Soursop. p. 75–80. In: **Fruits of Warm Climates**. ISBN: 0-9610184-1-0; Miami, FL. 1987.

MOSCA, J.L.; ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C.; OLIVEIRA, J.F. **Determination of harvest index for soursop (*Annona muricata* L.)**. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, 1977, Chapingo, México. Memorias. Chapingo: Universidad Outoma de Chapingo, p. 315-322, 1997.

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 pp., 2006.

NEWMAN, D.J., CRAGG G.M., SNADER, K.M. **Natural Products as sources of new drugs over the period 1981-2002**. J. Nat. Prod., v.66, p.1022-37, 2003.

NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M. **Natural products as drug over the past 25 years**. J. Nat. Prod., v.70, p.461-477, 2007.

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**, vol.11(3), 243-245, 1997.

NICOLAS, H., *et al.* Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. **J. Med. Chem.** 40(13): 2102–6, 1997.

OBERLIES, N., CHANG, C.J.; MCLAUGHLIN, J.L. Structure – activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF – 7/Adr) cells. **J. Med. Chem.** 40 (13): 2102-2106, 1997.

ORTHOLAND, J.Y. & GANESAN, A. **Natural products and combinatorial chemistry: back to the future**. Curr. Op. Chem. Biol., v.8, p.271 - 280, 2004.

OLIVEIRA,C.C. **Estudo Toxicológico pré-clínico do extrato do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. e seu potencial antitumoral**.(Tese de Doutorado).Fortaleza. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará- UFC,2012

PADMAJA, R., ARUN, P.C., PRASHANTH, D., DEEPAK, M., AMIT A. & ANJANA, M. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, 73, 508 – 510, 2002.

PAPAC, R.J. **Origens os Cancer Therapy**. Journal of Biol. and Medicine, v. 74, p. 391-398, 2001.

PAZDUR, R., KUDELKA, A. P., KAVENAGH, J. J., COHEN, P. R., RABER, M. N. **The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere)**. Cancer Treat. Rev., v.19, p.351-86, 1993.

PAILARD, F., FINOT, F., MOUCHE, I., PRENEZ, A., VERICAT, J.A. **Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new entities**. Toxicology in Vitro, v.13, p.693–700, 1999.

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.

PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LEYVA, A.; MORAIS, M. E. A.; MORAIS, M. O., Anticancer potential of northeast brazilian plants *in* KHAN, M. T. H. & ATHER, A. (eds) **Advances in Phytomedicine. Leads molecules from natural products – Discovery and new trends**. Netherlands, Elsevier, Vol. 2, 1<sup>a</sup> Ed., 197-211, 2006.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L.; WETMORE, L. A.; MORAES, M. O.; LEYVA, A. **Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil**. Phytother. Res., v. 14, p. 187-191, 2000.

REDDY, L., ODHAV, B. & BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmac. Therap** ., 99, 1 – 13, 2003.

RIEGER, P.T. **The Biology of Cancer Genetics**. Seminars in Oncology Nursing, v.20, p.145-154, 2004.

RIESER, M.J., *et al.* Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.** 59(2): 100–8, 1996.

RIESER, M.J., *et al.* Bioactive single-ring acetogenins from seed extracts of *Annona muricata*. **Planta Med.** 59(1): 91–2, 1993.

RIESER, M.J., *et al.* Muricatacin: a simple biologically active acetogenin derivative from the seeds of *Annona muricata* (Annonaceae). **Tetrahedron Lett.** 32(9): 1137–40, 1991.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. **Natural products in anticancer therapy.** Current Opinion in Pharmacology, v.1, p.364–369, 2001.

RODRIGUES, F. A. R. **Avaliação da atividade citotóxica de um heterosídeo monoacetilado de benzilamina isolado das flores de *Moringa oleifera* (Moringaceae) Lam.** [Monografia de conclusão de curso]. Fortaleza: Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2008.

RUPPRECH, J. K.; HUI, Y-H.; McLAUGHLIN, J. L; Annonaceous Acetogenins: a review. **Journal of Natural Product** 53(2): 237-278, 1990.

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.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 329-331, 2003.

SANTOS, A. F. S.; ARGOLO, A. C. C.; COELHO, L C. B. B.; PAIVA, P. M. G. **Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds.** Water Research, v.39, p.975-980, 2005.

SANTOS, R. P. B. **Estudo estrutura-atividade do Taxol e derivados** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Física, Universidade Estadual de Campinas – INICAMP, 1998.

SANTOS, A.F. & SANT'ANA, A.E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine.** 8:115-120, 2001.

SHAHJAHAN, M.; SABITHA, K. E.; MALLIKA, J.; SHYAMALA-DEVIS, C. S. Effect of *Solanum trilobatum* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats. **Indian J. Med. Res.**, 120: 194-198, 2004.

SHOEMAKER, R. **Antitumor drug screening with a human tumor colony forming assay (HTCFA)**. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., v. 25, p. 1292, 1984.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; **Genética Toxicologia**. Porto Alegre, Alcance, 422p., 2003.

SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; SILVA, C.C.M.; JORGE, C.R.; SALES, D.; CARMONA, F.; HONORATO, F.; ANGELUCCI, M.; BIANCHI, R.V.; ALVES, R.B.N.; CHIARATTI, T.M. ***Annona muricata* L.** IN: ENCONTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM PLANTAS MEDICINAIS. RESERVA ECOCERRADO BRASIL. Minas Gerais, 2008.

SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, S. V. **Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor kappa B activation in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic cancer cells.** Carcinogenesis, v.25, p.1701–1709, 2004

SRIVASTAVA, V., NEGI, A. S., KUMAR, J. K., GUPTA, M., KHANUJA, S. P. S. **Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads.** Bioorg. Med. Chem., v.13, p.5892-5908, 2005.

STAMMATI, A.; COMBES, R. D.; SLADOWSKI, D.; VAN DER VALK, J.; BLAAUBOER B. J. Thirteenth International Workshop on In Vitro Toxicology. **Toxicol. In Vitro**, v. 19, n. 7, p. 843-844, 2005.

STONARD, M. D.; EVANS, G. O. **Clinical Chemistry**. In Ballantyne, B.; Marrs, T.; Turner, P. (eds). General and Applied Toxicology. Macmillan Press. London. pp. 247, 1995.

TAYLOR, L. **The Healing Power of Rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinals.** Square One Publishers. New York, EUA, 2005.

TAKAHASHI, J.A., PEREIRA, C.R., PIMENTA, L.P., BOAVENTURA, M.A.; SILVA, L.G. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. **Nat. Prod. Res.** 20 (1): 21-26, 2006.

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. **Oncol. Res.**14 (3): 147-54, 2003.

UNDEVIA, S. D., GOMES-ABUIN, G., RATAIN, M. J. **Pharmacokinetic variability of Anticancer Agentes.** Nat. Rev. Cancer, 5: 447-458, 2005.

VAN DEN HEUVEL, M. J.; CLARK, D. G.; FIELDER, R. J.; KOUNDAKJIAN, P. P.; OLIVER, G. J. A.; PELLING, D. *et al.* The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. **Food Chem. Toxicol.**, v. 28, p. 469-482, 1990.

VAN LOO, G.; SAELENS, X.; VAN GURP, M.; MACFARLANE, M.; MARTIN, S.J.; VANDENABEELE, P. **The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.** Cell Death Differ., v.9, p.1031-1042, 2002.

VENDITI, J.M. The National Cancer Institute antitumor drug discovery program, current and future perspective: a commentary **Cancer Treat. Rep.**, 67, 767,1983.

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. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 52 (3):129-132, 2010.

VIDAL HERNÁNDEZ, L. **La reproducción sexual y multiplicación vegetativa de las anonáceas.** Xalapa, Veracruz. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas, 35p. (Publicación Técnica, 3), 1993.

WALL, M. E. & WANI, M. C. **Camptothecin and taxol: from discovery to clinic.** Journal of Ethnopharmacology, v.51, p.239-254, 1996.

WANG, L.Q., *et al.* Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorg. Med. Chem.** 10(3): 561-65, 2002.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer.** Artmed, Porto Alegre, 864p., 2008.

WILLS, D. E. **Biochemical basis of medicine.** 3<sup>rd</sup> Edn., John Wright and sons Ltd., Bristol, England, pp. 267-268, 1985.

WRIGHT, K. M. **Groundbreaking plant from the Amazon takes on cancer, skeptics, and controversy.** Members Alert, Health Sciences Institute, v.5, n.7, p.3-6, 2005.

WU, F.E. *et al.* New bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, anomuricin C and muricatocin C, from the leaves of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.** 58(6): 909–15, 1995a.

WU, F.E., *et al.* Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.** 58(6): 902–8, 1995d.

YUAN, S.S. *et al.* Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Sci.** 72(25): 2853-61, May 2003.

ZENG, L. *et al.* Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.** 59(11): 1035–42, 1996a.

ZENG, L. *et al.*, Recent advances in Annonaceous acetogenins. **Nat. Prod Rep.** 13(4): 275–306, 1996b.

ZHANG, J.-G.; TIRMENSTEIN, M. A.; NICHOLLS-GRZEMSKI, F. A.; FARISS, M. W. **Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid peroxidation-dependent and -independent cell death: protective role of antioxidants.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v.393, p.87-96, 2001.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S.C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. **Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells.** Cancer Letters, v.175, p.17-25, 2002.