



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

**CECÍLIA CARVALHO DE OLIVEIRA**

**ESTUDOS TOXICOLÓGICOS PRÉ-CLÍNICOS E ANTITUMORAIS DO  
EXTRATO ACETÔNICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L.**

**FORTALEZA**

**2012**

CECÍLIA CARVALHO DE OLIVEIRA

ESTUDOS TOXICOLÓGICOS PRÉ-CLÍNICOS E ANTITUMORAIS DO  
EXTRATO ACETÔNICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L.

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como Requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

O46e Oliveira, Cecília Carvalho de.  
Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das  
folhas de *annona muricata* L. / Cecília Carvalho de Oliveira. – 2012.  
180 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da  
Saúde, Faculdade de Medicina, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia,  
Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Toxicologia.

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

1. Toxicologia. 2. Genotoxicidade. 3. Sarcoma 180. I. Título.

---

CDD 615.1

CECÍLIA CARVALHO DE OLIVEIRA

ESTUDOS TOXICOLÓGICOS PRÉ-CLÍNICOS E ANTITUMORAIS DO  
EXTRATO ACETÔNICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L.

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal do Ceará como Requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Farmacologia

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

Aprovada em: 19/10/2012

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Kristiana Cerqueira Mousinho  
Centro Universitário CESMAC - AL

---

Profa. Dra. Maria Sônia Felício Magalhães  
Universidade Estadual do Ceará -UECE

---

Profa. Dra. Socorro Vanesca Frota Gaban  
Universidade de Federal do Ceará-UFC

---

Profa. Dra. Danielle da Silveira Macedo  
Universidade Federal do Ceará-UFC

"Havia um homem que costumava ter em cima de sua cama uma placa escrita: ISSO TAMBÉM PASSA...

Então perguntaram à ele o por quê disso. Ele disse que era para que, quando estivesse passando por momentos ruins, poder se lembrar de que eles iriam embora, e que ele teria que passar por aquilo por algum motivo. Mas essa placa também era pra lembrá-lo que quando estivesse muito feliz, que não deixasse tudo pra trás, porque esses momentos também iriam passar e momentos difíceis viriam de novo. E é exatamente disso que a vida é feita: MOMENTOS!

Momentos os quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso próprio aprendizado. Por algum motivo. Nunca se esqueça do mais importante: NADA É POR ACASO! Absolutamente nada. Por isso temos que nos preocupar em fazer a nossa parte da melhor forma possível."

*Chico Xavier*

Aos **meus pais**,  
fontes de força, perseverança, apoio e coragem.  
à minha **avó Dulce**,  
pelo carinho e pelos cafés da tarde;  
ao **meu irmão**,  
pelo seu incentivo;  
ao **Carlos Windson**,  
companheiro das horas fáceis e difíceis e  
constante fonte de estímulo;  
à **Gabriela**,  
minha filha linda que nasceu junto com esta tese,  
fonte de alegria, bom-humor e estímulo para terminar o quanto antes.

## AGRADECIMENTOS

Em especial, ao **Prof. Dr. Odorico de Moraes**, pela constante confiança em meu potencial, pelas inúmeras oportunidades de crescimento, pela orientação, pela compreensão e pelo imenso carinho que sempre demonstrou ter.

Ao **Daniel**, idealizador e dono deste trabalho. Obrigada pela sua disposição a me ajudar sempre que lhe solicitei.

À **Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo**, pela sua ajuda final como coordenadora do curso.

À **Dra. Jamile Magalhães**, pela imensa ajuda nos ensaios de toxicidade com animais, dos testes de bioquímica e pelas correções feitas no trabalho em sua fase final. Agradeço também pelos seus ouvidos e paciência em ouvir as reclamações dos testes que deram errados.

Ao Dr. **Cláudio Costa**, químico que produziu os extratos que permitiram a realização deste trabalho e por suas correções na área química na fase final do trabalho.

Ao **Stefânio**, aluno de mestrado, que se tornou meus braços e pernas dentro do laboratório nos meses finais da tese, com quem dividi momentos de angústia e alegria pelos resultados finais obtidos e por agüentar minhas crises de mau-humor.

À **Dra. Ana Paula Nunes**, pela ajuda e ensinamentos nos resultados de histopatologia e seus encaixes de agenda.

À **Dra. Sônia Felício**, pelas experiências e ensinamentos adquiridos para o desenvolvimento de trabalhos de qualidade e bem construídos. Além de ter aceitado fazer parte da banca de avaliação deste trabalho.

À **Profa. Dra. Ana de Fátima Urano Carvalho**, pelas imensas ajudas, conversas e esclarecimentos de dúvidas, além do ensinamento fundamental de manipulação e tratamento de animais de laboratório e respeito à vida animal.

À **Profa. Dra. Kristiana Cerqueira Mousinho**, pelas conversas, brincadeiras, gargalhadas e companheirismo, além das ajudas nos experimentos e inúmeras trocas de inseguranças, confidências e experiências na vida profissional e pessoal, e que se fez presente até mesmo ausente. Obrigada também por ter aceitado fazer parte da banca.

À **Profa. Dra. Vanesca Frota**, pela sua amizade, carinho, orientações, dicas e dietas prescritas para que eu não terminasse esse trabalho rolando por aí.

Ao **José Roberto de Oliveira Ferreira**, pelas conversas, brincadeiras, gargalhadas e companheirismo, além das ajudas nos experimentos e inúmeras trocas de inseguranças, confidências e experiências na vida profissional e pessoal, e que se fez presente até mesmo ausente. Pelas nossas imensas conversas por telefone, mesmo estando em estados diferentes.

Aos professores que compõem o corpo docente do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pelas orientações e aulas que complementaram este trabalho.

Aos amigos do LOE, pelo convívio e a constante disponibilidade de ajuda e troca de experiências.

Aos amigos e membros da UNIFAC, pelas ajudas e apoios técnicos;

Às técnicas **Silvana França**, cuja dedicação e trabalho é indispensável à boa ordem do laboratório, além das inúmeras ajudas; **Erivanda**, pela sempre disponibilidade de ajuda e manutenção do nosso material de trabalho; e **D. Rogéria**, pelo auxílio sempre disponibilizado.

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

À **Aura** e à **Márcia**, secretárias do Programa de Pós-Graduação, pela enorme contribuição para nossa formação, com suas informações preciosas e atenção aos nossos apelos desesperados de estudantes perdidos e angustiados.

Aos **porteiros** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, que nos permitiam trabalhar sempre nos dias e horários mais inconvenientes da semana.

Aos **funcionários do biotério**, responsáveis pela manutenção do biotério e pelo bem-estar e higiene dos nossos animais, carinhosamente tratados por “bebês”.

Ao meu pai, **Joaquim Aristides**, por ser sempre meu referencial. Pelas conversas e conselhos sempre recheados de bom senso, pelo apoio incondicional e principalmente pelo seu amor e confiança em mim.

A minha mãe, **Dulce Carvalho**, pelo carinho, pelos cuidados, pelas preocupações, pelo apoio, pelas conversas, pela sua torcida e tentativa de entender o que estava fazendo e, principalmente, por dividir as atenções com a Gabi, para que eu pudesse trabalhar nos finais de semana, noites e feriados.



Ao meu marido, **Carlos Windson Cavalcante Mota**, pessoa muito especial, pelas injeções de coragem, pelos seus incentivos, pelas nossas conversas, pela sua segurança passada nos momentos mais difíceis, pelo seu apoio, pelo seu carinho, pela sua compreensão e por você ter ficado ao meu lado sempre, durante todos esses anos, além de tornar os meus dias mais coloridos.

A minha filha linda, **Gabriela**, que nasceu no início dessa jornada e veio para alegrar ainda mais meus dias e fazer com que sua presença em minha vida estimulasse cada dia mais a conclusão deste trabalho, principalmente pelos seus insistentes pedidos: “Vai tabaiar não, mãe. Fica com a Bibi!”.

A minha avó, **Maria Dulce**, pelos mimos, pelos carinhos, pelas orientações, pela torcida e por ser essa pessoa sempre maravilhosa em minha vida.

À **Beatriz Carvalho**, prima e comadre querida e amada, pelas várias ajudas, principalmente em relação ao inglês e traduções, pelo carinho e pela imensa torcida, além das nossas tradicionais pizzas às sextas-feiras, para relaxar um pouco.

Ao meu irmão, **Joaquim Pedro**, por sempre ter sido minha figura de exemplo, pelas ajudas e auxílios, principalmente em relação às tecnologias e pela sua enorme torcida.

À minha cunhada, **Lorena Veras**, pelo carinho e pela torcida.

À toda minha família pelo apoio e torcida pelo cumprimento de mais essa etapa em minha vida.

Aos amigos: **Cínthya Iamille** e toda **sua família**; **Silvéria** e **família**; **Ana Carla** e **família**; **Ana Paula**; **Otacílio** e **Roberta**; **Roberto César** e **Deysi** pela troca de informações, ajudas nos experimentos e principalmente pela amizade, pelas brincadeiras, festinhas feitas nas nossas casas, companheirismo e aniversários comemorados juntos;

Aos amados e queridos amigos biólogos que estão sempre perto e prontos para ajudar: **Lady Clarissa**, **Nara Gadelha**, **Nathanna Mateus**, **Davi Farias**, e **Mariana Giovenardi**, pelas horas de relaxamento, brincadeiras e descontração, fossem no laboratório de Fisiologia Animal ou no Fone Pizza e pelas muitas conversas e trocas de experiências para sobrevivência até o final do nosso objetivo, a conclusão do curso de pós-graduação.

À **Dra. Selva Aguiar**, sem seu incondicional apoio emocional, não teria chegado até aqui com tanta garra, alegria e tranquilidade.

Às agências de fomento **CAPES** e **CNPq** pelo auxílio financeiro que permite nos dedicarmos inteiramente à execução de um trabalho como este.

Aos camundogos e ratinhos que sacrificaram suas valiosas vidas para que este trabalho pudesse ser concluído e mais conhecimentos produzidos.

## RESUMO

*Annona muricata*, conhecida popularmente como gravioleira no Brasil, é uma planta usada amplamente na medicina popular na forma de chás e infusões para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer. O trabalho teve como objetivo avaliar o perfil toxicológico, genotoxicológico e antitumoral do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* e foi realizado utilizando ensaios de curta e longa duração *in vivo* e *in vitro*. Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* contra várias linhagens tumorais humanas, havendo resposta tóxica a muitas delas, principalmente K-562, HCT-8, HCT-116 e SF-295 com concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) de 0,1452 µg/mL, 0,2457 µg/mL, 0,2956 µg/mL e 0,2191 µg/mL respectivamente. Os estudos de toxicidade aguda foram realizados *in vivo* e a dose letal média (DL<sub>50</sub>) foi de 310,2 mg/Kg. Os estudos de toxicidade crônica foram realizados utilizando-se as doses 12,5 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg do extrato acetônico. Os resultados mostraram poucas alterações nos animais nos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hematológicos, mostrando que o extrato é bem tolerado e pouco tóxico. Os estudos de genotoxicidade foram realizados *in vivo*. Os animais foram tratados, por via oral, com três doses do extrato acetônico (12,5 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg). Após 24 h e 48 h, o sangue periférico e a medula óssea foram coletados. No ensaio do cometa não houve detecção de nenhum cometa de grau elevado, sendo as doses testadas estatisticamente semelhantes ao controle negativo. No ensaio do micronúcleo, todas as doses testadas do extrato acetônico não induziram a formação de micronúcleos, sendo semelhantes estatisticamente em relação ao controle negativo, ao contrário do observado no controle positivo. Os ensaios antitumorais mostraram que o extrato apresenta atividade inibidora do crescimento tumoral, tanto em ratos, no modelo do carcinossarcoma de Walker 256, como em camundongos, no modelo Sarcoma 180. Todos esses resultados indicam que o extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* apresenta poucas ações tóxicas e significativa atividade inibidora do crescimento tumoral nos modelos testados.

Palavras-chave: *Annona muricata*. Toxicologia. Genotoxicidade. Sarcoma 180. Carcinossarcoma de Walker 256, Antitumoral, Citotoxicidade.

## ABSTRACT

*Annona muricata*, popularly known as soursop in Brazil, is a plant widely used in vernacular medicine as teas and infusions for the treatment of various diseases, including cancer. This study aimed to evaluate the toxicological, genotoxicological and antitumor profile of the acetone extract from the leaves of *Annona muricata* and test it using short-and long-term *in vivo* and *in vitro* assays. We initially assessed *in vitro* cytotoxicity against several human tumor cell lines. There was a toxic response to many of them, especially K-562, HCT-8, HCT-116 and SF-295 with average inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 0.1452 µg/mL, 0.2457 µg/mL, 0.2956 µg/ml and 0.2191 µg/mL respectively. Acute toxicity studies were performed *in vivo* and the average lethal dose (LD<sub>50</sub>) was 310.2 mg/kg. Chronic toxicity studies were performed using doses of 12.5 mg/kg, 25 mg/kg and 50 mg/kg of acetone extract. Results showed little change in animals' physical, biochemical and hematological parameters, showing that the extract is well tolerated and not very toxic. Genotoxicity studies were performed *in vivo*. Animals were given three oral doses of the acetone extract (12.5 mg/kg, 25 mg/kg and 50 mg/kg). After 24 and 48 hours peripheral blood and bone marrow were collected. In the comet assay no high grade comet was detected and tested doses were statistically similar to the negative control. In the micronucleus test, none of the tested acetone extract doses induced the formation of micronuclei. They were statistically similar to the negative control, unlike what was observed in the positive control. Antitumor testing showed that the extract has tumor growth inhibitory activity, both in rats, in the Walker 256 carcinosarcoma model, and in mice, in the Sarcoma 180 model. All such results indicate that the acetone extract from the leaves of *Annona muricata* has little toxic action and significant activity inhibiting tumor growth in the models we tested.

Keywords: *Annona muricata*. Toxicology. Genotoxicity. Sarcoma 180. Walker 256 Carcinosarcoma, Antitumor, Cytotoxicity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Agarose NMP</b>	Agarose Normal melting point
<b>Agarose LMP</b>	Agarose Low melting point
<b>AMFA</b>	<i>Annona muricata</i> Folhas Acetônica
<b>ALB</b>	Albumina
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AMI</b>	Amilase
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>AU</b>	Ácido úrico
<b>BioNCE</b>	New bioactive chemical entities
<b>CEPA</b>	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
<b>CHCM</b>	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória média
<b>CIH</b>	International Conference on Harmonisation – Conferência Internacional de Harmonização
<b>CNS</b>	Conselho Nacional de Saúde
<b>CPA</b>	Ciclofosfamida
<b>CR</b>	Creatinina
<b>CT</b>	Colesterol total

<b>DDA</b>	Dose diária aceitável
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal média
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid - Ácido desoxirribonucleico
<b>DPM</b>	Desvio padrão da média
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EMEA</b>	European Medicines Agency – Agência Europeia de Medicamentos
<b>ENC</b>	Eritrócitos normocromáticos
<b>EPC</b>	Eritrócitos policromáticos
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>FDA</b>	Food and Drugs Administration – Agência Americana de Medicamentos
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GL</b>	Glicose
<b>GLOB</b>	Globulina
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HCM</b>	Hemoglobina Corpuscular Média
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus – Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HPLC-MS</b>	High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

<b>HTS</b>	High Troughtput Screening
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IT</b>	Inibição Tumoral
<b>LabNOE</b>	Laboratório Nacional de Oncologia Experimental
<b>LACT</b>	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas
<b>M</b>	Molar
<b>MIT</b>	Microambiente inflamatório tumoral
<b>MN</b>	Micronúcleo
<b>MO</b>	Microorganismos
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltertrazólio
<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Hidrogênio
<b>NCE</b>	New Chemicals Entities
<b>NCI</b>	National Cancer Institute (Estados Unidos)
<b>NOEL</b>	Non Obseved Effect Level - Nível de Efeito Não Observável
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS</b>	Tampão fosfato de sódio
<b>PT</b>	Proteínas totais
<b>q. s. p.</b>	Quantidade suficiente para
<b>RDW</b>	Red cell distribution width
<b>RE</b>	Resolução especial

<b>RNA</b>	Ribonucleic acid - Ácido ribonucleico
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>SAR</b>	Structure-activity relationship – Relação estrutura-atividade
<b>SCGE</b>	Single Cell Gel Electrophoresis Assay
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ -Smooth muscle actin
<b>SMART</b>	Somatic mutation and recombination test - Teste para detecção de mutação e recombinação somática
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TG</b>	Triglicerídeos
<b>THF</b>	Tetrahydrofurano
<b>THP</b>	Tetrahidropirano
<b>UNIFAC</b>	Unidade de Farmacologia Clínica
<b>UR</b>	Uréia
<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas).....	32
Figura 2:	Imagem representativa de <i>Catharanthus roseus</i> e estruturas químicas moleculares isoladas .....	39
Figura 3:	<i>Annona muricata</i> L.....	45
Figura 4:	Folhas, flor e frutos da <i>Annona muricata</i> L. (Graviola). .....	46
Figura 5:	Desenho esquemático dos ramos, folhas, frutos e sementes (fotos) da <i>Annona muricata</i> L. (Graviola) .....	48
Figura 6:	Acetogeninas isoladas da família Annonaceae .....	53
Figura 7:	Fotografia de satélite mostrando local da coleta e os respectivos dados de latitude e longitude.....	65
Figura 8:	Avaliação do consumo de água, ração e peso dos animais durante 90 dias de ensaio toxicidade de doses repetidas. ....	85
Figura 9:	Níveis plasmáticos de glicose de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ....	86
Figura 10:	Níveis plasmáticos de colesterol total de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ....	87
Figura 11:	Níveis plasmáticos de triglicerídeos de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ....	88
Figura 12:	Níveis plasmáticos de proteínas totais de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ....	89

- Figura 13: Níveis plasmáticos de albumina de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 90
- Figura 14: Níveis plasmáticos de globulinas de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 91
- Figura 15: Níveis plasmáticos de uréia de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 92
- Figura 16: Níveis plasmáticos de creatinina de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 93
- Figura 17: Níveis plasmáticos de AST (aspartato aminotransferase) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 94
- Figura 18: Níveis plasmáticos de ALT (alanina aminotransferase) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 95
- Figura 19: Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle)..... 96
- Figura 20: Níveis plasmáticos de amilase de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 97
- Figura 21: Níveis plasmáticos de ácido úrico de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 98

Figura 22:	Número de hemácias de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).....	101
Figura 23:	Hematócrito de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).....	102
Figura 24:	Valores de hemoglobina de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ....	103
Figura 25:	Hemoglobina corpuscular média (HCM) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).....	104
Figura 26:	Volume corpuscular médio (VCM) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ....	105
Figura 27:	Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).....	106
Figura 28:	Número de leucócitos totais de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ....	107
Figura 29:	Percentual de neutrófilos de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ....	108
Figura 30:	Percentual de linfócitos de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ....	109

- Figura 31: Percentual de monócitos de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 110
- Figura 32: Percentual de eosinófilos de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 111
- Figura 33: Número de plaquetas de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 112
- Figura 34: Amplitude de distribuição das hemácias (red cell distribution width - RDW) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle). ..... 113
- Figura 35: Ensaio do cometa *in vivo* do AMFA após tratamento por 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos e fêmeas.... 114
- Figura 36: Ensaio do cometa *in vivo* do AMFA após tratamento por 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos e fêmeas.... 115
- Figura 37: Ensaio do micronúcleo *in vivo* do AMFA após tratamento por 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos e fêmeas..... 118
- Figura 38: Ensaio antitumoral contra Sarcoma 180 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em camundongos machos. Percentual de inibição do tumor murino Sarcoma 180. .... 119
- Figura 39: Ensaio antitumoral contra Sarcoma 180 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween

80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em camundongos machos..... 120

Figura 40: Ensaio antitumoral contra Walker 256 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos. Percentual de inibição do tumor Walker 256.....123

Figura 41: Ensaio antitumoral contra Walker 256 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos.....124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Representatividade de substâncias derivadas de plantas utilizadas na clínica ou em desenvolvimento .....	38
Tabela 2:	Utilização Etnofarmacológica da Graviola no Brasil e no Mundo.....	50
Tabela 3:	Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> através do método do MTT .....	64
Tabela 4:	Atividade citotóxica do AMFA em células tumorais normais humanas pelo método do MTT .....	79
Tabela 5:	Relatório contendo os dados dos ensaios do teste de toxicidade aguda pelo método Up and Down. ....	81
Tabela 6:	Dados brutos dos experimentos realizados usando o método Up and Down.....	82
Tabela 7:	Resultados estatísticos dos ensaios de toxicidade aguda do AMFA usando o método Up and Down. ....	82
Tabela 8:	Ensaio do micronúcleo <i>in vivo</i> do AMFA após tratamento por 90 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos e fêmeas.....	117
Tabela 9:	Ensaio antitumoral contra Sarcoma 180 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em camundongos machos. Parâmetros bioquímicos dos animais inoculados com Sarcoma 180.....	121
Tabela 10:	Ensaio antitumoral contra Sarcoma 180 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em camundongos machos. Parâmetros hematológicos dos animais inoculados com Sarcoma 180.....	122

Tabela 11:	Ensaio antitumoral contra Walker 256 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos. Parâmetros bioquímicos dos animais inoculados com Walker 256.....	125
Tabela 12:	Ensaio antitumoral contra Walker 256 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos. Parâmetros hematológicos dos animais inoculados com Walker 256.....	126
Tabela 13:	Contagem diferencial dos parâmetros hematológicos dos animais fêmeas do ensaio de toxicidade crônica 90 dias. ....	164
Tabela 14:	Contagem diferencial dos parâmetros hematológicos dos animais machos do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.....	165
Tabela 15:	Parâmetros bioquímicos dos animais fêmeas do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.....	166
Tabela 16:	Parâmetros bioquímicos dos animais machos do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.....	168
Tabela 17:	Parâmetros hematológicos dos animais fêmeas do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.....	170
Tabela 18:	Parâmetros hematológicos dos animais machos do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.....	172

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>26</b>
<b>1.1</b>	<b>TOXICOLOGIA</b>	<b>26</b>
1.1.1	<i>Parâmetros Toxicológicos</i>	26
1.1.2	<i>Classificação dos Estudos de Toxicidade</i>	27
1.1.2.1	Toxicidade Aguda	27
1.1.2.2	Toxicidade Oral de Doses repetidas	28
1.1.2.3	Estudos de Toxicidade reprodutiva	29
1.1.3	<i>Estudos de Mutagenicidade e Genotoxicidade</i>	30
<b>1.2</b>	<b>CÂNCER</b>	<b>31</b>
<b>1.3</b>	<b>PRODUTOS NATURAIS</b>	<b>35</b>
<b>1.4</b>	<b>FITOQUÍMICOS NA QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER</b>	<b>37</b>
<b>1.5</b>	<b>ANNONA MURICATA L.</b>	<b>42</b>
1.5.1	<i>Características Botânicas</i>	43
1.5.1.1	Taxonomia	43
1.5.1.2	Habitat	44
1.5.1.3	Descrição Botânica	44
1.5.2	<i>Usos na Medicina Tradicional</i>	49
1.5.3	<i>Pesquisa Fitoquímica</i>	51
1.5.3.1	<i>As Acetogeninas</i>	52
1.5.4	<i>Principais Ações Farmacológicas</i>	55
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>58</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>58</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>58</b>



<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAIS .....</b>	<b>59</b>
3.1.1	<i>Equipamentos.....</i>	<i>59</i>
3.1.2	<i>Soluções.....</i>	<i>59</i>
3.1.3	<i>Reagentes e Fármacos .....</i>	<i>62</i>
3.1.4	<i>Modelos Biológicos.....</i>	<i>62</i>
<b>3.2</b>	<b>PREPARAÇÃO DO EXTRATO ACETÔNICO das folhas DE <i>ANNONA MURICATA</i> UTILIZADO NOS ENSAIOS .....</b>	<b>65</b>
<b>3.3</b>	<b>ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MTT (3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-YL)-2,5 DIFENILTERTRAZÓLIO BROMETO) .....</b>	<b>66</b>
3.3.1	<i>Análise dos Dados.....</i>	<i>67</i>
<b>3.4</b>	<b>ESTUDO DO PERFIL TOXICOLÓGICO .....</b>	<b>67</b>
3.4.1	<i>Investigação da Toxicidade Oral Aguda do Extrato Acetônico das Folhas de <i>A. muricata</i> (AMFA) Pelo Método Up-and-Down .....</i>	<i>67</i>
3.4.1.1	<i>Análise Estatística .....</i>	<i>68</i>
3.4.2	<i>Investigação da Toxicidade Oral de Doses Repetidas (90 dias) do Extrato Acetônico das Folhas de <i>A. muricata</i> (AMFA).....</i>	<i>68</i>
3.4.2.1	<i>Obtenção das Amostras .....</i>	<i>70</i>
3.4.2.2	<i>Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos.....</i>	<i>70</i>
3.4.2.3	<i>Retirada dos Órgãos e Análises Histológicas.....</i>	<i>71</i>
3.4.2.4	<i>Análises Estatísticas.....</i>	<i>71</i>
<b>3.5</b>	<b>ENSAIO DO COMETA .....</b>	<b>71</b>
<b>3.6</b>	<b>ENSAIO DO MICRONÚCLEO.....</b>	<b>72</b>
<b>3.7</b>	<b>ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VIVO .....</b>	<b>75</b>
3.7.1	<i>Obtenção e Manutenção dos Animais Para Ensaio Antitumoral Contra Sarcoma 180 .....</i>	<i>75</i>
3.7.2	<i>Avaliação do Efeito do AMFA em Camundongos Transplantados com Sarcoma 180 .....</i>	<i>75</i>

3.7.2.1	<i>Procedimento Experimental</i> .....	76
3.7.2.2	<i>Análise Estatística</i> .....	76
3.7.3	<i>Obtenção e Manutenção dos Animais Para Ensaio Contra Carcinossarcoma de Walker 256</i> .....	77
3.7.3.1	<i>Procedimento Experimental</i> .....	77
3.7.3.2	<i>Análise Estatística</i> .....	78
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>79</b>
4.1	<b>ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MTT (3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-YL)-2,5 DIFENILTERTRAZÓLIO BROMETO)</b> .....	<b>79</b>
4.2	<b>TOXICIDADE AGUDA ORAL PELO MÉTODO DO UP AND DOWN</b> .....	<b>80</b>
4.3	<b>TOXICIDADE ORAL DE DOSES REPETIDAS POR 90 DIAS</b> .....	<b>82</b>
4.4	<b>ENSAIO DO COMETA</b> .....	<b>114</b>
4.5	<b>ENSAIO DO MICRONÚCLEO</b> .....	<b>115</b>
4.6	<b>ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VIVO</i></b> .....	<b>119</b>
4.6.1	<i>Avaliação do Efeito do AMFA em Camundongos Transplantados com Sarcoma 180.</i> .....	119
4.6.2	<i>Avaliação do Efeito do AMFA em Ratos Contra o Carcinossarcoma de Walker 256.</i> .....	123
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>127</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>143</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>144</b>
<b>9</b>	<b>ANEXO A</b> .....	<b>164</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TOXICOLOGIA

É a ciência que estuda as intoxicações, os venenos que as produzem, seus sintomas, efeitos, antídotos e métodos de análise. O termo tóxico vem do grego *toxicon*, que quer dizer “flecha envenenada” ([www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind\\_toxicologia.html](http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind_toxicologia.html), acesso em 02/09/2008; BARILE, 2007).

Os principais fatores que influenciam na toxicidade são:

- ✓ Fatores que dependem do sistema biológico: idade, peso corpóreo, temperatura, fatores genéticos, estados nutricionais e patológicos;
- ✓ Quantidade ou concentração do agente tóxico;
- ✓ Estado de dispersão: é importante a forma e o tamanho das partículas;
- ✓ Afinidade pelo tecido ou organismo humano;
- ✓ Solubilidade nos fluídos orgânicos;
- ✓ Sensibilidade do tecido ou organismo humano; ([www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind\\_toxicologia.html](http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind_toxicologia.html), acesso em 02/09/2008).

### 1.1.1 Parâmetros Toxicológicos

- ✓ **Toxicidade aguda** - É aquela produzida por uma única dose, seja por via oral, dérmica, intraperitoneal, subcutânea ou pela inalação dos vapores.
- ✓ **Toxicidade crônica** - É aquela que resulta da exposição contínua a uma substância, sendo que esta não pode causar toxicidade aguda por apresentar-se em baixas concentrações. A toxicidade crônica é mais importante que a toxicidade aguda, pois normalmente ocorre pela contaminação de alimentos ou lentamente no seu ambiente de trabalho.
- ✓ **Veneno** - É todo e qualquer produto natural ou sintético, biologicamente ativo que, introduzido no organismo e absorvido, provoca distúrbios da saúde, inclusive morte, ou, se aplicado sobre tecido vivo é capaz de destruí-lo.
- ✓ **Toxicidade** - É a capacidade de uma substância química produzir lesões, sejam elas físicas, químicas, genéticas ou neuropsíquicas, com repercussões comportamentais.
- ✓ **Intoxicação** - É um estado deletério manifestado pela introdução no organismo de produto potencialmente danoso.

- ✓ **DL<sub>50</sub> (Dose Letal)** - É a dose letal média de um produto puro em mg/Kg do peso do corpo. Esta terminologia pode ser empregada para intoxicação oral, dérmica, subcutânea, intraperitoneal ou inalatória.
- ✓ **Dosagem Diária Aceitável (DDA)** - Quantidade máxima de composto que, ingerida diariamente, durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde.
- ✓ **Efeito Residual** - Tempo de permanência do produto nos tecidos, no solo, ar ou água podendo trazer implicações de ordem toxicológica.
- ✓ **Antídoto** - Toda substância que impede ou inibe a ação de um tóxico.
- ✓ **Toxicidade Recôndita** - É o processo tóxico em que ocorrem lesões, sem manifestações clínicas ([www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind\\_toxicologia.html](http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind_toxicologia.html), acesso em 02/09/2008).

### 1.1.2 Classificação dos Estudos de Toxicidade

#### 1.1.2.1 Toxicidade Aguda

A determinação da toxicidade aguda de uma substância é extremamente importante, principalmente considerando o uso indevido de produtos naturais pela população ([www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind\\_toxicologia.html](http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind_toxicologia.html), acesso em 02/09/2008).

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 do grupo teste 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 aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas. Para a realização do teste da DL<sub>50</sub>, eram empregados mais de 100 animais para cada espécie estudada, normalmente ratos e camundongos, e para cada substância testada (KRYSIK; RYDZYNSKI, 1997; STAMMATI *et al.*, 2005; GUBBELS-VAN HAL *et al.*, 2005).

Depois de muitos anos de debates e discussões, o teste da DL<sub>50</sub> (dose letal mediana) foi finalmente banido das diretrizes que norteiam a avaliação da toxicidade aguda (BOTHAM, 2002). A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos em causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e, apropriadamente,

rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou nocividade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados nestes estudos, como identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação dose-resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas nestas avaliações: indicativos sobre o mecanismo de ação; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico; além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (PURCHASE *et al.*, 1998; BLAAUBOER, 2003; COECKE *et al.*, 2005; PRIETO *et al.*, 2006).

### 1.1.2.2 Toxicidade Oral de Doses repetidas

Os estudos de toxicidade de dose repetida têm como objetivo caracterizar o perfil toxicológico da substância após a administração repetida. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, patologia, histopatologia, além da determinação do nível de efeito não observável - NOEL. Estes estudos podem ter durações menores – *Short-term* - (por exemplo, 14 e 28 dias) ou envolver um período mais extenso de administração da droga – *Long-term* - (por exemplo, 90 dias, 180 dias) (BARLOW *et al.*, 2002; WHO, 2004).

Normalmente são realizados em ratos e cães (às vezes em primata) devido ao extenso conhecimento da fisiologia e patologia dessas espécies, custo e disponibilidade em número de animais saudáveis. Em relação à via de administração, deve sempre ser empregada a via preconizada para uso humano, mas se a absorção por essa via em animais for limitada em relação ao homem, pode ser necessária a administração parenteral. Geralmente três doses são empregadas para demonstrar a relação entre efeitos/doses e para determinar o NOEL (DAYAN, s. d.).

Segundo o guia da Conferência Internacional de Harmonização (CIH), *Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non Rodent Toxicity Testing)* – S4 (ICH, 1997), a *European Medicines Agency* (EMA) e o Japão entendem que seis meses de duração para estudos de toxicidade de doses repetidas são suficientes para a descoberta de potenciais efeitos adversos, mas para o FDA, seis meses não são suficientes. Apesar disso,

há um consenso internacional de que estudos em roedores de seis meses e estudos em não roedores de nove meses são suficientes na maioria dos casos.

O guia da EMEA, específico para Antineoplásicos (EMEA, 1998), recomenda que os estudos de toxicidade de duas a quatro semanas de duração ou um a dois ciclos sejam realizados em duas espécies roedoras, anteriormente à Fase 1 de Pesquisa Clínica. Para fármacos com novo mecanismo de ação devem ser realizados estudos em roedores e não roedores. No caso desses estudos darem suporte a estudos clínicos (Fase 2 e 3) deve-se utilizar uma espécie roedora e uma não roedora e a duração dos estudos de toxicidade deve ter, no mínimo, a mesma duração dos estudos clínicos, embora não mais longa que seis meses.

As regulações de abrangência nacional do Conselho Nacional de Saúde (CNS) 01/88 (BRASIL, 1988) e 251/97 (BRASIL, 1997) divergem das internacionais em relação ao número de espécies a serem utilizadas no estudo. Segundo as nacionais, são necessárias três espécies e, de acordo com as internacionais, de maneira geral, são necessárias duas espécies. Além disso, os estudos devem ser realizados por duas vias de administração. A Resolução de Boas Práticas Clínicas do Grupo Mercado Comum - Nº 129/96 (MERCOSUL, 1996) e a resolução (RE) 90/04 (BRASIL, 2004) estão em acordo com a maioria dos guias internacionais que, para os estudos de toxicidade de doses repetidas recomendam duas espécies, apenas uma via de administração e três níveis de doses a serem utilizados.

### 1.1.2.3 *Estudos de Toxicidade reprodutiva*

As consequências da exposição humana e animal a agentes teratogênicos dependem da extensão, duração, tempo de exposição e das características do agente. Essas consequências podem ser variadas como: problemas relacionados à concepção pela fêmea, aborto, dismorfogênese, nascimento prematuro, baixo peso ao nascimento, mortalidade e morbidade perinatal, disfunção de crescimento e desenvolvimento após o nascimento. Portanto, os estudos não clínicos de toxicidade reprodutiva geram importantes informações sobre o risco da exposição ao medicamento causar danos à reprodução humana (FOLB, s.d.).

A CIH elaborou um guia com orientações específicas para estudos de toxicidade reprodutiva – *Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility S5 (R2)* (ICH, 1993). O documento orienta para que seja utilizada uma espécie de roedor nesses estudos, sendo o rato, a mais indicada na maioria dos casos. Nos estudos de

embriotoxicidade recomenda-se também o coelho como espécie de mamífero não roedor. Segundo o guia, a seleção de doses é um dos pontos mais críticos nos desenhos dos estudos de toxicidade reprodutiva. A escolha da dose alta deve ser baseada nos dados de todos os estudos disponíveis (farmacologia, estudos de toxicidade aguda/ crônica e toxicocinética). A duração do tratamento nos estudos de toxicidade de doses repetidas de duas a quatro semanas é semelhante à duração do tratamento nos vários segmentos dos estudos de toxicidade reprodutiva. Tendo determinado a dose alta, as doses pequenas devem ser selecionadas na sequência descendente e os intervalos entre elas dependem da cinética e de outros aspectos da toxicidade. As vias de administração devem ser similares às aquelas preconizadas para uso humano.

Todos os estudos de toxicidade reprodutiva e genotoxicidade devem ser concluídos anteriormente à inclusão de mulheres, com potencial para engravidar que não estejam utilizando métodos anticonceptivos de alta eficácia ou daquelas em que não há certeza se estão ou não grávidas, em qualquer fase de Pesquisa Clínica. Para a inclusão de mulheres grávidas em Pesquisa Clínica, segundo o guia (ICH, 2000), é necessário que todos os estudos de toxicidade reprodutiva e genotoxicidade estejam concluídos. Geralmente, também são necessários dados de segurança da exposição prévia da droga em humanos.

Segundo consulta realizada nas regulações de abrangência nacional, pôde-se constatar que apenas a resolução de Boas Práticas Clínicas do Grupo Mercado Comum - Resolução Nº 129/96 (MERCOSUL, 1996) evidencia como esses testes devem ser realizados. Segundo a resolução, estudos de embriotoxicidade (principalmente teratogenicidade) e toxicidade peri e pós-natal deverão ser realizados em pelo menos duas espécies, uma das quais deverá ser não roedora. Deverão empregar-se um mínimo de três níveis de doses, sendo que a maior deverá ser subtóxica.

### 1.1.3 Estudos de Mutagenicidade e Genotoxicidade

O DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*) sofre alterações denominadas mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, no processo de divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas das mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras, porém, podem determinar a morte celular e, por consequência, não são, também, detectáveis. Dessa forma, apenas um pequeno número de

mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar vantagens ou um crescimento desordenado das células (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Genotoxicidade pode ser definida como a capacidade de um agente danificar o DNA ou alterar a sequência de DNA de tal maneira que possa causar mutação. Os efeitos mais sérios dessa mutação podem ser neoplasmas (tumor), neoplasmas herdados e defeitos ao nascimento (DORATO; BUCKLEY, 1998). Os chamados agentes mutagênicos são aqueles que alteram a sequência de bases no DNA, provocando a aceleração ou aumentando o aparecimento de mutações, que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Os estudos de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo* desenhados para detectar substâncias que induzem danos genéticos de forma direta ou indireta por vários mecanismos. Esses testes são de curta duração (RIBEIRO; MARQUES, 2003) e possibilitam a identificação do risco com o respectivo dano ao DNA e sua fixação. Fixação do dano ao DNA na forma de mutações genéticas, escala de danos cromossomais, recombinação e mudanças numéricas no cromossomo são geralmente consideradas essenciais para efeitos herdados e o complexo processo de malignidade onde possam ocorrer mudanças genéticas (ICH, 1997).

A Genética Toxicológica avalia os efeitos genotóxicos em potencial, uma vez que são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

A toxicidade genética não é uma medida da carcinogenicidade, mas é frequentemente usada como um indicador para o câncer uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese, havendo associação elevada entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade, tanto em roedores como no homem (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

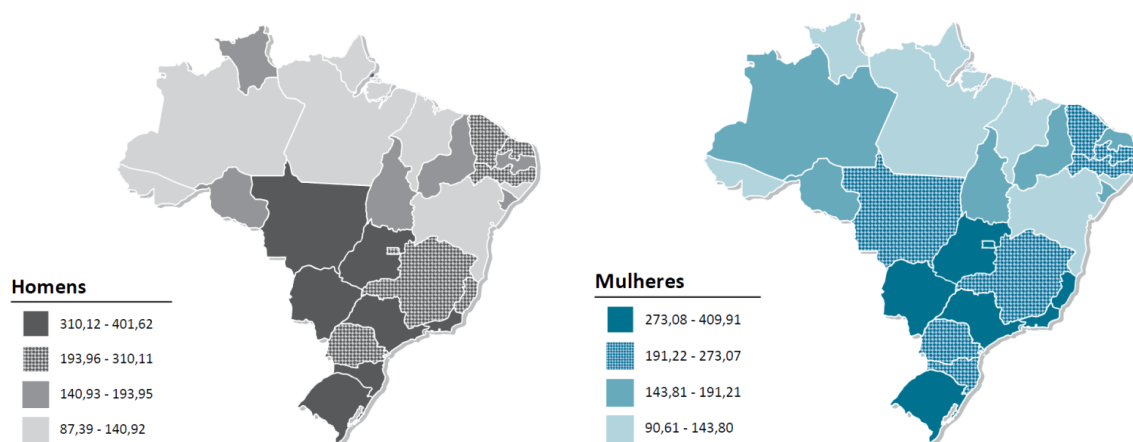
## 1.2 CÂNCER

Câncer é o nome dado ao crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. ([http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322), acesso em 23/08/2012). Existem mais de 100 tipos de câncer, de acordo com o tipo de células, tecido ou órgão em que ocorrem. Geralmente, as células cancerosas levam à formação de uma massa tumoral, podendo essa ser benigna ou maligna (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2008).



O câncer é um enorme problema de saúde mundial, alcançando cada região e nível socioeconômico. Hoje, câncer responde por uma em cada oito mortes no mundo - a tuberculose mais do que o HIV (do inglês, *human immunodeficiency virus*) e malária juntos. O ônus global do câncer está crescendo a um ritmo alarmante, em 2030 sozinho, cerca de 21,4 milhões novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes de câncer são esperados para ocorrer, simplesmente devido ao crescimento e envelhecimento da população (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 (Figura 1), que serão válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. (SILVA, 2012).

Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas). Fonte: SILVA, 2012.



As neoplasias malignas estão intimamente relacionadas a alterações no genoma. O agente carcinógeno quando incide sobre uma célula normal, causa alterações na molécula de DNA. Essas alterações são denominadas de mutação. Qualquer célula normal pode sofrer alterações no seu material genético. As mutações de maior relevância encontradas no câncer tornam o funcionamento dos oncogenes dominante e o dos genes supressores tumorais recessivos. Normalmente essa alteração é reparada, ou então a célula entra em processo de morte. Na verdade, para que a mutação de fato ocorra, é necessário que o DNA alterado seja replicado e passado para as células-filhas. Na carcinogênese, não apenas uma mutação, mas uma série de eventos acumulados ao longo dos anos é

necessária para desencadear esse processo (CORTNER; WOUDE, 1997; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os vários tipos de câncer possuem em comum, além da instabilidade genética, outras alterações celulares intrínsecas: autossuficiência em fatores de crescimento que induzem a proliferação, indutores de neovascularização, potencial replicativo ilimitado, evasão da apoptose, “invisibilidade” à imunovigilância, poder de invasão e metástases, capacidade de reprogramar ou mudar o metabolismo energético da célula (DUNN *et al.*, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Recentemente, também tem sido discutida a importância crucial do microambiente inflamatório tumoral (MIT) no favorecimento da progressão tumoral através do recrutamento e diferenciação subsequente de linfócitos, macrófagos e células dendríticas que podem ser ativamente promotoras tumorais, uma vez que tais células são capazes de induzir angiogênese, proliferação das células tumorais e invasividade (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Inicialmente, na progressão tumoral, por efeito autócrino ou parácrino, as quimiocinas podem estimular o crescimento tão rápido do tumor que a imunovigilância não é capaz de erradicar todas as células alteradas (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Além das citocinas liberadas pelas células inflamatórias, existem também outros componentes do microambiente tumoral que contribuem para o desenvolvimento dos tumores, como células-tronco tumorais, células endoteliais, fibroblastos associados ao tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Células-tronco tumorais são a base da doença; elas iniciam o tumor e conduzem a direção da progressão dos tumores, carregando consigo os oncogenes e mutações supressoras tumorais que definem o câncer como uma doença genética. Muitos tumores são histopatologicamente diferentes, contendo regiões demarcadas por vários graus de diferenciação, proliferação, vascularidade, inflamação e/ou invasividade (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Células-tronco tumorais são definidas operacionalmente por sua capacidade de semear eficientemente novos tumores sob inoculação em camundongos hospedeiros (LOBO *et al.*, 2007; CHO; CLARKE, 2008).

Após a última década, novas vias de sinalização têm sido identificadas e têm sido funcionalmente implicadas no desenvolvimento de angiogênese associada ao tumor e ilustram a complexa regulação de fenótipos de células endoteliais (CARMELIET; JAIN, 2000; AHMED; BICKNELL, 2009; DEJANA *et al.*, 2009; PASQUALE, 2010). Perfis de

expressão de diferentes genes de células endoteliais associadas ao tumor e a identificação de marcadores de superfície celular revelam a diferença das células endoteliais normais e as que são associadas ao tumor (RUOSLAHTI, 2002; NAGY *et al.*, 2010; RUOSLAHTI *et al.*, 2010). Diferenças na sinalização em perfis de transcriptomas e em códigos vasculares “empacotados” serão importantes para o entendimento da conversão de células endoteliais normais em células endoteliais associadas ao tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Fibroblastos associados ao tumor agrupam dois tipos distintos de células: (1) células similares aos fibroblastos que criam o suporte estrutural suportando os tecidos epiteliais mais normais e (2) miofibroblastos, cujo papel biológico e propriedades diferem marcadamente daqueles derivados dos fibroblastos teciduais. São identificados pela expressão da actina de músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA, do inglês,  *$\alpha$ -smooth muscle actin*) e raros na maioria dos tecidos epiteliais saudáveis. Estas células de tecidos sadios, quando são recrutadas e reprogramadas podem permitir o fenótipo tumoral, notadamente a proliferação celular cancerosa, angiogênes, invasão e metástase (DIRAT *et al.*, 2010; PIETRAS; OSTMAN, 2010; RÄSÄNEN; VAHERI, 2010, SHIMODA *et al.*, 2010). Devido à secreção de vários componentes de matriz extracelular, fibroblastos associados ao câncer estão relacionados à formação do estroma desmoplástico que caracteriza muitos carcinomas avançados (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A cirurgia, quimioterapia e radioterapia são estratégias terapêuticas clássicas para o tratamento de pacientes com diferentes tipos de câncer. Hoje se contam muitos casos de sucesso no tratamento de diversos tipos de tumor, mas ainda não se chegou ao fármaco ideal e as terapias existentes nem sempre alcançam resultados satisfatórios, como a remissão de tumores e a prevenção de metástase, além de induzir muitos efeitos colaterais (SALGALLER e LODGE, 1998).

Uma característica comum a grande parte dos quimioterápicos antineoplásicos, dos quais 61% novos são de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2012), é a citotoxicidade, que tem como resultado final, na maioria das vezes, a morte por apoptose das células tumorais. Diferentes alvos, como o DNA, microtúbulos, tubulina, topoisomerase, proteassomo, tirosinas quinase, telomerase, proteínas de checagem do ciclo celular, dentre outros, são capazes de induzir a célula tumoral a entrar em apoptose (BAILLY, 2000; JORDAN, 2002; LOS *et al.*, 2003; KAWABE, 2004; CHASE; CROSS, 2006; HUWILER; ZANGEMEISTER-WITTKKE, 2007).

### 1.3 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS; BOLZANI, 2006). Esses produtos naturais têm se originado de diversas fontes, incluindo um grande número de plantas, animais e microorganismos (NEWMAN; CRAGG, 2012).

A história do Brasil está intimamente ligada ao comércio de produtos naturais (as especiarias), os quais determinaram as várias disputas de posse da nova terra e, por fim, a colonização portuguesa. Do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*) era obtido um corante de cor vermelha, muito utilizado para tingimento de roupas e como tinta de escrever, que já era conhecido e utilizado nas Índias Orientais desde a Idade Média. Do lenho do pau-brasil era extraída a brazilina, um derivado catecólico que facilmente oxidava à brasileína, um fenoldienônico identificado como corante (VIEGAS; BOLZANI, 2006).

Atualmente, novos seres vivos, além das plantas, vêm sendo alvo de exploração para a descoberta de novos produtos naturais com propriedades medicinais, como por exemplo, os animais marinhos, especialmente as esponjas (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade um valor econômico e estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. A intensidade dessa afirmação é facilmente observada quando se analisa o número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (CRAGG *et al.*, 1997; De SMET, 1997; PANDEY, 1998; VERPOORTE, 1998; SHU, 1998; HARVEY, 2000). A terapêutica moderna composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos não teria sido possível sem a

contribuição dos produtos naturais, notadamente das plantas superiores, das toxinas animais e dos microrganismos (VERPOORTE, 1998).

Matos (1988) diz que o estudo químico das plantas pode ser desenvolvido, de modo geral, em seis etapas principais e complementares. São elas:

- ✓ A escolha da planta a ser estudada;
- ✓ A identificação botânica da planta escolhida;
- ✓ A prospecção preliminar de sua composição química;
- ✓ O isolamento e a purificação dos constituintes principais;
- ✓ O esclarecimento da estrutura molecular dos compostos puros e isolados (determinação estrutural);
- ✓ O levantamento das referências bibliográficas sobre a espécie identificada e suas congêneres.

A execução de cada uma destas etapas envolve técnicas adequadas e dificuldades que precisam ser cuidadosamente superadas para que se alcance o objetivo final com êxito (MATOS, 1988).

A pesquisa por novas entidades químicas bioativas (do inglês, *new bioactive chemical entities*-bioNCEs) pelos laboratórios de pesquisa industriais observou a adoção de novas técnicas, como o desenvolvimento de métodos de “screening” biológicos automatizados (“high throughput screening”– HTS), que passaram a permitir a avaliação *in vitro* de milhares de substâncias por experimento. Esta técnica permite a identificação de novos compostos capazes de interagirem com os alvos terapêuticos ensaiados em escala, inicialmente, micromolar e, atualmente, nanomolar. Cabe mencionar que graças ao emprego destas estratégias combinadas surgiu o termo “hit”, definindo uma nova substância identificada pelo emprego destas estratégias, ou seja, ativa *in vitro* sobre um alvo determinado, na escala indicada (VIEGAS *et al.*, 2006).

Graças aos produtos naturais, incluindo as toxinas extraídas de animais, de bactérias, de fungos, de plantas ou organismos marinhos, os cientistas puderam compreender fenômenos complexos relacionados à biologia celular e molecular e a eletrofisiologia, permitindo que enzimas, receptores (como exemplo, receptores nicotínicos), canais iônicos e outras estruturas biológicas fossem identificados, isolados e clonados. Isso possibilitou à indústria farmacêutica desenhar drogas dotadas de maior seletividade e também mais eficazes contra várias patologias de maior complexidade. Além disso, os produtos naturais são usados como matéria prima na síntese de moléculas complexas de

interesse farmacológico. Atualmente, as maiores indústrias farmacêuticas mundiais possuem programas de pesquisa na área de produtos naturais, pois oferecem vantagens como: grande quantidade de estruturas químicas, muitas delas, complexas; muitas classes de estruturas homólogas; estruturas químicas bi e tridimensionais; possibilidade de utilização como banco de moléculas para ensaios de alta velocidade; economia de tempo e recursos; fonte de pequenas moléculas para alvos moleculares complexos e, mais importante, capazes de serem absorvidas e metabolizadas pelo organismo (SHU, 1998; CAVALCANTI *et al.*, 2007).

Existem, todavia, problemas que dificultam o aproveitamento da biodiversidade para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os principais são: falta de leis específicas para o acesso a biodiversidade; grande complexidade das moléculas isoladas a partir de produtos naturais, que às vezes dificulta sua síntese; o tempo necessário para o descobrimento de moléculas líderes às vezes é longo; a descoberta pode ser dispendiosa; poucas bibliotecas de compostos naturais estão disponíveis; existem poucas informações com relação à estrutura-atividade desses compostos; frequentemente, moléculas já conhecidas com pouco interesse, são isoladas de produtos naturais; os químicos sintéticos muitas vezes são relutantes em trabalhar com produtos naturais (STROBL, 2000).

#### **1.4 FITOQUÍMICOS NA QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER**

Nos últimos anos, a aplicação da quimioterapia tem conseguido êxitos notáveis na cura de algumas formas de cânceres disseminados tais como a leucemia aguda infantil, distintos tipos de linfomas, e alguns tipos de tumores sólidos, em especial os derivados de células germinais. Ao contrário, a melhora no tratamento sistêmico de tumores sólidos mais freqüentes em adultos (pulmão, mama, cólon e pâncreas) não sofreu grandes avanços, resultando em altos índices de mortalidade dentre os pacientes. Há, portanto, uma clara e urgente necessidade de identificar, avaliar e desenvolver novos e mais eficientes fármacos para o tratamento de tais cânceres (BEIRA, 2000).

O atual interesse na busca de novos agentes antimitóticos, por exemplo, é consequência de sua importância para o tratamento de diferentes formas de tumores malignos. Esforços contínuos do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (do inglês, *National Cancer Institute*-NCI) têm sido feitos ao longo de quase quarenta anos buscando novos agentes antitumorais de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2012). Muitas drogas correntemente em uso na terapia do câncer foram descobertas de forma racional, baseada no desenho da estrutura, e muitas outras têm sido descobertas por processos

empíricos. A avaliação da atividade antineoplásica dessas drogas, através de programas de prospecção começou com a mostarda nitrogenada em 1940 e hoje existem mais de 100 drogas anticâncer viáveis sendo utilizadas na terapia do câncer (Tabela 1). Uma proporção importante dos fármacos antitumorais atualmente utilizados em clínica são produtos naturais derivados de plantas e microrganismos. A utilização por Farber, em 1954, de um antibiótico extraído do cultivo de uma espécie de *Streptomyces*, a Actinomicina D, para tratar um paciente com tumor de Wilms metastático, introduziu, no tratamento de câncer, o primeiro fármaco antineoplásico derivado de produtos naturais, despertando grande interesse no meio científico nessa área de pesquisa, o qual perdura até hoje.

Tabela 1: Representatividade de substâncias derivadas de plantas utilizadas na clínica ou em desenvolvimento (Modificado de Schwartzmann *et al.*, 2002).

Classe do Fármaco	Exemplo	Planta
Alcalóides da Vinca	Vimblastina, vincristina, vinorelbina e vindesina	<i>Catharanthus roseus</i>
Epipodofilotoxinas	Etoposídeo e tenoposídeo	<i>Podophyllum peltatum</i>
Taxanos	Paclitaxel e docetaxel	<i>Taxus brevifolia</i>
Camptotecinas	Topotecana, irinotecana e rubitecana	<i>Camptotheca accuminata</i>
Cefalataxanas	Homoharringtonina	<i>Cephalataxus harringtonia</i>
Flavonas	Flavopiridol (sintético baseado no rohitukine)	<i>Dysoxylum binectariferum</i>
Estilbenos	Combrestatina (pró-droga)	<i>Combretum caffrum</i>
Naftaquinona	Lapachol e $\beta$ -Lapachona	<i>Tabebuia impetiginosa</i>

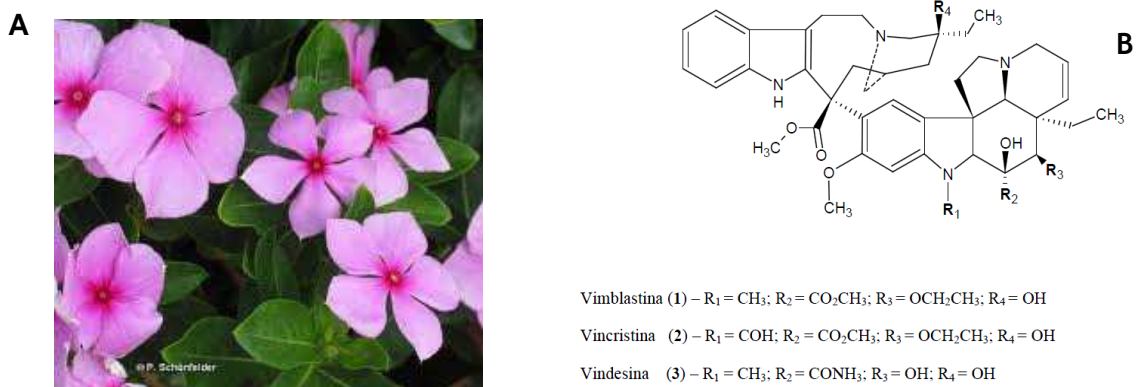
As estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos têm mudado ao longo dos anos. Os programas de prospecção começaram no início dos anos 50 no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, e consistiam em testes de novos compostos, principalmente produtos naturais, em camundongos inoculados com leucemias L1210 e P388. Esse modelo foi bastante questionado, uma vez que não era considerado representativo dos tumores humanos, na sua maioria sólidos (SCHWARTSMANN; WORKMAN, 1993). Sendo assim, o modelo foi reconsiderado e, atualmente, os programas de prospecção incluem uma etapa inicial de testes *in vitro* em linhagens tumorais humanas utilizando técnicas automatizadas (*High Throughput Screening* - HTS). O desenvolvimento das chamadas técnicas automatizadas acelerou a pesquisa de novas drogas anticâncer, levando a uma grande demanda por bibliotecas de novas e promissoras moléculas, tendo como objetivo maior identificar drogas mais seletivas para células tumorais e que tenham pouco ou nenhum

efeito sobre as células normais (NEWMAN; CRAGG, 2012). Com o melhor entendimento das diferenças genéticas entre essas células, têm sido utilizadas melhores estratégias nessa identificação. Podemos destacar como novos alvos para a terapia do câncer as proteínas de controle do ciclo celular e seus pontos de checagem, os fatores de crescimento, as proteínas motoras, os microtúbulos, e enzimas como as topoisomerase I e II, dentre outros (BAGULAEY & KERR, 1997).

É importante ressaltar que as plantas têm uma longa história de uso no tratamento do câncer (HARTWELL, 1982). Embora muitas das suposições quanto à eficácia possam ser vistas com certo ceticismo porque o câncer, como uma doença específica, é pouco definido em termos de medicina tradicional (CRAGG *et al.*, 1994). De acordo com Newman e colaboradores (2012), 60% das drogas utilizadas atualmente na quimioterapia do câncer são de origem natural, incluindo plantas e microorganismos. De fato, o melhor impacto de compostos isolados de plantas é percebido nesta área da terapêutica. A Tabela 01 resume as principais classes de compostos oriundos de plantas atualmente utilizados na quimioterapia do câncer.

Dentre os quimioterápicos para o câncer, a vimblastina e a vincristina (Figura 2B), extraídas de *Catharanthus roseus* (Figura 2A), o etoposídeo, o teniposídeo e o paclitaxel são importantes fármacos introduzidos na terapêutica nos últimos 20 anos, fundamentais para o renascimento do interesse nos produtos naturais por parte da indústria farmacêutica (VIEGAS; BOLZANI, 2006).

Figura 2: Imagem representativa de *Catharanthus roseus* e estruturas químicas moleculares isoladas



(A) *Catharanthus roseus* e (B) estruturas químicas da vimblastina (1), vincristina (2), vindesina (3).



No campo dos agentes antineoplásicos, as descobertas da camptotecina e do paclitaxel têm muito mais em comum do que apenas seu uso terapêutico, pois ambos os fármacos foram descobertos no mesmo grupo de pesquisa. Em 1966, Wall, Wani e colaboradores relataram, pela primeira vez, o isolamento da camptotecina a partir de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata* (WALL *et al.*, 1966; OBERLIES *et al.*, 2004).

Quase 20 anos depois, o único mecanismo de ação identificado para este potente agente citotóxico foi a inibição da topoisomerase I no DNA. Apesar disso, esta substância não se mostrou adequada para desenvolvimento farmacêutico, principalmente por sua reduzida solubilidade. Estudos mais recentes envolvendo a triagem clínica de seu sal sódico não foram bem sucedidos, pois evidenciou-se que a abertura do anel lactônico para preparação do sal sódico inativa a substância. Esta descoberta abriu caminho para a primeira geração de fármacos análogos da camptotecina, como o topotecan (Hycantina®) e o irinotecan (CPT-11, Camptosar®), ambos solúveis em água, na forma de sais, preparados preservando a subunidade iridídica farmacofórica, representada pelo anel lactônico hidroxilado, devido à introdução de grupos básicos em suas estruturas (MONTANARI; BOLZANI, 2001; OBERLIES *et al.*, 2004).

Em 1962, época em que o grupo de Wall pesquisava a atividade citotóxica de *C. acuminata*, o *National Cancer Institute* (NCI) dos EUA, selecionou o extrato das cascas de “Yew tree” (*Taxus brevifolia*) para avaliação de sua eventual atividade antitumoral. Entretanto, nos modelos *in vivo* utilizados pelo NCI, este extrato não foi muito ativo. Por outro lado, Wall havia observado uma forte correlação entre a atividade citotóxica *in vitro* em células 9KB e a atividade anticâncer *in vivo*, o que estimulou seu grupo a prosseguir um estudo de fracionamento bioorientado, que resultou no isolamento do paclitaxel em 1966 (OBERLIES *et al.*, 2004).

Entre 1967 e 1971, o taxol foi identificado e reisolado das cascas de *T. brevifolia*. Durante os primeiros estudos sobre sua potencialidade como um novo agente antineoplásico, foi questionada a viabilidade de seu futuro emprego face à complexidade de sua estrutura e à relativa escassez da fonte natural (WALL *et al.*, 1998). Por exemplo, para se extrair 1 kg de taxol, precisasse de 10 T de cascas de *T. brevifolia*, o que representa cerca 3000 árvores (VIEGAS; BOLZANI, 2006). Entre 1985 e 1995, estes dados e a forte pressão de militantes ambientalistas, além da restrição imposta pelo *Forest Service Bureau of Land Management* (EUA) para o acesso à planta, motivaram intensos esforços no sentido de se encontrar fontes naturais alternativas para o taxol. O insucesso nestas iniciativas culminou quando, em 1994, a Bristol-Myers Squibb decidiu interromper o uso das cascas de *T.*

*brevifolia* (WALL *et al.*, 1998). Por volta de 1981, surgiram os primeiros relatos de outros taxanos de origem natural, como a bacatina III e a 10-desacetilbacatina III, encontrados em outras espécies de *Taxus*, em uma concentração muito superior àquela do taxol. Particularmente, a 10-desacetil-bacatina III pôde ser obtida em rendimento de 0,1% a partir das folhas de *T. baccata* cultivada, o que representou um rendimento 5 vezes superior ao do taxol (WALL *et al.*, 1998; VIEGAS; BOLZANI, 2006). *T. wallichiana*, um teixo himalaio, também demonstrou ser outra fonte promissora do taxano. Mais recentemente, um grupo da *Montana State University* (EUA) relatou a obtenção do taxol e da bacatina III a partir de espécies de fungos endofíticos.

Todo o sucesso na utilização dos taxanos e dos alcalóides da vinca na terapia anticâncer tem estimulado intensamente a busca por novos agentes com atividade antimetabólica (KARJALA *et al.*, 2005). Existe um potencial extraordinário para a descoberta de novas drogas anticâncer de ocorrência natural, em função da existência de um grande número de espécies disponíveis para investigação. Na realidade, uma grande quantidade de moléculas com atividade antineoplásica derivadas de organismos marinhos, microorganismos e de plantas ainda pode ser descoberta (ZHANG, 2002; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). Além disso, a descoberta de novos alvos terapêuticos no câncer amplia a possibilidade da descoberta de novas moléculas com potencial anticâncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Nas últimas décadas os microorganismos (MOs) estão recebendo atenção especial por parte da indústria e dos pesquisadores em produtos naturais. Os avanços obtidos no campo da biotecnologia, aliado ao emprego de técnicas modernas de fracionamento químico, elucidação estrutural e *screening* na busca por novos protótipos bioativos, têm revelado seu enorme potencial (bactérias, fungos e leveduras) em fornecerem novas entidades químicas (do inglês, *new chemical entities* NCEs) ativas e com padrões moleculares novos e originais (VIEGAS *et al.*, 2006).

Nesse contexto, o Brasil tem uma área de 8,5 milhões km<sup>2</sup> e possui várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido no Norte, o semi-árido no Nordeste e áreas temperadas no Sul. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas formando zonas biogeográficas distintas chamadas biomas. Dos diversos biomas brasileiros (Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga, Manguezal, etc.), estima-se que existam cerca de 60 mil espécies vegetais (FARNSWORTH & SOEJARTO, 1991). Segundo Kato (2001), o Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo, contando com 20% do número total de espécies do planeta, sendo que muitas dessas espécies são

endêmicas. A composição total da biodiversidade brasileira não é conhecida e talvez nunca venha a ser, tal a sua magnitude e complexidade.

A mega biodiversidade do Brasil por si justifica o enorme potencial para a descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais. Além disso, vários estudos realizados pelo Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LabNOE) vêm a comprovar esse potencial no que diz respeito à atividade antitumoral (FÁVARO *et al.*, 1990; MORAES *et al.*, 1997; BOLZANI *et al.*, 1999; LEYVA *et al.*, 2000; MANS *et al.*, 2000; PESSOA, *et al.*, 2000; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002a; 2002b; 2003; 2004a; 2004b; VERAS *et al.*, 2004; PESSOA *et al.*, 2006).

O Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LabNOE) enfoca suas atividades não só nas moléculas com potencial antitumoral, mas também nas reações tóxicas que essas moléculas provocam no organismo (CAVALCATI *et al.*, 2006), gerando assim conhecimentos necessários para a geração de estudos mais aprofundados em humanos. Os estudos com humanos são realizados na Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC), que trabalha em conjunto com o LabNOE. O estudo desenvolvido por Bezerra *et al.* (2006) é um exemplo bem nítido deste aprofundamento de estudos no campo da toxicologia realizado no LabNOE.

Outra frente de pesquisa do LabNOE é o desenvolvimento de modelos experimentais em animais para a pesquisa de moléculas com atividade antitumoral bucal. O modelo desenvolvido pelo laboratório utiliza o carcinossarcoma de Walker, originando assim uma nova abordagem para investigação do potencial antitumoral, com ênfase em câncer bucal (ALVES *et al.*, 2004).

## 1.5 ANNONA MURICATA L.

A família Annonaceae compreende grande número de espécies e gêneros dos quais apenas três, *Annona*, *Rollinia* e *Duguetia*, produzem frutos comestíveis. A maioria é nativa das regiões tropicais ou subtropicais, como Ásia, África e América. O gênero *Annona* é o mais importante com mais de 50 espécies, muitas dessas são interesse como frutíferas comerciais (JOLY, 1979; CRAVEIRO *et al.* 1981; CRANE; CAMPBELL, 1990; MOSCA, *et al.*, 2006).

A família *Annonaceae* é composta por aproximadamente 120 gêneros, dos quais, 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, Areticum, 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 (BRANCH; SILVA, 1983; FEO, 1992; ANTOUN, *et al.*, 1993; MORS, *et al.*, 2000; <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?3492>).

Várias anonáceas são bem conhecidas no Nordeste brasileiro. Ata (*Annona squamosa*) e Graviola (*Annona muricata*) são muito cultivadas por seus frutos. Os araticuns (*Annona spp*) e Embiribas (*Xylopia spp*) são encontrados nas matas. Seus frutos são comestíveis, no primeiro caso, e medicinais, afamados como estomáquicos, no segundo. Pelo menos dois óleos essenciais de plantas da família Annonaceae têm importância comercial, usados principalmente na perfumaria (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

### 1.5.1 Características Botânicas

#### 1.5.1.1 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)

### 1.5.1.2 *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).

### 1.5.1.3 *Descrição Botânica*

A gravioleira (Figura 3) 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 página superior e verde-amarelada na página inferior, medindo de 5 a 18 cm de comprimento por 2 a 7 cm de largura, quando adultas. As flores no estágio de “capulho” tem um formato subgloboso ou piramidal, são hermafroditas, grandes, solitárias, actinomorfas, diclamídeas, com cheiro forte, de cor verde-escura 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 com 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 4) (MANICA, 1997; MOSCA, *et al.*, 2006).

Possuem gineceu apocárpico, estames livres e numerosos, distribuídos espiraladamente em torno do receptáculo floral e polinização realizada predominantemente por besouros (GOTTSBERGER, 1970; *apud* FAEGRI & PIJL, 1980; VIDAL HERNÁNDEZ, 1993, MOSCA, *et al.*, 2006).

Figura 3: *Annona muricata* L.



Fonte: [http://www.rarexoticseeds.com/Fruits/Graines\\_Annona\\_Muricata\\_Seeds\\_Soursop\\_Corosollier](http://www.rarexoticseeds.com/Fruits/Graines_Annona_Muricata_Seeds_Soursop_Corosollier)  
Acesso em 18 de setembro de 2010.

Figura 4: Folhas, flor e frutos da *Annona muricata* L. (Graviola).



Fonte: [www.qsbg.org/IMAGES/Plans/May/ann\\_mur.jpg](http://www.qsbg.org/IMAGES/Plans/May/ann_mur.jpg) e <http://jangadeiroonline.com.br/uploads/2010/02/1266415440graviola.jpg>. Acesso em 18 de setembro de 2010.

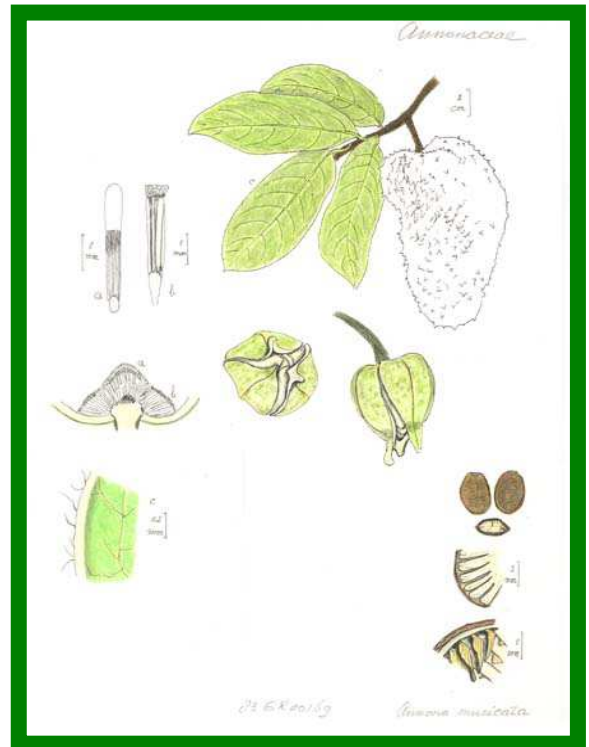
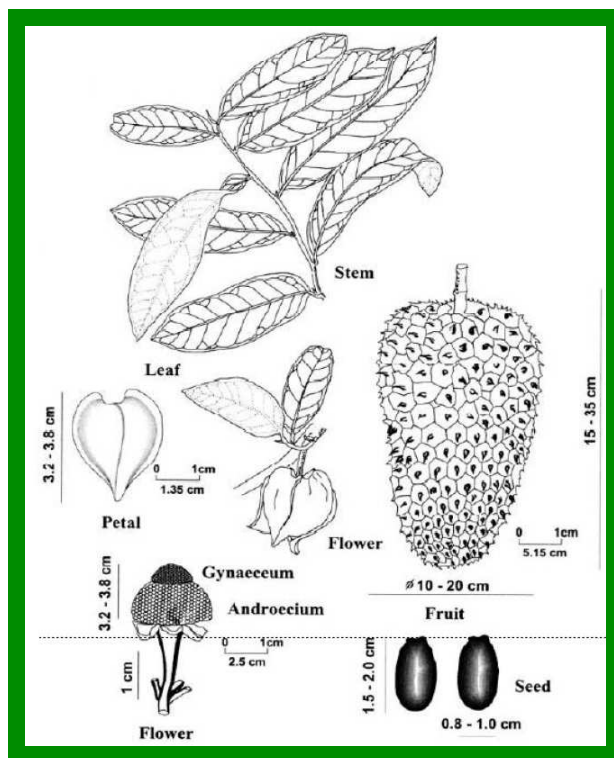
O fruto é uma baga composta, frutos múltiplos ou sincarpo, carnosos, grande, ovóide ou cordado-oblongo, podendo ter até 30 cm de comprimento por 20 cm de diâmetro, chegando a pesar 10 kg ou mais (Figura 4 e Figura 5). A casca é delgada, de aparência reticulada de coloração verde-escura, quando o fruto 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 (FALCÃO *et al.*, 1982; MOSCA *et al.*, 2006).

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).



Figura 5: Desenho esquemático dos ramos, folhas, frutos e sementes (fotos) da *Annona muricata* L. (Graviola).



Fontes: Fotos e desenhos:

<http://botgard.bio.uu.nl/seedlist/Images/Annona%20muricata%2083GR00169.jpg>;

[http://content6.eol.org/content/2009/04/20/22/28822\\_large.jpg](http://content6.eol.org/content/2009/04/20/22/28822_large.jpg);

<http://www.reservaecocerradobrasil.org/>; Acesso em 25 de setembro de 2010.

### 1.5.2 Usos 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 gravioleira 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. A casca e as raízes são consideradas sedativas, antiespasmódicos, hipotensivos, antitumorais e para os nervos. As raízes, a casca 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 da espécie *Annona muricata* no Brasil e no mundo está relacionada na Tabela 2.

Tabela 2: Utilização Etnofarmacológica da Graviola no Brasil e no Mundo.

PAÍS	USO ETNOFARMACOLÓGICO
<b>Brasil</b>	Analgésico, Antihelmíntico, Antiespasmódico, Adstringente, Broncodilatador, Calmante, Antitussígeno, Hipoglicemiante, Antidiarréico, Antiinflamatório, Emético, Antitérmico, Hepatoprotetor, Antinevrálgico, Antiparasitário e Antirreumático.
<b>Caribe</b>	Antiespasmódico, Antitérmico, Antigripal, Digestivo, Ansiolítico, Sedativo, Ectoparasiticida, Antiasmático, Antidiarréico, Antihipertensivo, 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, Broncodilatador, Diurético, Antitérmico, Cardiotônico, Antihipertensivo, Galactagogo, Parasiticida, Sedativo e Vermífugo.
<b>Malásia</b>	Adstringente, furúnculo, Antitussígeno, Antidiarréico, Antifúngico, Antihipertensivo, Antirreumático, Hemostático.
<b>México</b>	Adstringente, Antidiarréico, Antitérmico, Expectorante, Antifúngico nas Dermatomicoses e Antiescorbútico.
<b>Panamá</b>	Antihelmíntico, Antidiarréico, Antiácido, Diurético, Pesticida, Gastroprotetor e Vermífugo.
<b>Peru</b>	Parasiticida, Antiespasmódico, Antiinflamatório, Hipoglicemiante, Antidiarréico, Antitérmico, Antihipertensivo, Digestivo, Inseticida, Ectoparasiticida, Gastroprotetor e Sedativo.
<b>Trinidad</b>	Depurativo, Estimulante, Antigripal, Galactagogo, Antihipertensivo 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, Antiescorbútico, Sedativo, Digestivo, Gastroprotetor e Tranquilizante.

Fonte: Adaptado de *The Healing Power of Rainforest Herbs* by Leslie Taylor, 2005.

A pesquisa etnofarmacológica do uso da graviola na medicina tradicional evidenciou que, em geral, o fruto e seu suco são utilizados em casos de infestações por vermes e

parasitas, para amenizar febres, como estimulante da lactação e como adstringente para diarreia e disenteria. As sementes esmagadas são utilizadas contra parasitas intestinais, ectoparasitas e dermatomicoses. As cascas, folhas e raízes são utilizadas na forma de chá como anti-helmíntica, antipirética, sedativa, antiespasmódica, hipotensora, hipoglicemiante, anticonvulsivante e digestiva (EISENBERG *et al.*, 1993; MORS *et al.*, 2000; ADEYEMI *et al.*, 2009).

### 1.5.3 Pesquisa Fitoquímica

A *Annona muricata* L. possui frutos ricos em carboidratos com baixíssimos teores de gorduras, e não é considerado 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 %; 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).

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 graviola produz um grupo de fitoquímicos bioativos como os alcalóides, compostos fenólicos, óleos essenciais, flavonóides, terpenos e acetogeninas (PONTES *et al.*, 2004). Destacam-se estas últimas que estão presentes nas folhas, na casca do caule e nas sementes e são exclusivas do gênero (PAULL, 1983; CASTRO *et al.*, 1984; MORTON, 1987; ZENG *et al.*, 1996b; FERAS *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2002; SACRAMENTO *et al.*, 2003). Outros constituintes do fruto da gravioleira são ácidos cítrico, oxálico, caféico, cumárico, esteárico, linoléico, málico,  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e ácido oléico; anonol, campesterol, citrulina, dextrose, etanol, fitosteróis ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol), frutose, ipuranol, manganês, leucoantocianinas, sacarose, taninos. Os níveis de ácidos málico do fruto da *Annona muricata* L., aumenta sete vezes durante a maturação em relação ao valor inicial, sugerindo ser o maior contribuinte para o sabor ácido do fruto.

Muitas mudanças metabólicas que ocorrem nos tecidos dos frutos são atribuídas à atividade de enzimas, entre as quais a peroxidase que estão relacionadas com o metabolismo de produtos de reação ante o dano celular e de adaptação a fatores externos (PAULL *et al.*, 1983; MOSCA, *et al.*, 1997; MOSCA, *et al.*, 2006).

### 1.5.3.1 As Acetogeninas

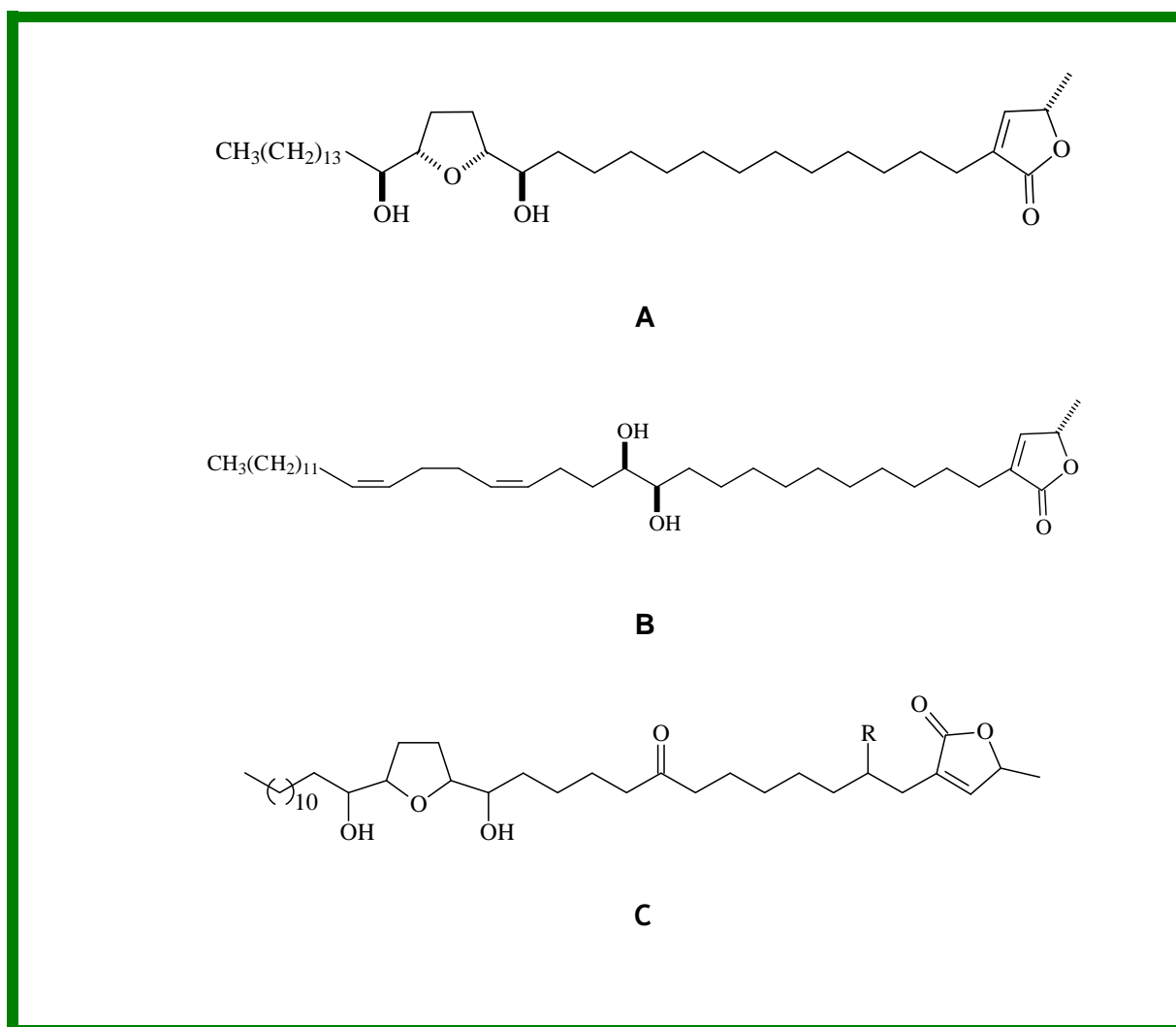
A maioria dos estudos da fitoquímica de Annonaceae não se concentra mais nos alcalóides, mas numa nova classe de compostos extremamente bioativos que são referidos como acetogeninas anonáceas (RUPPRETCH *et al.*, 1990; FANG *et al.*, 1993).

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.*, 1999; BERMEJO *et al.*, 2005; LEITE, 2009).

A primeira acetogenina isolada foi a uvaricina (Figura 6A), 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 quimioterápico-resistentes (JOLAD *et al.*, 1982; WRIGHT, 2005).

Já foram descritas mais de 400 acetogeninas (Figura 6B e 6C), isoladas de sementes, frutos, caules e folhas da planta e muitas delas com suas estruturas químicas estabelecidas (ESPOSTI *et al.*, 1994; LANDOLT *et al.*, 1995; HOPP *et al.*, 1996; OBERLIES *et al.*, 1997; GLEYE *et al.*, 1998; ALALI *et al.*, 1999; CHANG; WU, 2001; CHIH *et al.*, 2001; GONZÁLES-COLOMA *et al.*, 2002; LIAW *et al.*, 2002; CHIU *et al.*, 2003; BERMEJO *et al.*, 2005; ARROYO *et al.*, 2005; LIAW *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2008; KOJIMA; TANAKA, 2009).

Figura 6: Acetogeninas isoladas da família Annonaceae



(A): *cis-uvaramicina I* (ALALI, *et al.*, 1999); (B): *montecristina* (ALALI, *et al.*, 1999); (C): R=H, *corrossolona*; R=OH, *annonacinona* (VILA-NOVA *et al.*; 2011).

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. Elas são classificadas 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:

- ✓ E, todos os casos, as acetogeninas do tipo bis-THF com anéis adjacentes são as mais potentes, seguidas em ordem decrescente de atividade pelas bis-THF não adjacentes, pelas mono-THF e, por último, aquelas que não possuem anéis THF.
- ✓ 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.

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. Shimada *et al.* (1998a; 1998b) e Miyoshi *et al.* (1998) usaram membranas lipossomais e partículas vesiculares submitocondriais, respectivamente, para 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 tetrahidrofuranos ou tetrahidropiranos. Shimada *et al.* (1998a; 1998b) 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 na 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).

#### 1.5.4 Principais Ações 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 antisséptica e também é empregado na regeneração de ferimentos e queimaduras (ALONSO, 1998).
- ✓ **FUNGICIDA:** o chá das folhas apresenta atividade contra *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. 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 (SNC):** 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 (LOPEZ, 1979; OBERLIES *et al.*, 1995; OBERLIES *et al.*, 1997; LIAW *et al.*, 2002; 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 (FEO, 1992; ADEWOLE & OJEWOLE, 2009; ADEYEMI *et al.*, 2009; LUNA, 2009).

Com intuito de esclarecer os efeitos farmacológicos da planta e sugerí-la como possível fitoterápico, realizamos o teste de toxicidade aguda, toxicidade subcrônica e toxicidade crônica pela determinação da dose letal para 50% dos animais (DL<sub>50</sub>) do extrato acetônico das folhas bruto por via oral em camundongos e ratos, 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.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- ✓ Estabelecer o perfil toxicológico do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. e seu potencial antitumoral.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Avaliar o possível efeito citotóxico do AMFA para HL-60 (leucemia promielocítica); K-562 (leucemia mielocítica crônica); SF-295 e SNB-19 (glioblastoma); HCT-116, HCT-8 (côlon), PC-3 e PC-3M (próstata); OVCAR-8 (ovário); MCF-7 e MDA-MB-231 (mama), MDA-MB-435 e MALME-3 (melanoma) e linfócitos humanos.
- ✓ Determinar a DL<sub>50</sub> do AMFA pela metodologia do Up and Down;
- ✓ Analisar os efeitos toxicológicos de doses repetidas do AMFA *in vivo*;
- ✓ Identificar possíveis alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos após administração oral de doses repetidas do AMFA;
- ✓ Verificar a possível ação genotóxica do AMFA;
- ✓ Determinar a ação inibidora do crescimento tumoral em modelos experimentais com roedores do AMFA.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Equipamentos

- ✓ Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2<sup>®</sup>.
- ✓ Agitador de tubo, Donner AD 8850<sup>®</sup>.
- ✓ Banho-maria, DELTA 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>.
- ✓ Instant-Pro<sup>®</sup> - New Prov<sup>®</sup>
- ✓ Labquest<sup>®</sup>
- ✓ Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070<sup>®</sup>.
- ✓ Microondas, Panasonic<sup>®</sup>.
- ✓ Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/ PZO-Labimex Modelo Studar lab<sup>®</sup>.
- ✓ Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot<sup>®</sup>.
- ✓ Microscópio de fluorescência.
- ✓ Microscópio Olympus<sup>®</sup> CX41<sup>®</sup>
- ✓ Micrótomo, SLEE Mainz<sup>®</sup>.
- ✓ PHmetro, Micronal B474<sup>®</sup>.
- ✓ Pipetas automáticas, Gilson<sup>®</sup>.
- ✓ Sistema de Eletroforese Horizontak mini Submarine, Amershan Bioscience<sup>®</sup>.
- ✓ Symex<sup>®</sup> KX-21N - Roche<sup>®</sup>

##### 3.1.2 Soluções

- ✓ Agarose 1%
  - 0,5 g de agarose (FMC-Bioproducts<sup>®</sup>)

- Água deionizada q.s.p. 50 mL
- ✓ Agarose LMP 1,5%
  - 1,5 g de agarose (Gibco®)
  - PBS q.s.p 100 mL
- ✓ Agarose NMP 0,5% (Gibco®)
  - 0,5 g de agarose (Gibco®)
  - PBS q.s.p 100 mL
- ✓ Azul de Tripán 10% (Vetec®)
  - 10 mg de azul de tripan
  - PBS q.s.p. 100 mL de solução
- ✓ Brometo de Etídio 100 µg/mL(Sigma®)
  - 1 mg de brometo de etídio
  - PBS q.s.p. 10 mL de solução
- ✓ Eosina 0,5% (Doles®)
  - 0,5 g de Eosina (Doles®)
  - 80 mL de álcool etílico
  - 0,5 mL de ácido acético
  - Água deionizada q.s.p 20 mL
- ✓ Formaldeído 10% (Dinâmica®)
  - 100 mL de formaldeído (Dinâmica®)
  - Água deionizada q.s.p. 1L
- ✓ Hematoxilina 0,1% (Doles®)
  - 0,5 g de hematoxilina (Doles®)
  - 10 mL de Glicerina (Labsynth®)
  - 25 g de sulfato de alumínio (Labsynth®)
  - 0,1 g de iodeto de potássio (Labsynth®)
  - Água destilada q.s.p. 500 mL solução
- ✓ MTT (Sigma®)
  - 20 mg de MTT (Sigma®)
  - PBS q.s.p. 100 mL solução
- ✓ Solução fisiológica Ringer-lactato (Laboratórios Biosintética®)
- ✓ Solução de eletroforese
  - EDTA 1 mM, NaOH 300 mM pH>13
- ✓ Solução de lise

- NaCl 2,5 M
- EDTA 100 mM
- Tampão Tris 10 mM
- N-Lauroylsarcosine 1% pH 10
- Triton X-100 1%
- DMSO 10%
- ✓ Solução de neutralização
  - Tampão Tris 0,4 M pH 7,5
- ✓ 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
- ✓ Tampão de corrida 50 X (TAE)
  - 242 g Tris
  - 57,1 mL ácido acético glacial
  - 100 mL EDTA 0,5 M
- ✓ Tampão fosfato de sódio (PBS)
  - 8,766 g cloreto de sódio (Labsynth<sup>®</sup>)
  - 2,14 g NaHPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Labsynth<sup>®</sup>)
  - 0,276 g NaHPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Labsynth<sup>®</sup>)
  - Água destilada q.s.p. 1L solução (pH 7,2)
- ✓ Tampão Tris (TBS) 10 X
  - Cloreto de sódio 1,5 M (Labsynth<sup>®</sup>)
  - Tris 0,5 M pH 7,6
  - Água destilada q.s.p.
- ✓ 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

### 3.1.3 Reagentes e Fármacos

- ✓ Ácido acético glacial (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Ácido clorídrico (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Álcool etílico (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Corante de Leishman (Cinética<sup>®</sup>)
- ✓ Cloreto de cálcio (Labsynth<sup>®</sup>)
- ✓ Cloreto de sódio (Labsynth<sup>®</sup>)
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO) (VETEC<sup>®</sup>)
- ✓ Doxorrubicina-fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Ciclofosfamida (Genuxal<sup>®</sup> da Asta Medica)-fornecida pelo Dr. Victor Hugo.
- ✓ EDTA (do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic acid*)(Qeel<sup>®</sup>)
- ✓ Estreptomicina 10 mg/mL (Cultilab<sup>®</sup>)
- ✓ Ficoll (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Fitohemaglutinina (Sigma<sup>®</sup>)
- ✓ Heparina sódica
- ✓ Hidróxido de sódio (VETEC<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 (Isofar<sup>®</sup>)
- ✓ Kits Labtest<sup>®</sup>

### 3.1.4 Modelos Biológicos

- ✓ Camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* e ratos (*Ratus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, de ambos os sexos.

Este projeto, com o nº 35/2012, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará e conduzido de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Os animais, camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) e ratos (*Ratus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, de ambos os sexos, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. As duas espécies tinham cerca de 4-5 semanas de idade, pesando entre

18-20 g e 50-70 g respectivamente. Foram acondicionados em caixas de polipropileno autoclaváveis, 303 x 193 x 126 mm, com tampa grade em aço. Os animais receberam água da rede pública (filtrada) *ad libitum* e foram alimentados com ração comercial (em todas as idades) fornecida também *ad libitum*, que atende as recomendações do *National Research Council* e *National Institute of Health* - Estados Unidos. A temperatura do ambiente foi mantida constante, entre  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

- ✓ Linhagens Celulares tumorais mantidas em cultura (Tabela 3).

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm<sup>2</sup> para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado 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> e 95% de umidade, seguido da observação de crescimento celular com o auxílio do microscópio de inversão a cada 24 horas. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo em uma concentração de  $0,5-1,0 \times 10^6$  células/mL (Tabela 3).



Tabela 3: Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* através do método do MTT

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tipo Histológico do Câncer/ Origem</b>	<b>Concentração de Plaqueamento (células/mL)</b>
<b>HL-60</b>	Leucemia promielocítica humana	0,3x10 <sup>6</sup>
<b>K-562</b>	Leucemia mielocítica crônica humana	0,3x10 <sup>6</sup>
<b>MDA-MB 435</b>	Melanoma humano	0,1x10 <sup>6</sup>
<b>MALME-3M</b>	Melanoma humano	0,1x10 <sup>6</sup>
<b>HCT-8</b>	Adenocarcinoma de cólon humano	0,1x10 <sup>6</sup>
<b>HCT-116</b>	Carcinoma de cólon humano	0,1x10 <sup>6</sup>
<b>PC-3M</b>	Carcinoma de próstata humano modificado	0,1x10 <sup>6</sup>
<b>SF-295</b>	Glioblastoma humano	0,1x10 <sup>6</sup>
<b>SNB-19</b>	Glioblastoma humano	0,1x10 <sup>6</sup>
<b>MCF-7</b>	Adenocarcinoma de mama humano	0,1x10 <sup>6</sup>
<b>Linfócitos</b>	Linfócitos humanos	1,0x10 <sup>6</sup>

- ✓ Linfócitos humanos isolados de doadores saudáveis.

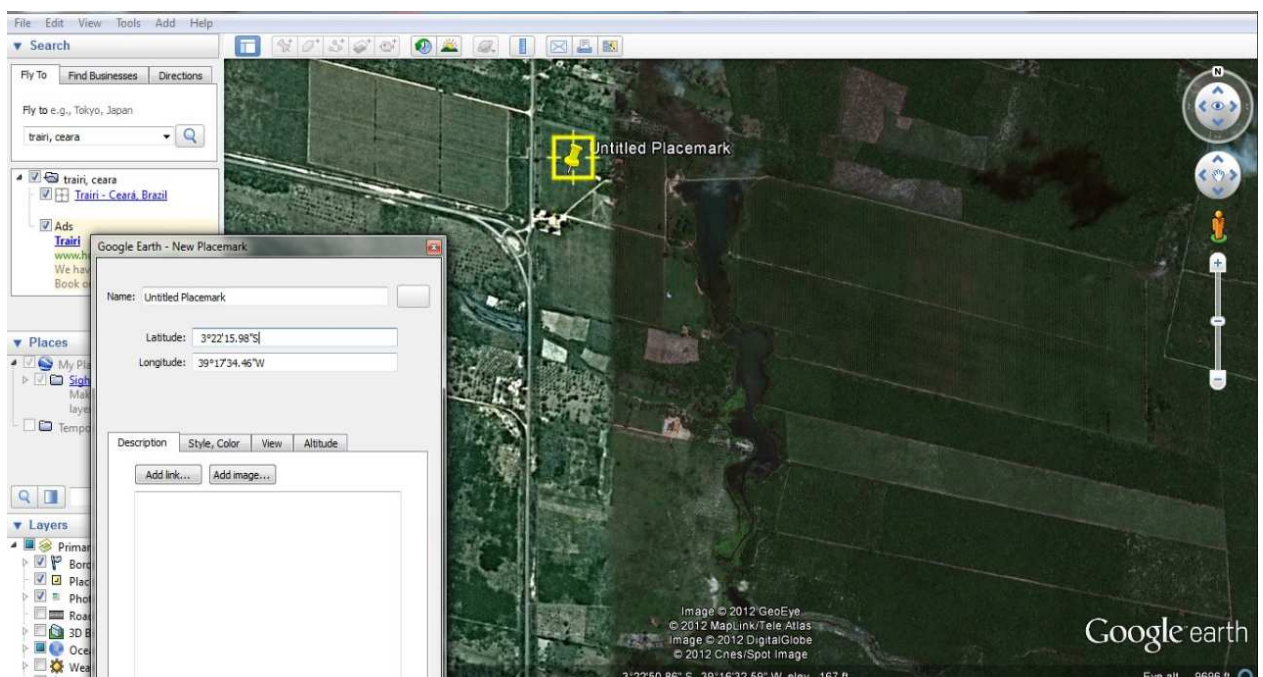
O sangue é coletado do doador saudável e colocado em volumes iguais com 2 mL de Ficoll<sup>®</sup> em tubos de centrifugação. Centrifugado durante 30 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante é descartado e o precipitado ressuspenso com solução de PBS estéril. Centrifugado novamente durante 20 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante é descartado e o precipitado ressuspenso com 1 mL de meio completo para linfócitos (RPMI 1640 com 20% de SFB, 1% de antibióticos e 2% de fitohemaglutinina).

### 3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ACETÔNICO DAS FOLHAS DE *ANNONA MURICATA* UTILIZADO NOS ENSAIOS

As folhas de *Annona muricata* L. (Annonaceae) selecionadas para este estudo foram coletadas na fazenda Iolla no município de Trairí – CE. A exata localização encontra-se a 3°22'15.98" de latitude sul e a 39°17'34.46" de longitude oeste (Figura 7). A identificação botânica da planta encontra-se no Herbário Prisco Bezerra-EAC: 3366-9807 da Universidade Federal do Ceará sob o N° EAC 49002.

Cerca de 3,0 Kg das folhas 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, obtendo-se um extrato viscoso e de coloração verde-escura. O processo descrito anteriormente foi repetido por mais duas vezes, sendo o tempo de extração das folhas, neste segundo momento, por apenas de 24 horas. Após destilação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo, o extrato concentrado foi cuidadosamente seco, para completa remoção do solvente e pesado. O extrato obtido (*Annona muricata* folhas acetona-AMFA) apresenta-se como uma cera viscosa uniforme. O rendimento alcançado foi de pouco mais de 10% do peso das folhas usado inicialmente, cerca de 480 g.

Figura 7: Fotografia de satélite mostrando local da coleta e os respectivos dados de latitude e longitude.



### 3.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MTT (3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-YL)-2,5 DIFENILTERTRAZÓLIO BROMETO)

Citotoxicidade é um termo abrangente que significa, em linhas gerais, morte celular induzida (<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=166>, acessado em 20/08/2012). Spielmann *et al.* (1999) propôs que a citotoxicidade basal medida em uma ou mais células ou linhagens celulares estava relacionada com a toxicidade aguda *in vivo*. Este teste poderia ser rapidamente absorvido para otimizar a seleção da dose inicial nos testes de toxicidade, como o teste “Up and Down”. Este procedimento reduziria significativamente o uso de animais, o que iria ao encontro dos anseios da sociedade e comunidade científica.

A citotoxicidade basal é definida como “os efeitos adversos resultantes da interferência com estrutura e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo” (VALADARES, 2006). A avaliação da citotoxicidade basal é importante, uma vez que as funções celulares básicas suportam as funções celulares órgãos-específicas. A citotoxicidade basal é expressa como  $CI_{50}$  (concentração que inibe 50% das células quando comparado às células controle não-tratadas), a qual pode ser matematicamente calculada a partir da curva de concentração-efeito. Vários métodos aplicados para testar a toxicidade geral são úteis na toxicologia *in vitro*. Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações de um produto químico por um dado período de tempo, sendo posteriormente a função celular mensurada utilizando diferentes alvos. Os ensaios mais frequentemente empregados para a avaliação de citotoxicidade basal são, o teste de redução dos sais de tetrazólio MTT e o teste da captação do corante vital vermelho (VALADARES, 2006).

A citotoxicidade foi avaliada através do método do MTT (MOSMANN,1983), o qual vem sendo utilizado no programa de *screening* do *National Cancer Institute*-NCI dos Estados Unidos, que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo.

As células em suspensão, como as de HL-60 e K-562, foram plaqueadas em placas de 96 poços. Cada placa foi incubada em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Em seguida, foi adicionado o AMFA (100 µL/poço) dissolvido em Tween 80 0,4%, nas

concentrações de 10 mg/mL, 5 mg/mL e 1 mg/mL. O quimioterápico doxorrubicina foi usado como controle positivo. Após o período de incubação de 72h as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 minutos. O sobrenadante foi aspirado, e adicionado 200 µg/mL de solução de MTT 10% em meio RPMI 1640. A placa foi colocada na estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Posteriormente, a placa foi centrifugada a 3000 rpm/10 minutos. O sobrenadante foi aspirado. O precipitado foi ressuscitado em 150 µL de DMSO e agitado por 5-10 minutos, até a completa dissolução dos cristais de formazan. Em seguida elas foram submetidas a uma agitação de 15 minutos para a dissolução das proteínas coradas e a absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas.

A dose que inibe 50% do crescimento celular (CI<sub>50</sub>) foi determinada utilizando-se o programa Prism 5.0. Extratos que apresentam CI<sub>50</sub> ≤ 30µg/mL são considerados ativos (ITARATH *et al.*, 2004).

### 3.3.1 Análise dos Dados

O AMFA foi testado em diluições seriadas e em triplicatas. Suas CI<sub>50</sub> e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

## 3.4 ESTUDO DO PERFIL TOXICOLÓGICO

### 3.4.1 Investigação da Toxicidade Oral Aguda do Extrato Acetônico das Folhas de *A. muricata* (AMFA) Pelo Método Up-and-Down

Para a realização do teste de toxicidade oral agudo conhecido como *Up and Down* (OECD 425) foram utilizados camundongos fêmeas (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. Os percentuais de Tween 80 foram de 0,2% e 4% para a preparação das doses de 175 mg/kg e 550 mg/kg, respectivamente.

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 sobrevivência) 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 AMFA tais como alterações de pêlo, pele e mucosas, comportamento, taquicardia, ptose, convulsões, diarreia, letargia e coma foram 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, duodeno, baço, rim e coração) e análise histológica dos mesmos.

De acordo com os procedimentos sugeridos pela OECD 425, utilizou-se como dose de partida 175 mg/kg sendo, portanto, o primeiro animal tratado com essa dose, por via oral. O software adotado indica que caso o animal morra com a dose de 175 mg/kg, no próximo animal deve ser administrado a dose de 55 mg/kg, mas, se ele sobrevive, a dose do animal subsequente deve ser 550mg/kg. Portanto, seguiu-se as recomendações do programa, de uma dose acima ou abaixo de acordo com o desfecho do animal anterior.

#### 3.4.1.1 *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%.

#### 3.4.2 *Investigação da Toxicidade Oral de Doses Repetidas (90 dias) do Extrato Acetônico das Folhas de A. muricata (AMFA).*

Para a avaliação toxicológica, ratos *wistar* machos e fêmeas (40-70 g) foram utilizados e divididos aleatoriamente em 10 grupos (n=10):

- ✓ Controle (água potável) - machos;
- ✓ Controle (água potável) – fêmeas;
- ✓ Veículo (Tween 80 0,4%) - machos;
- ✓ Veículo (Tween 80 0,4%) - fêmeas;
- ✓ AMFA 12,5 (AMFA 12,5 mg/kg) - machos;
- ✓ AMFA 12,5 (AMFA 12,5 mg/kg) - fêmeas;
- ✓ AMFA 25 (AMFA 25 mg/kg) - machos;
- ✓ AMFA 25 (AMFA 25 mg/kg) - fêmeas;
- ✓ AMFA 50 (AMFA 50 mg/kg) – machos;
- ✓ AMFA 50 (AMFA 50 mg/kg) – fêmeas.

De acordo com a RE nº 90 (Resolução Especial) da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) os ensaios de toxicidade de longa duração ou de doses repetidas são subdivididos em experimentos de quatro semanas (28 dias de tratamento) e de doze semanas (90 dias de tratamento) (BRASIL, 2004).

Dessa forma, os animais foram tratados uma vez ao dia durante 90 dias (via oral – gavagem), e após esse período todos os grupos foram submetidos previamente a um jejum alimentar de 10-12 horas. Posteriormente, realizou-se a coleta de sangue de todos os animais em experimentação pelo plexo orbital, utilizando-se microtubos com dois tipos de anticoagulantes, heparina sódica (parâmetros bioquímicos) e EDTA (parâmetros hematológicos). Também foram confeccionados esfregaços sanguíneos para posterior contagem diferencial dos leucócitos.

O sangue contendo heparina sódica foi então centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos, obtendo-se o plasma que foi utilizado para as análises dos parâmetros laboratoriais bioquímicos. Os tubos contendo EDTA foram utilizados para a realização do hemograma no aparelho semi-automático.

Após os 90 dias de tratamento, os órgãos cérebro, estômago, baço, rins, duodeno, fígado, coração e pulmões foram retirados e analisados macroscopicamente, através da massa dos órgãos, e microscopicamente, mediante técnicas histológicas.

Durante todo o período de experimentação, foram realizadas observações comportamentais sistemáticas para avaliar o *screening* hipocrático que fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo (MALONE & ROBCIHAUD, 1983). Parâmetros tais como atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção, reflexo endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, tremores, convulsões, anestesia, êmese, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte foram avaliados no tempo de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Os animais foram acompanhados semanalmente quanto ao ganho de massa corpórea, ingestão de ração e água, utilizando-se balança apropriada.

### 3.4.2.1 *Obtenção das Amostras*

Para a obtenção do plasma e posterior análise dos parâmetros laboratoriais bioquímicos, cerca de 1,0-1,5 mL sangue foram coletados antes do sacrifício dos animais em microtubos do tipo Ependorf® com 25 µL de heparina sódica (500 UI/mL). As amostras ficaram em repouso por no mínimo meia hora e no máximo 2 horas, antes da centrifugação que foi realizada a 3500 rpm, durante 15 minutos.

O hemograma, por sua vez, foi realizado com sangue previamente colhido em microtubos com 25 µL EDTA (10 g/dL) para cada mililitro de sangue. Após a coleta, o sangue foi mantido sob homogeneização para posterior análise em equipamento de hematologia.

### 3.4.2.2 *Procedimentos Analíticos*

No estudo da investigação toxicológica com doses repetidas durante 90 dias do extrato acetônico, foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos:

- ✓ Glicose (GL)
- ✓ Colesterol total (CT)
- ✓ Triglicerídeos (TG)
- ✓ Uréia (UR)
- ✓ Creatinina (CR)
- ✓ Ácido úrico (AU)
- ✓ Aspartato aminotransferase (AST)
- ✓ Alanina aminotransferase (ALT)
- ✓ Proteínas totais (PT)
- ✓ Albumina (ALB)
- ✓ Globulinas (GLOB)
- ✓ Fosfatase alcalina (FA)
- ✓ Amilase (AMI)

Os mesmos foram quantificados através de técnicas enzimáticas colorimétricas com auxílio de equipamento semi-automático, utilizando-se kits diagnósticos das empresas Labtest®.

Para a determinação dos parâmetros hematológicos, o sangue com EDTA foi cuidadosamente homogeneizado e inserido no aparelho semi-automático (Sysmex KX-21N-

Roche®), obtendo-se o número de hemácias, VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), hematócrito, hemoglobina, número de leucócitos e de plaquetas. O número de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, em percentual, foi obtido mediante contagem diferencial em esfregaço confeccionado e corado com a técnica panótica rápida.

Todas as análises descritas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Clínica e no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

#### 3.4.2.3 *Retirada dos Órgãos e Análises Histológicas*

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, o tórax e o abdomen foram abertos, através de técnicas cirúrgicas, e os órgãos: coração, pulmão, fígado, baço, cérebro, estômago, duodeno e rim foram removidos e colocados em formol 10%, por 24 horas, para fixação.

As estruturas anatômicas obtidas foram submetidas à desidratação e diafanização, e, em seguida, cortadas, em uma espessura de 5 µm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de microscópio óptico.

#### 3.4.2.4 *Análises Estatísticas*

Os resultados das determinações bioquímicas e hematológicas realizadas, além dos dados relacionados ao ganho de massa corpórea, massa dos órgãos, ingestão de água e ração foram tabulados e plotados nos programas Prism 5.0 e Microsoft Office Excel 2007® para análise estatística e geração de Figuras.

Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão médio (E.P.M.). Para comparação entre as médias, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Newman-keuls. O critério de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

### 3.5 **ENSAIO DO COMETA**

O ensaio do Cometa (Single Cell Gel Electrophoresis assay (SCGE)) não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. O ensaio avalia o dano ao DNA de células simples baseado na



migração do DNA desnaturado em um campo eletroforético (ÖSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH *et al.*, 1988).

Por sua simplicidade e relativo baixo custo, o teste do cometa é promissor para avaliação de produtos químicos em larga escala. O teste pode ser utilizado para distinguir entre danos genotóxicos ou citotóxicos, *in vitro*, ou entre cancerígenos de ação genotóxica ou não genotóxica, *in vivo* de um composto químico ou industrial. Análises podem incluir organismos, tecidos ou cultura dos quais uma célula simples ou o núcleo possa ser isolado. O cometa resultante do DNA é analisado visualmente pela estimativa da extensão do dano ao DNA ou medida do tamanho da cauda. O teste do cometa pode integrar as baterias de testes *in vitro/in vivo* usadas para fins de regulamentação de produtos químicos, uma vez que se encontra validado para este fim (TICE *et al.*, 2000).

Para a avaliação genotóxica, camundongos *Swiss* machos e fêmeas (25-30 g) foram codificados e separados aleatoriamente em quatro grupos, com 10 animais cada: A, B, C e D. O grupo A recebeu a solução Tween 80 0,4%. O grupo B recebeu o AMFA na dose 25 mg/Kg. O grupo C recebeu o AMFA na dose 50 mg/Kg. O grupo D recebeu a Ciclofosfamida (CPA, CAS 50-18-0) na dose de 25 mg/Kg. Todas as doses foram administradas por via oral, exceto o controle positivo, administrado por via intraperitoneal e, apenas 24 horas e 48 horas após a administração, os animais tiveram seu sangue coletado para realização do teste.

O sangue coletado em microtubos heparinizados foi diluído com agarose LMP e colocado em uma lâmina previamente coberta com uma película de agarose NMP. As lâminas foram mantidas na solução de lise por cerca de 2 horas e, em seguida, foi realizada a eletroforese. Após a corrida, as lâminas foram fixadas em álcool 100%, coradas com brometo de etídio 10% e contadas no microscópio de fluorescência.

Os dados foram avaliados utilizando o método estatístico de Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste Student Newman-Keuls, com o auxílio do programa Prism 5.0. Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

### **3.6 ENSAIO DO MICRONÚCLEO**

O teste do micronúcleo (MN) é o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR *et al.*, 1987). Os micronúcleos são estruturas presentes no citoplasma de

células em divisão, que possuem características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal e são formados por fragmentos acêntricos ou por cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase. Eles aparecem nas células-filha em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células-filha após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, que será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula. Os micronúcleos podem ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo. Nesta situação, o micronúcleo irá conter o centrômero do cromossomo, o qual pode ser detectado utilizando-se sondas específicas (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Dentre os testes de avaliação de genotoxicidade preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, o teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito e recomendado para a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001; RIBEIRO; MARQUES, 2003).

A avaliação da incidência de micronúcleos vem sendo amplamente utilizada para detectar dano cromossômico estrutural. Evans *et al.* (1959) usaram a frequência de micronúcleos para medir o dano citogenético induzido em plantas por irradiações. Högstedt e colaboradores (1981a; 1981b) demonstraram *in vivo* a ação citogenética de diversas substâncias no esfregaço de medula óssea por meio do teste de micronúcleos. Na década de 70, o teste de micronúcleo tornou-se viável e confiável através do estudo de eritrócitos policromáticos da medula óssea em camundongos, passando a ser um dos mais úteis indicadores de dano citogenético na medula óssea (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975).

Mais recentemente, o teste de micronúcleo emergiu como um dos métodos recomendados para avaliar os danos dos cromossomos, uma vez que este método permite a avaliação confiável tanto da perda quanto da ruptura do cromossomo (FENECH, 2005).

Para a avaliação genotóxica, camundongos *Swiss* machos e fêmeas (25-30g) foram codificados e separados aleatoriamente em quatro grupos com 10 animais cada: A, B, C e D. O grupo A receberá a solução Tween 80 0,4%. O grupo B recebeu o AMFA na dose 25 mg/Kg. O grupo C recebeu o AMFA na dose 50 mg/Kg. O grupo D recebeu a Ciclofosfamida (CPA, CAS 50-18-0) na dose de 25 mg/Kg. Todas as doses foram administradas por via oral, exceto o controle positivo, administrado por via intraperitoneal e,

apenas 24 horas e 48 horas após a administração oral, os animais tiveram sua medula coletada para realização do teste.

Os animais sacrificados com 24 horas e 48 horas tiveram suas patas traseiras limpas com álcool 70%. A pele foi cortada e o fêmur, exposto e retirado de forma íntegra. A extremidade final do fêmur foi cortada para expor o canal medular. A agulha de uma seringa de 1 mL, previamente preenchida com SFB, foi inserida firmemente na abertura do fêmur, injetando-se o SFB, de modo a empurrar a medula para dentro de um microtubo previamente marcado com o código do animal. A seringa foi limpa com SFB e reutilizada para os animais do mesmo grupo.

O material da medula óssea foi ressuspensionado em SFB e homogeneizado. A suspensão de células foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 0,5 mL de SFB.

Duas gotas da suspensão homogênea foram pingadas em uma lâmina, previamente identificadas com o código do animal, e um esfregaço foi realizado. As lâminas foram secas na temperatura ambiente. Foram preparadas três lâminas de cada animal.

Após secas, as lâminas foram colocadas em cubas de coloração contendo corante de Leishman puro e coradas por 3 minutos. Após esse tempo, foram transferidas para outra cuba contendo o corante de Leishman diluído em água destilada na proporção de 1:6, onde permaneceram corando durante 15 minutos. Depois, as lâminas foram lavadas com água corrente e, em seguida, com água destilada, para retirar o excesso do corante. Todas as lâminas foram secas em temperatura ambiente, por 24 horas. A qualidade da coloração foi avaliada e as lâminas foram montadas e guardadas em caixas próprias.

As células foram contadas de forma diferencial, os eritrócitos normocromáticos (ENC) ou maduros (células rosadas) e os eritrócitos policromáticos (EPC) ou jovens (células arroxeadas). Após essa contagem, foram contadas 1000 células EPC para detectar a ocorrência de micronúcleo.

Os resultados foram expressos em frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em 1000 eritrócitos policromáticos por animal. Os dados foram avaliados utilizando o método estatístico de Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste Student Newman-Keuls, com o auxílio do programa Prism 5.0. Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

### 3.7 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VIVO

#### 3.7.1 *Obtenção e Manutenção dos Animais Para Ensaio Antitumoral Contra Sarcoma 180*

Os testes para avaliação da atividade antitumoral contra Sarcoma 180 *in vivo* foram realizados utilizando camundongos (*Mus musculus* Swiss) machos, pesando entre 25-30 g oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos com água e alimento *ad libitum*. O manejo dos animais foi realizado de acordo com todos os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais. O tumor sólido do tipo Sarcoma 180, com 10 dias de implante na forma ascítica foi utilizado para determinar a atividade antitumoral do extrato acetônico das folhas de *A. muricata*.

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, preparando-se uma suspensão de células com 4,3 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  $2,0 \times 10^6$  células/0,5 mL na região intraperitoneal dos camundongos (*Mus musculus* Swiss).

#### 3.7.2 *Avaliação do Efeito do AMFA em Camundongos Transplantados com Sarcoma 180*

A avaliação da atividade antitumoral está relacionada à regressão total de tumores nos animais, à redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os não-tratados. Ficou demonstrado que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 horas após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral (SCHABEL *et al.*, 1977). O tumor utilizado foi o Sarcoma 180, o qual foi descoberto em 1914 no Crocker Laboratory (Columbia University, New York). É originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos, e foi inicialmente classificado como carcinoma mamário. Após vários transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa, por volta de 1919, e mantêm-se sem alterações até os dias de hoje (FERREIRA, 2006).

### 3.7.2.1 *Procedimento Experimental*

Para o teste de atividade antitumoral, foi utilizado o tumor sólido do tipo Sarcoma 180, com oito 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, tendo sido preparado uma suspensão de células com 4,3 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 (*Mus musculus* Swiss). Nesse experimento, foram utilizados 10 animais por grupos, num total de quatro grupos, sendo todos machos, apresentando massa corpórea variando entre 25-30 g, os quais foram inoculados com tumor Sarcoma 180. Em seguida, 24 horas após a inoculação do tumor foi iniciado o tratamento durante sete dias consecutivos, utilizando as doses de 25 e 50 mg/Kg para o AMFA e no controle positivo 25 mg/Kg de Ciclofosfamida, além dos animais tratados com veículo (Tween 80 0,4%). Todos os grupos foram tratados por via oral, exceto o controle positivo, que foi usada a via intraperitoneal. Vinte quatro horas após o término do tratamento, os animais foram sacrificados, sendo em seguida retirados os tumores, rins, fígado e baço para pesagem e análise histológica.

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.

### 3.7.2.2 *Análise Estatística*

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de quatro experimentos. Os dados foram avaliados utilizando o método estatístico de Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste Student Newman-Keuls, com o auxílio do programa Prism 5.0. Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

### 3.7.3 *Obtenção e Manutenção dos Animais Para Ensaio Contra Carcinossarcoma de Walker 256*

Os testes para avaliação da atividade antitumoral contra Carcinossarcoma de Walker 256 *in vivo* foram realizados utilizando ratos (*Ratus norvegicus* Wistar) machos, pesando entre 85-100 g oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos com água e alimento *ad libitum*. O manejo dos animais foi realizado de acordo com todos os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais. O tumor sólido do tipo Carcinossarcoma de Walker 256, com 8-10 dias de implante na forma sólida foi utilizado para determinar a atividade antitumoral do extrato acetônico das folhas de *A. muricata*.

O rato doador ou de manutenção foi sacrificado por deslocamento cervical e a assepsia da região tumoral foi feita com álcool iodado. Em seguida, foram realizadas incisões da epiderme do animal e posterior retirada do tumor como auxílio de pinça e tesoura. O tumor foi colocado em uma placa de Petri contendo solução de Ringer-lactato com 1% de gentamicina. Após a retirada das partes necrosadas, foram selecionados fragmentos tumorais de aproximadamente 2-3 mm de diâmetro, sendo estes transferidos para outra placa de Petri contendo a mesma solução. Os fragmentos tumorais foram triturados com tesoura, peneirados e a suspensão restante foi submetida ao teste de viabilidade celular por azul de tripan e colocado em câmara de Neubauer para avaliar a viabilidade celular e fazer a contagem celular. A suspensão foi diluída para a concentração de  $1,0 \times 10^6$  células tumorais/ mL e inoculado 1 mL por via subcutânea em ratos Wistar. Após 10 dias de evolução, o tumor foi retirado dos animais doadores e o procedimento acima referido foi repetido.

#### 3.7.3.1 *Procedimento Experimental*

Quatro grupos de ratos Wistar foram inoculados com  $1,0 \times 10^6$  células tumorais por via subcutânea na região axilar. Vinte e quatro horas após a inoculação das células, os animais foram tratados com 25 e 50 mg/Kg de AMFA, 25 mg/Kg de Ciclofosfamida (controle positivo) e Tween 80 0,4% (controle negativo), respectivamente durante sete dias consecutivos por via oral, exceto o controle positivo, que foi usada a via intraperitoneal. Oito dias após o início do tratamento, os animais foram sacrificados para a pesagem do tumor, fígado, rins e braço.

O percentual de inibição do crescimento tumoral foi feito de acordo com a mesma fórmula descrita para o Sarcoma 180.

### 3.7.3.2 *Análise Estatística*

Os dados foram avaliados utilizando o método estatístico de Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste Student Newman-Keuls, com o auxílio do programa Prism 5.0. Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MTT (3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-YL)-2,5 DIFENILTERTRAZÓLIO BROMETO)

A avaliação da atividade citotóxica do AMFA foi realizada pelo método do MTT contra 9 linhagens de células tumorais humanas e linfócitos humanos. As  $CI_{50}$ , determinada após 72 horas de incubação com a substância, estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4: Atividade citotóxica do AMFA em células tumorais normais humanas pelo método do MTT

Linhagem	$CI_{50}$	IC 95%
HL-60	5,379 $\mu$ g/mL ( $R^2$ - 0,9010)	3.55 - 8.16
K-562	0,1452 $\mu$ g/mL ( $R^2$ - 0,8990)	0,073 - 0,288
MDA-MB-435	5,722 $\mu$ g/mL ( $R^2$ - 0,9273)	3.90 - 8.39
MALME-3M	44,29 $\mu$ g/mL ( $R^2$ - 0,7811)	31.06 - 63.15
HCT-8	0,2457 $\mu$ g/mL ( $R^2$ - 0,9213)	0.18 - 0.32
HCT-116	0,2956 $\mu$ g/mL ( $R^2$ - 0,9754)	0,17-0,51
SF-295	0,2191 $\mu$ g/mL ( $R^2$ - 0,9830)	0.14 - 0.34
SNB-19	11,38 $\mu$ g/mL ( $R^2$ - 0,7791)	6.654 - 19.45
MCF-7	44,81 $\mu$ g/mL ( $R^2$ - 0,8627)	28.40 - 70.69
PC-3M	43,99 $\mu$ g/mL ( $R^2$ - 0,8550)	28.40 - 70.69
Linfócitos	18,59 $\mu$ g/mL ( $R^2$ -0,9243)	15.60 - 22.1

O AMFA apresentou maior potencial citotóxico contra K-562, com valor de  $CI_{50}$  0,1452  $\mu$ g/mL, HCT-8 com valor de  $CI_{50}$  0,2457  $\mu$ g/mL, HCT-116 com valor de  $CI_{50}$  0,2956  $\mu$ g/mL e SF-295, com valor de  $CI_{50}$  0,2191 $\mu$ g/mL. Contra as outras linhagens, o AMFA mostrou ter atividade tóxica, porém menos potente. O extrato não foi capaz de inibir o



crescimento das linhagens MALME-3M, MCF-7 e PC-3M, além de ter sido ativo contra os linfócitos humanos.

## 4.2 TOXICIDADE AGUDA ORAL PELO MÉTODO DO UP AND DOWN

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

O primeiro animal foi tratado com a dose de 175 mg/kg. Após 24 h da administração, observou-se que o animal sobreviveu. A dose administrada no próximo animal foi 550 mg/kg. Entretanto, aproximadamente 3 h após a administração, verificou-se a morte do segundo animal. Com esse resultado, a dose subsequente administrada ao terceiro animal foi a de 175 mg/kg e após 24 h da gavagem houve sobrevida. Seguindo, a sequência de doses estipulada pelo programa estatístico, administrou-se as doses de 550 mg/kg, 175 mg/kg e 550 mg/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. Após os cálculos estatísticos, a estimativa da  $DL_{50}$  foi de 310,2 mg/Kg.

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 repetitivos os que mais se destacaram. Essas alterações só foram observadas na primeira hora após administração do AMFA. É importante ressaltar que após 14 dias da administração do AMFA, 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 175 mg/kg.

Os animais que sobreviveram até o 14º dia de experimento foram acompanhados quanto a sua massa corporal, uma vez que esse dado pode ser utilizado com um indicador de toxicidade (dados não mostrados).

Os resultados podem ser visualizados através da Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7.

Tabela 5: Relatório contendo os dados dos ensaios do teste de toxicidade aguda pelo método Up and Down.

<b>Relatório DL<sub>50</sub> AMFA</b>	
Programa Estatístico	AOT425statpgm (Versão: 1.0)
Resultados dos Testes e recomendações	Toxicidade Oral Aguda (Teste Guia OECD 425)
Data	Segunda, 30 de abril de 2012, 11:06:18 PM
Dados de preenchimento da amostra	DL <sub>50</sub> AMFA.dat
Última modificação	30/04/12 11:06:12 PM
Teste/Substância	AMFA 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 6: Dados brutos dos experimentos realizados usando o método Up and Down.

<b>Dados dos experimentos</b>				
<b>Ensaio 1</b>	<b>Ensaio 2</b>	<b>Dose Administrada</b>	<b>Morte/Sobrevivência</b>	
<b>(n° animais)</b>	<b>(n° animais)</b>	<b>(mg/Kg)</b>		
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

\* (X = morreu, O = Sobreviveu)

Tabela 7: Resultados estatísticos dos ensaios de toxicidade aguda do AMFA usando o método Up and Down.

<b>Estatística estimada baseada nos resultados</b>	
<b>DL50 estimada</b>	310.2 (Baseada em um sigma assumido de 0.5)
<b>IC 95%</b>	175-550

#### 4.3 TOXICIDADE ORAL DE DOSES REPETIDAS POR 90 DIAS

Durante o período de experimentação, observou-se que os animais tanto do grupo dos machos quanto das fêmeas, tratados com extrato acetônico de *Annona muricata L.* na dose de 50 mg/kg apresentaram-se mais agressivos e estressados quando comparado aos grupos controle e veículo. Além disso, visualizaram-se piloereção e movimentos estereotipados de coçar o focinho, em alguns animais tratados com a maior dose do extrato.

Os animais foram acompanhados quanto a sua massa corporal, ingestão e alimento e de água, uma vez que esses dados podem ser utilizados como indicadores de toxicidade. O peso dos animais foi devidamente registrado antes da administração do AMFA, durante

as semanas de tratamento e no 90º dia, assim como o volume de água e ração consumido no mesmo período (Figuras 8A e 8B). Não foi observada nenhuma alteração em relação ao consumo de água e alimento durante o período avaliado, assim como não foi observada nenhuma alteração significativa no peso dos animais (Figuras 8C, 8D, 8E e 8F).

O tratamento diário dos ratos machos e fêmeas com o AMFA, por 90 dias, nas doses de 12,5 mg/kg, 25 mg/kg ou 50 mg/kg promoveu alterações significantes em alguns parâmetros bioquímicos avaliados.

A dose de 50 mg/kg reduziu os níveis glicêmicos nos machos após 30 dias de tratamento (Figura 9A), entretanto decorridos 60 dias houve um aumento significativo da glicemia com as três doses testadas quando comparado ao grupo controle (Figuras 9C), atingindo a normalidade no final dos 90 dias (Figuras 9E). Em relação às fêmeas não foi observado nenhuma alteração nesse parâmetro bioquímico nos tempos e doses estudados quando comparado com o grupo controle (Figuras 9B, 9D, 9F).

Dos parâmetros bioquímicos correlacionados ao metabolismo lipídico tais como triglicerídeos e colesterol total, ambos foram alterados após 30 dias de tratamento. A administração diária de AMFA 50 mg/kg nos machos promoveu um aumento significativo tanto do colesterol total quanto dos triglicerídeos na coleta de 30 dias (Figuras 10A e 11A, respectivamente), enquanto que nas fêmeas somente os triglicerídeos aumentaram na mesma dose e tempo estudado (Figura 11B). Nos outros períodos avaliados, os valores normalizaram para ambos os parâmetros nos dois sexos (Figuras 10B, 10C, 10D, 10E, 10F, 11C, 11D, 11E, 11F).

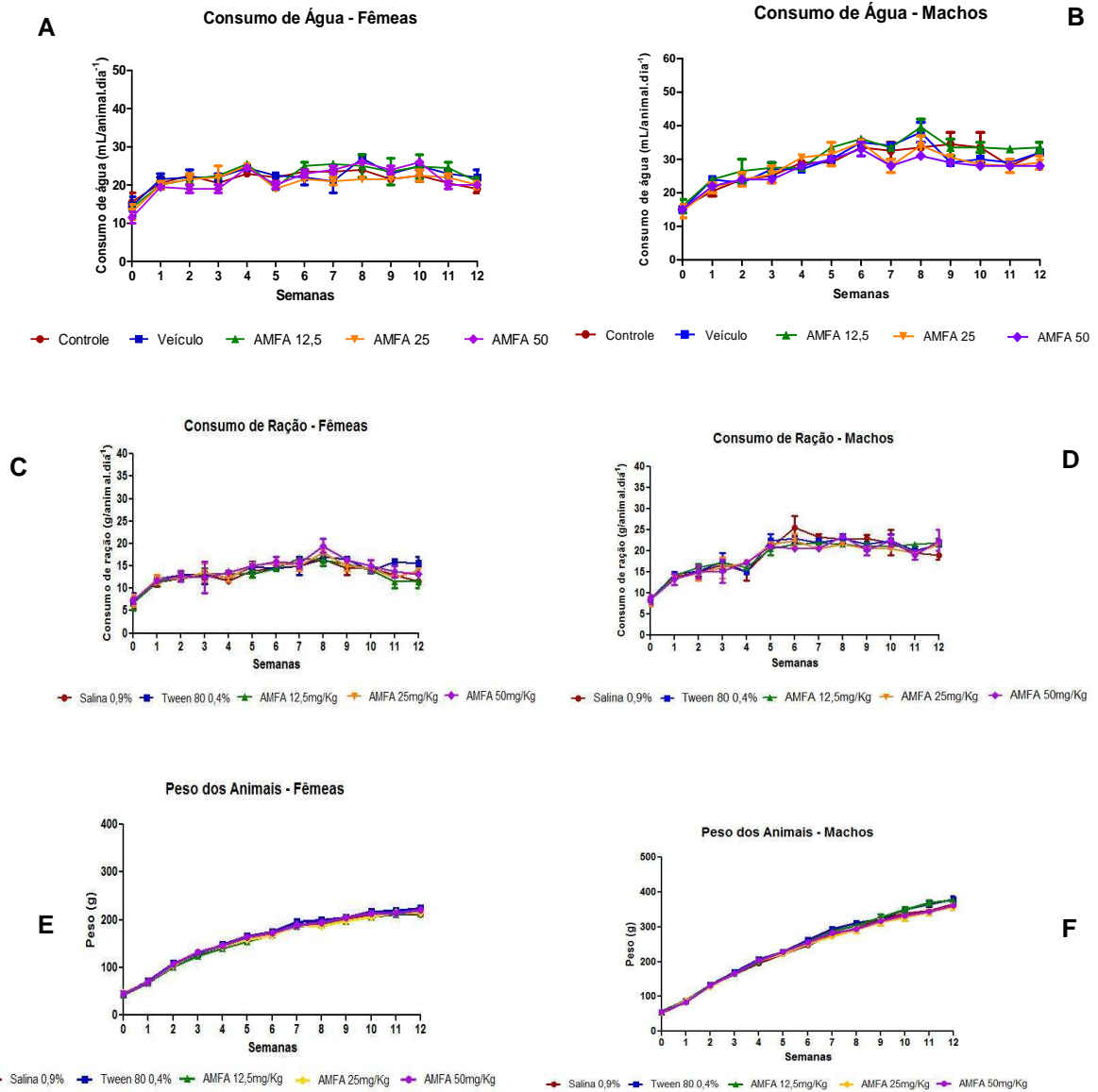
Analisando os parâmetros bioquímicos de função renal como uréia, creatinina e ácido úrico (Figuras 15, 16 e 21, respectivamente), bem como os do metabolismo protéico (proteínas totais, albumina e globulinas) (Figuras 12, 13 e 14, respectivamente) esses não foram alterados de forma significativa nos machos entre os grupos estudados durante o período de experimentação. O mesmo ocorreu com as fêmeas (Figuras 12, 13, 14, 15, 16) com exceção do parâmetro bioquímico ácido úrico. Todas as doses estudadas do AMFA promoveram redução significativa do ácido úrico nas fêmeas somente no período de 60 dias (Figura 21D), retornando aos níveis do grupo controle aos 90 dias de experimentação (Figuras 21F).

A função hepática dos animais foi analisada através da determinação dos parâmetros AST, ALT e fosfatase alcalina. Os níveis plasmáticos de AST foram alterados

após a administração do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. nos machos, destacando-se que ocorreu uma elevação significativa após 30 dias com a dose de 25 mg/kg (Figura 17A). Entretanto, nos tempos 60 e 90 dias, os níveis dessa enzima retornaram para os níveis do grupo controle (Figuras 17C e 17E). Em relação aos valores de ALT estes reduziram após tratamento dos machos com a dose de 12,5 mg/kg aos 60 e 90 dias de experimentação (Figuras 18C e 18E). Nas fêmeas, não ocorreu nenhuma alteração significativa dos níveis plasmáticos de AST e ALT nos períodos e doses estudados (Figuras 17B, 17D, 17F, 18B, 18D e 18F). Os níveis de fosfatase alcalina não foram modificados nos machos e fêmeas em nenhum dos períodos e doses em estudo (Figura 19).

O parâmetro bioquímico amilase tem correlação com a função pancreática. No presente estudo, observou-se que após 30 dias tratamento com AMFA 50 mg/kg, no grupo dos machos, ocorreu uma redução dos níveis séricos de amilase de forma significativa em relação ao grupo controle (Figura 20A). Após o período de 30 dias de experimento, no grupo das fêmeas também foi evidenciado um diminuição da atividade dessa enzima não somente com a dose de 50 mg/kg, encontrando-se o mesmo efeito com as demais doses de extrato testadas (Figura 20B). Entretanto, os níveis desse analito retornaram aos níveis basais após 60 e 90 dias de tratamento, tanto nos machos quanto nas fêmeas (Figuras 20C, 20D, 20E e 20F).

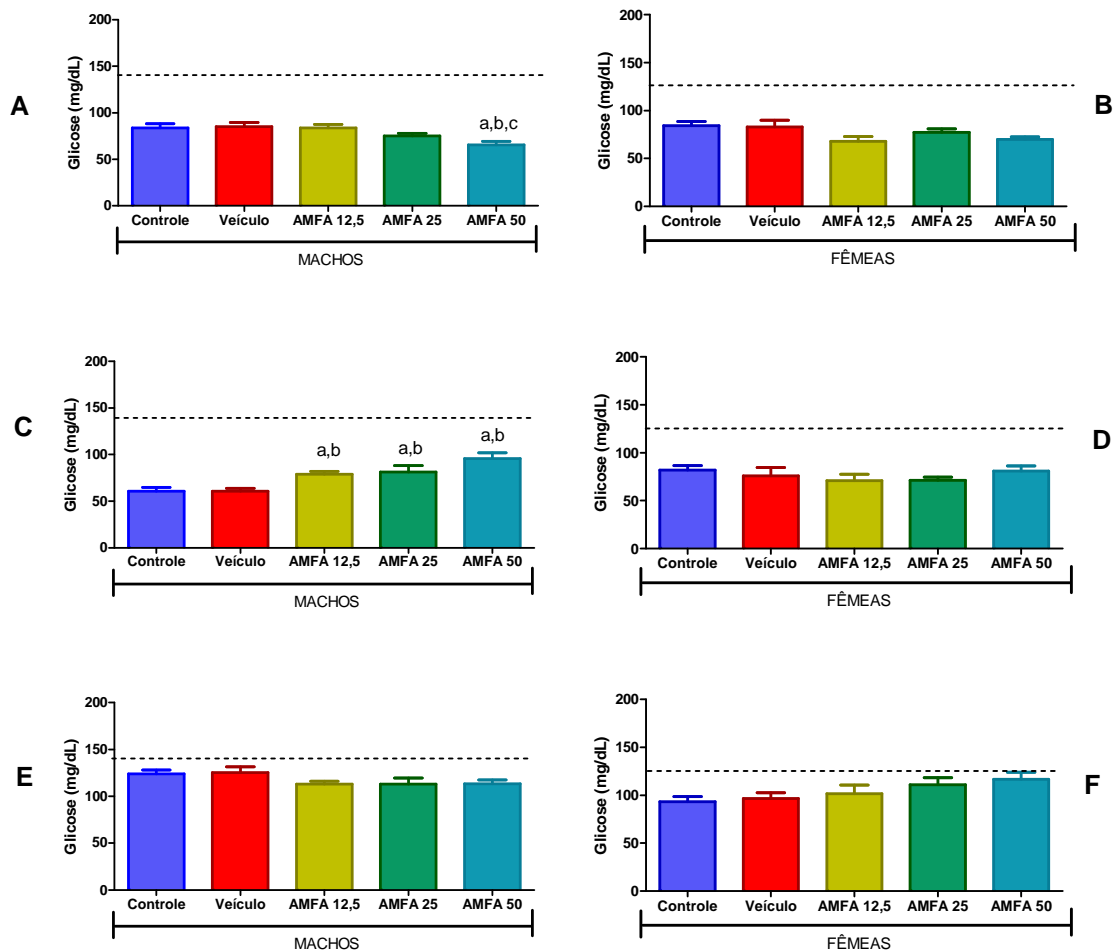
Figura 8: Avaliação do consumo de água, ração e peso dos animais durante 90 dias de ensaio toxicidade de doses repetidas.



(A) Consumo de água pelas fêmeas. (B) Consumo de água pelos machos, (C) Consumo de ração pelas fêmeas. (D) Consumo de ração pelos machos. (E) Peso das fêmeas. (F) Peso dos machos. ANOVA seguido de Newman-Keuls,  $P < 0,05$ .

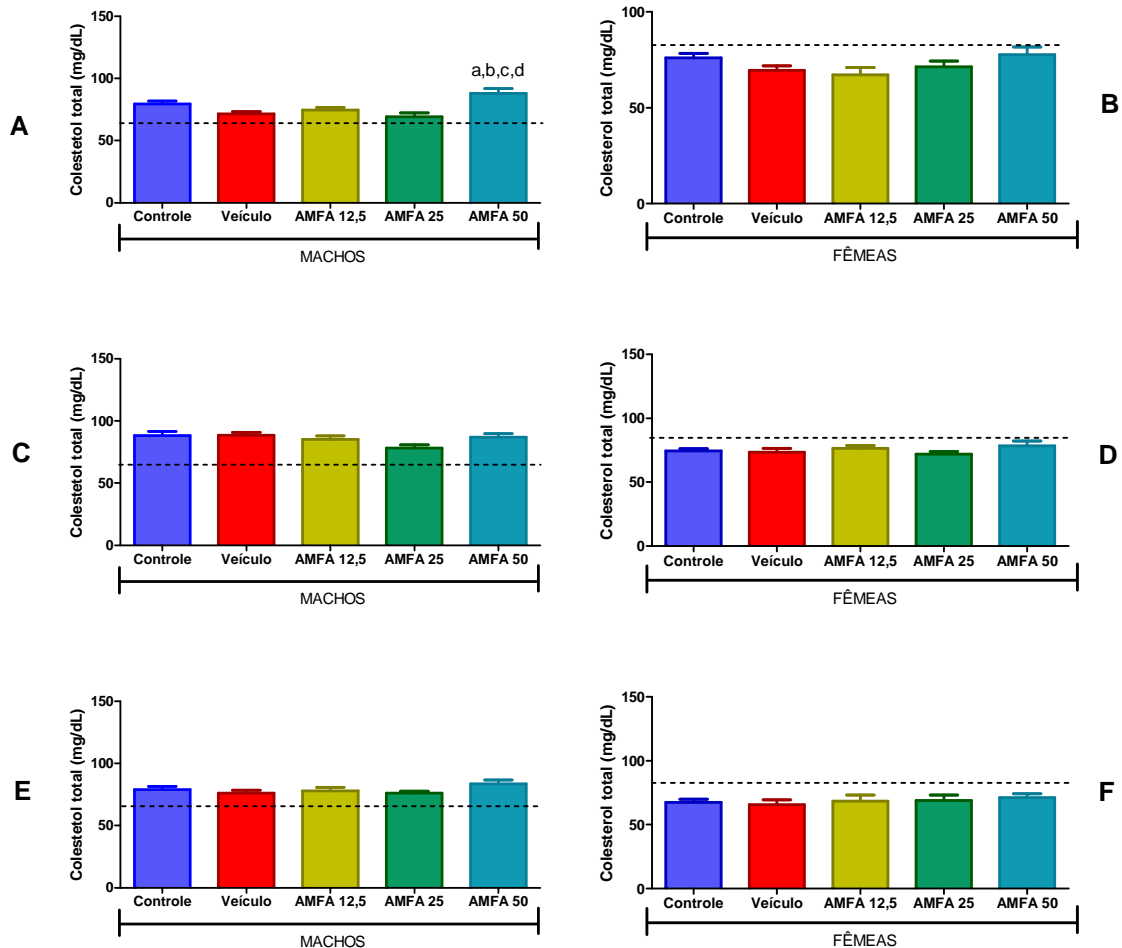
## PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Figura 9: Níveis plasmáticos de glicose de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) Glicose dos machos em 30 dias. (B) Glicose das fêmeas em 30 dias. (C) Glicose dos machos em 60 dias. (D) Glicose das fêmeas em 60 dias. (E) Glicose dos machos em 90 dias. (F) Glicose das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls); a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo, c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 12,5. Média do valor de normalidade: 140 mg/dL para machos e 126mg/dL para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

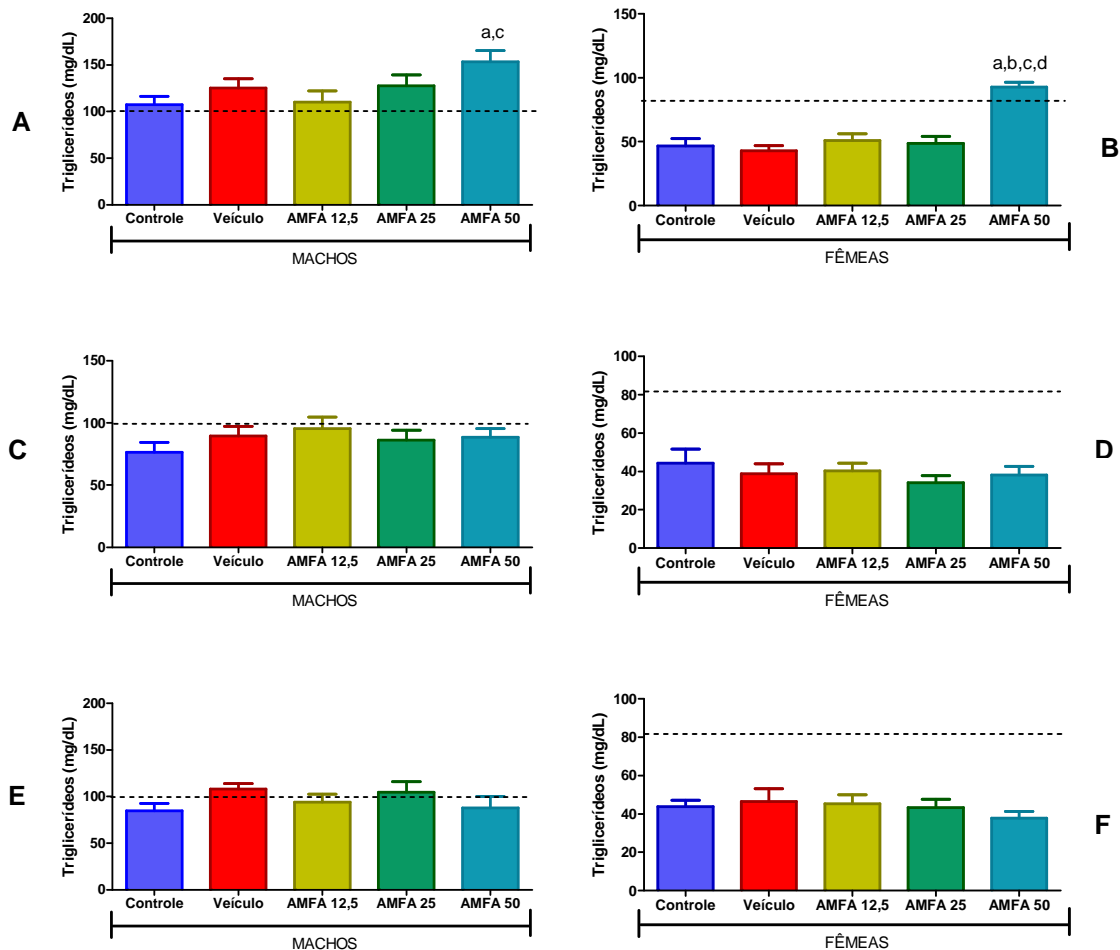
Figura 10: Níveis plasmáticos de colesterol total de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) Colesterol total dos machos em 30 dias. (B) Colesterol total das fêmeas em 30 dias. (C) Colesterol total dos machos em 60 dias. (D) Colesterol total das fêmeas em 60 dias. (E) Colesterol total dos machos em 90 dias. (F) Colesterol total das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls); a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo, c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 12,5, d =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 25. Média do valor de normalidade: 65 mg/dL para machos e 83 mg/dL para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

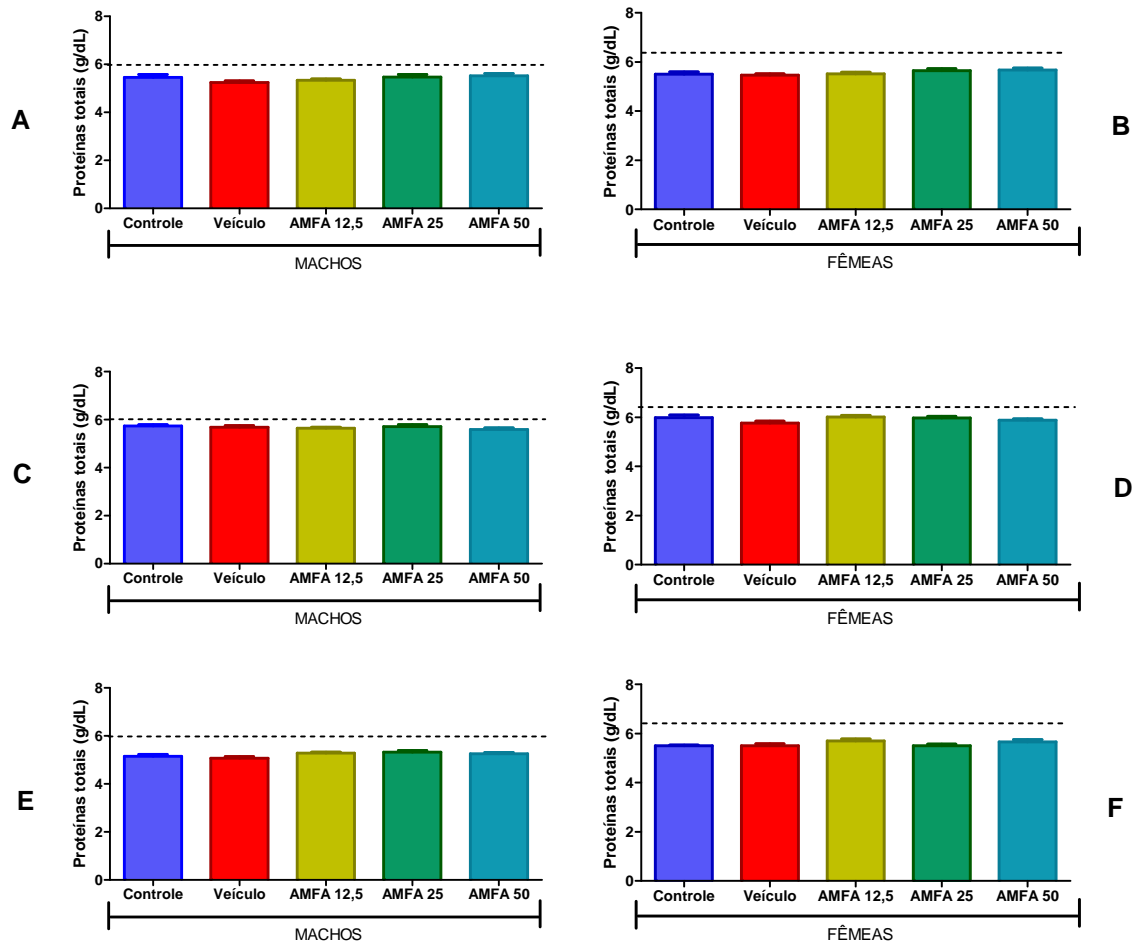


Figura 11: Níveis plasmáticos de triglicerídeos de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



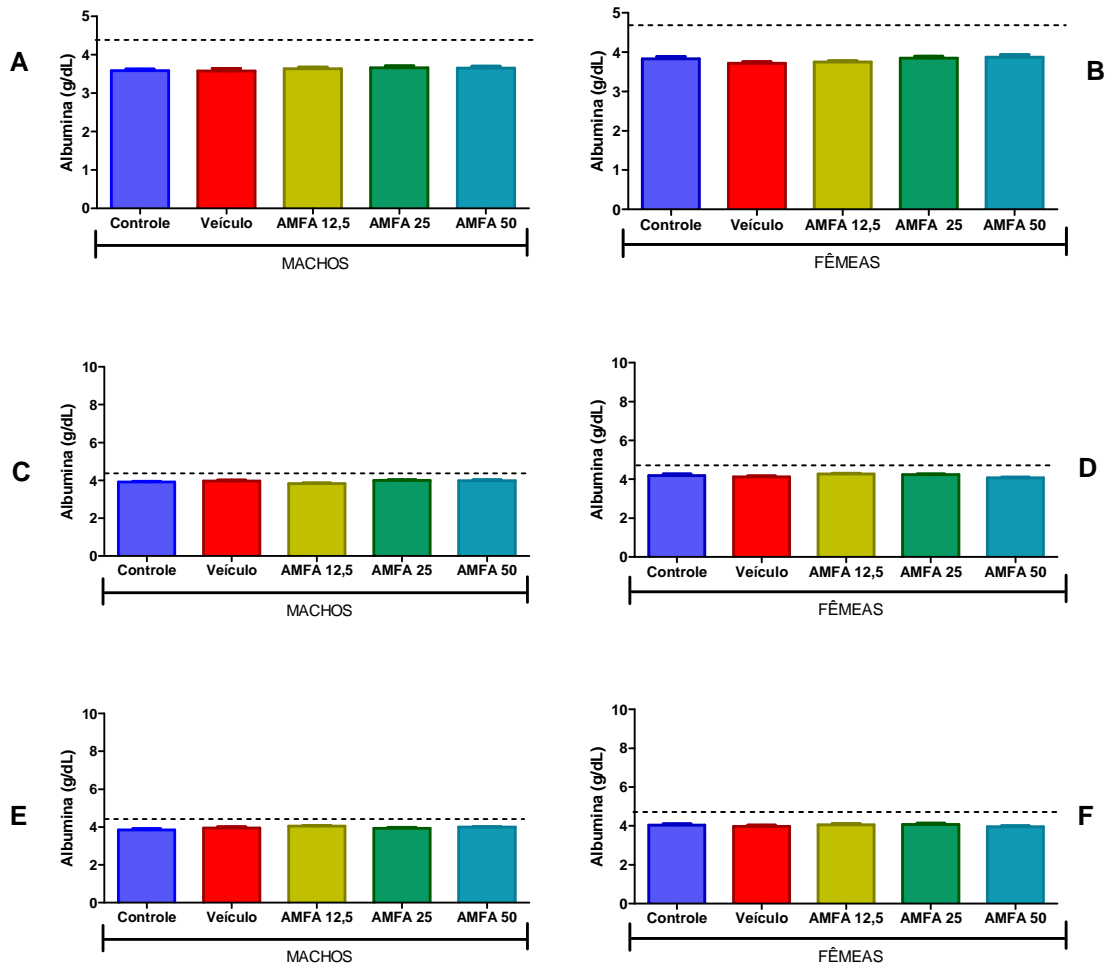
(A) Triglicerídeos dos machos em 30 dias. (B) Triglicerídeos das fêmeas em 30 dias. (C) Triglicerídeos dos machos em 60 dias. (D) Triglicerídeos das fêmeas em 60 dias. (E) Triglicerídeos dos machos em 90 dias. (F) Triglicerídeos das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls); a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 12,5. Média do valor de normalidade: 100 mg/dL para machos e 82 mg/dL para fêmeas (DINIZ *et al.*, 2006).

Figura 12: Níveis plasmáticos de proteínas totais de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



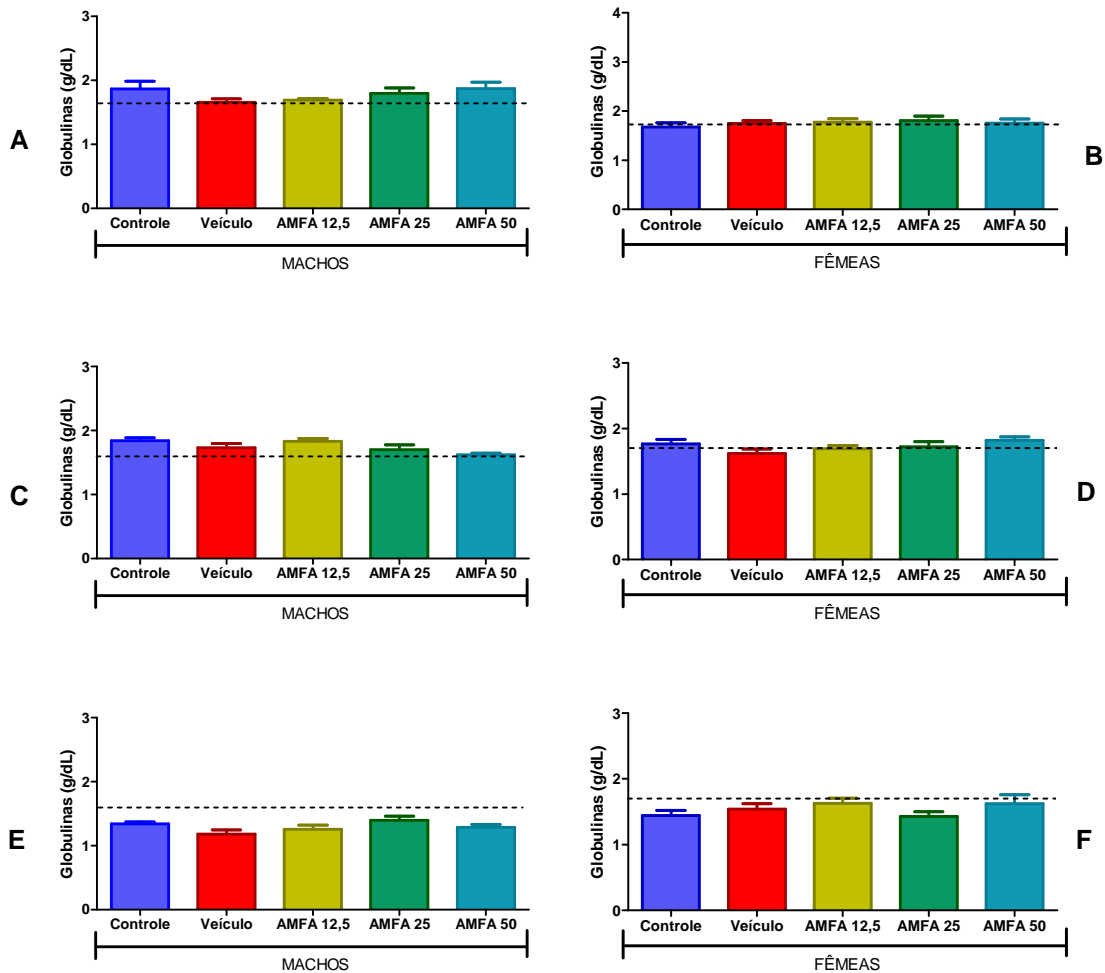
(A) Proteínas totais dos machos em 30 dias. (B) Proteínas totais das fêmeas em 30 dias. (C) Proteínas totais dos machos em 60 dias. (D) Proteínas totais das fêmeas em 60 dias. (E) Proteínas totais dos machos em 90 dias. (F) Proteínas totais das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais ( $n=10$ ) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 6,0 g/dL para machos e 6,4 g/dL para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 13: Níveis plasmáticos de albumina de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



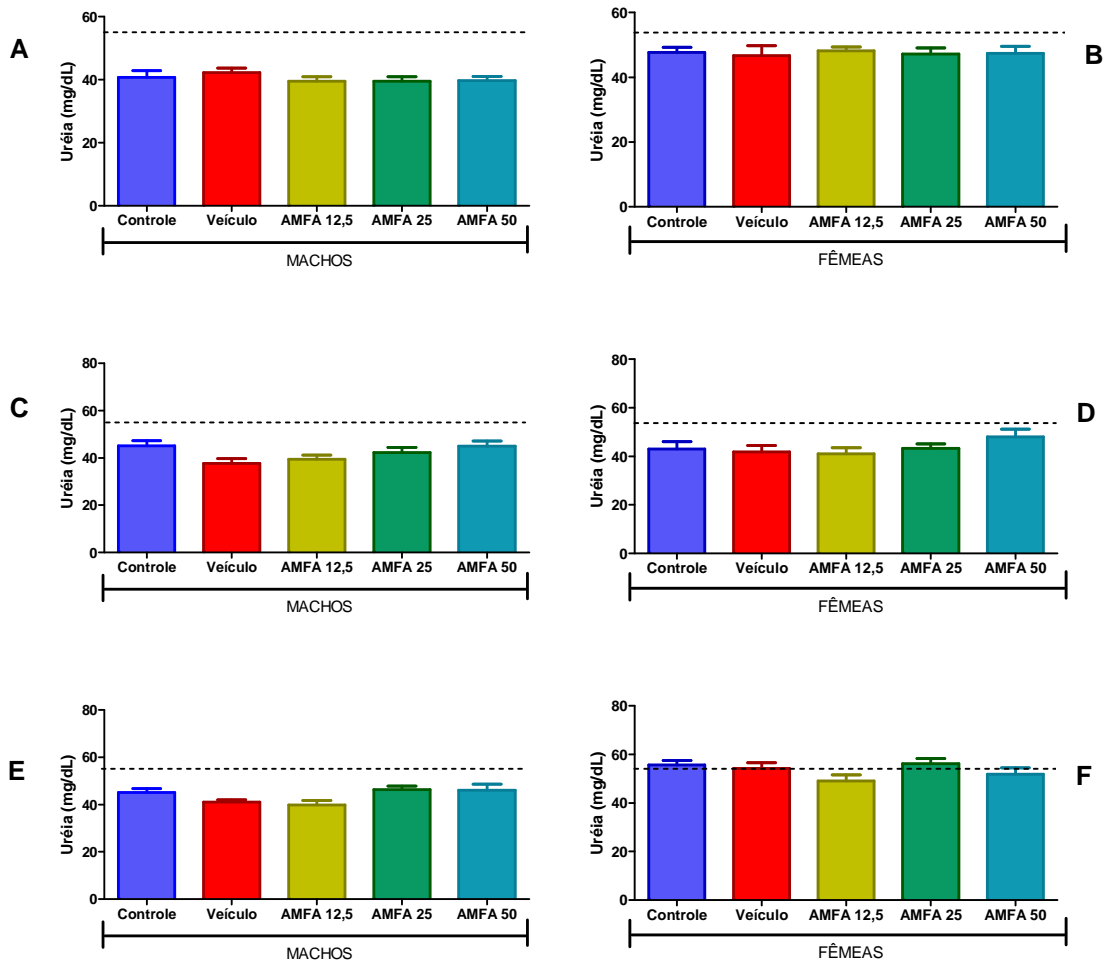
(A) Albumina dos machos em 30 dias. (b) Albumina das fêmeas em 30 dias. (C) Albumina dos machos em 60 dias. (D) Albumina das fêmeas em 60 dias. (E) Albumina dos machos em 90 dias. (F) Albumina das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 4,4 g/dL para machos e 4,7 g/dL para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 14: Níveis plasmáticos de globulinas de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



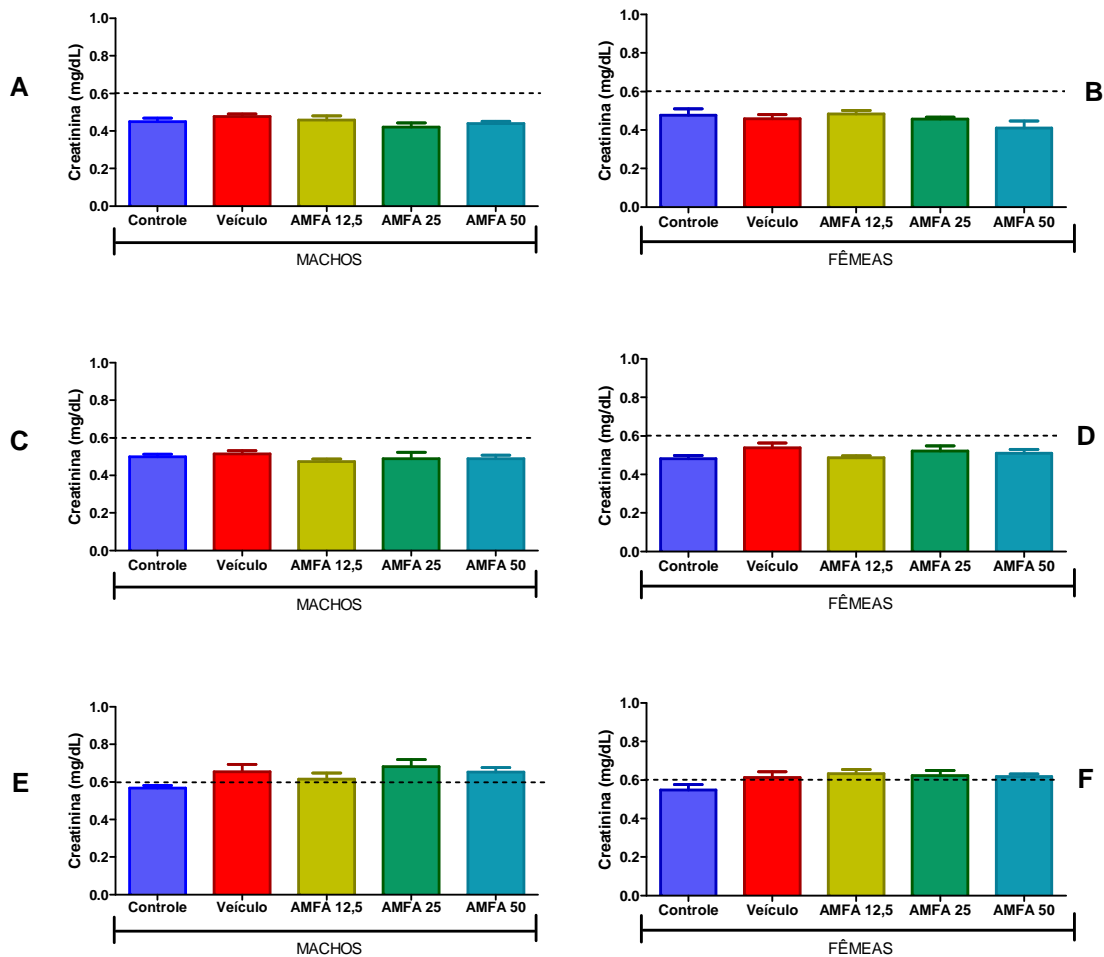
(A) Globulinas dos machos em 30 dias. (B) Globulinas das fêmeas em 30 dias. (C) Globulinas dos machos em 60 dias. (D) Globulinas das fêmeas em 60 dias. (E) Globulinas dos machos em 90 dias. (F) Globulinas das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 1,6 g/dL para os machos e 1,7 g/dL para as fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 15: Níveis plasmáticos de uréia de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



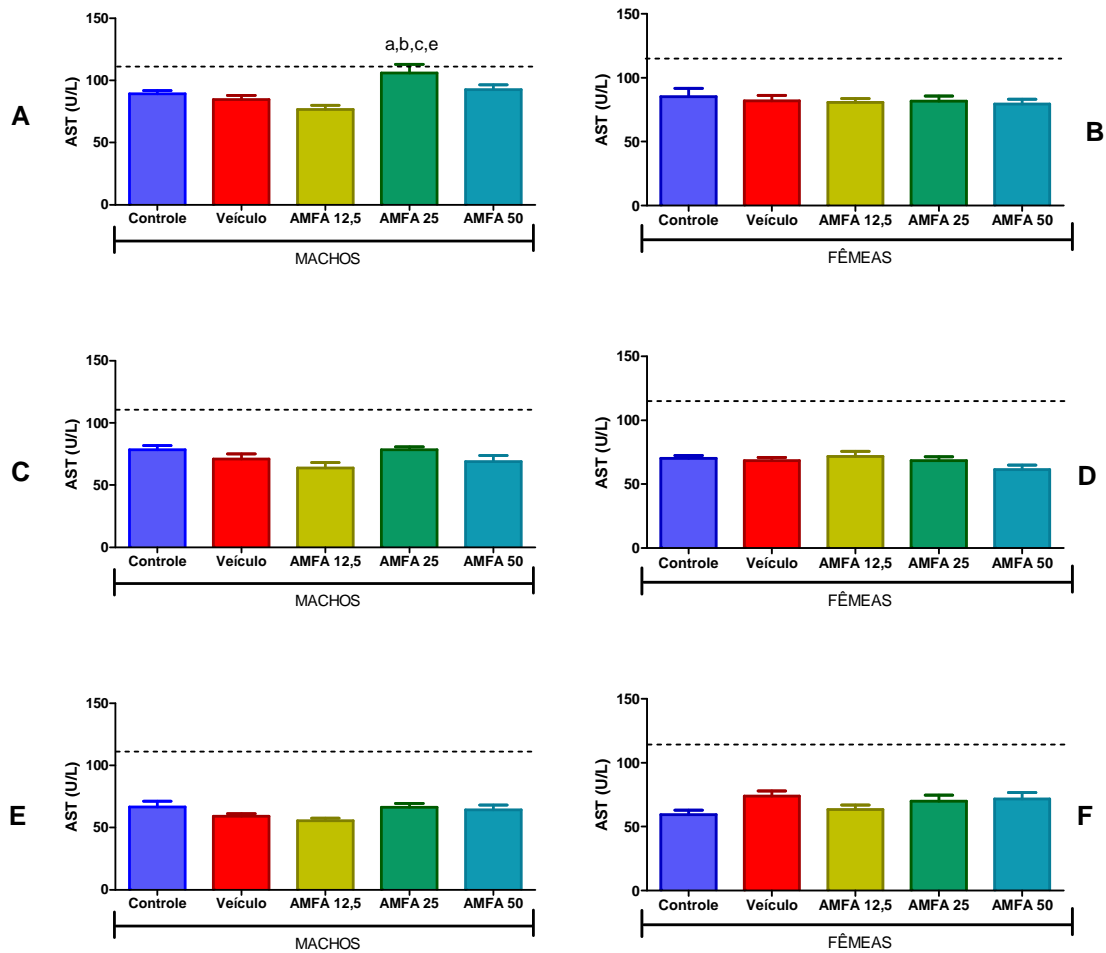
(A) Uréia dos machos em 30 dias. (B) Uréia das fêmeas em 30 dias. (C) Uréia dos machos em 60 dias. (D) Uréia das fêmeas em 60 dias. (E) Uréia dos machos em 90 dias. (F) Uréia das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 55 mg/dL nos machos e 54 mg/dL nas fêmeas (DINIZ *et al.*, 2006).

Figura 16: Níveis plasmáticos de creatinina de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



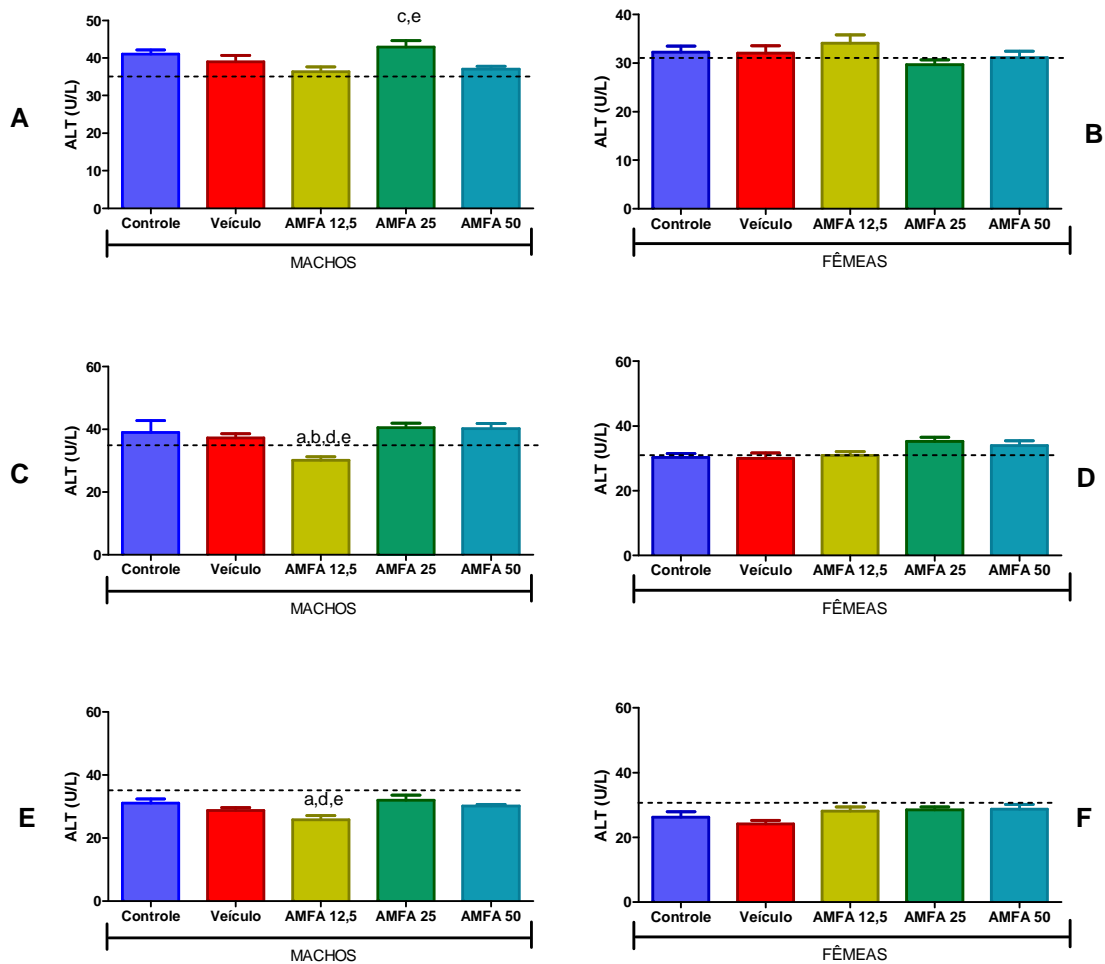
(A) Creatinina dos machos em 30 dias. (B) Creatinina das fêmeas em 30 dias. (C) Creatinina dos machos em 60 dias. (D) Creatinina das fêmeas em 60 dias. (E) Creatinina dos machos em 90 dias. (F) Creatinina das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 0,6 mg/dL para ambos os sexos (DINIZ *et al.*, 2006).

Figura 17: Níveis plasmáticos de AST (aspartato aminotransferase) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) AST dos machos em 30 dias. (B) AST das fêmeas em 30 dias. (C) AST dos machos em 60 dias. (D) AST das fêmeas em 60 dias. (E) AST dos machos em 90 dias. (F) AST das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls); a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo, c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 12,5, e =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 50. Média do valor de normalidade: 111,0 U/L para machos e 115,0 U/L para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

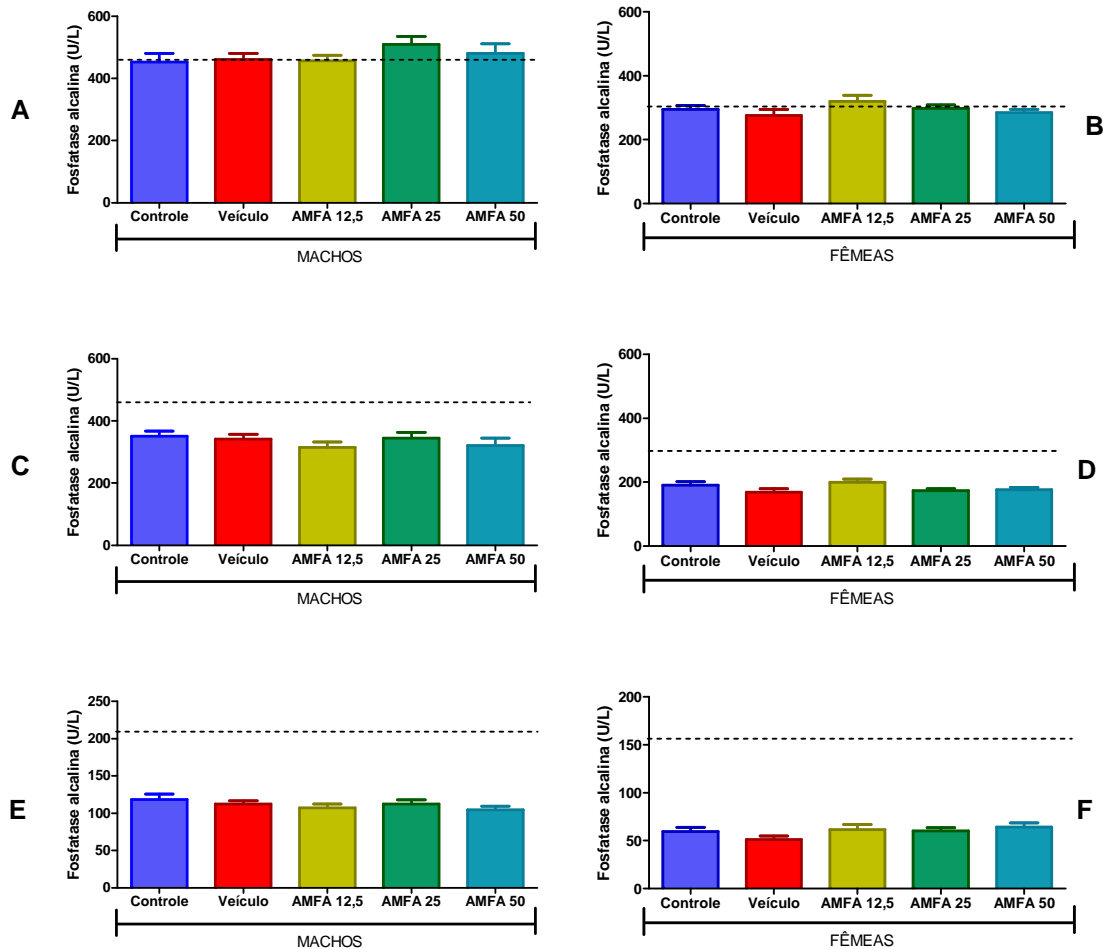
Figura 18: Níveis plasmáticos de ALT (alanina aminotransferase) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) ALT dos machos em 30 dias. (B) ALT das fêmeas em 30 dias. (C) ALT dos machos em 60 dias. (D) ALT das fêmeas em 60 dias. (E) ALT dos machos em 90 dias. (F) ALT das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls); a=  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo, c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 12,5, d =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 25, e =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 50. Média do valor de normalidade: 35,0 U/L para machos e 31,0 U/L para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

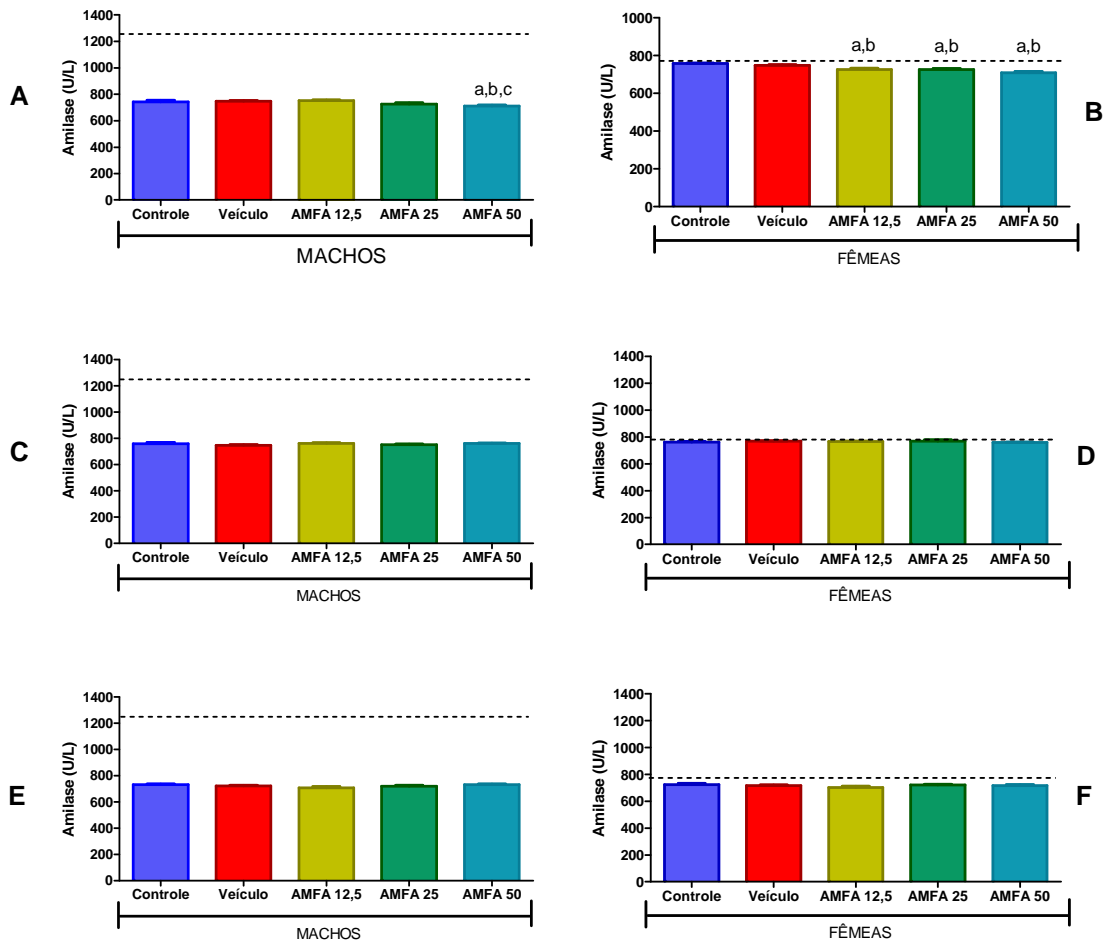


Figura 19: Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



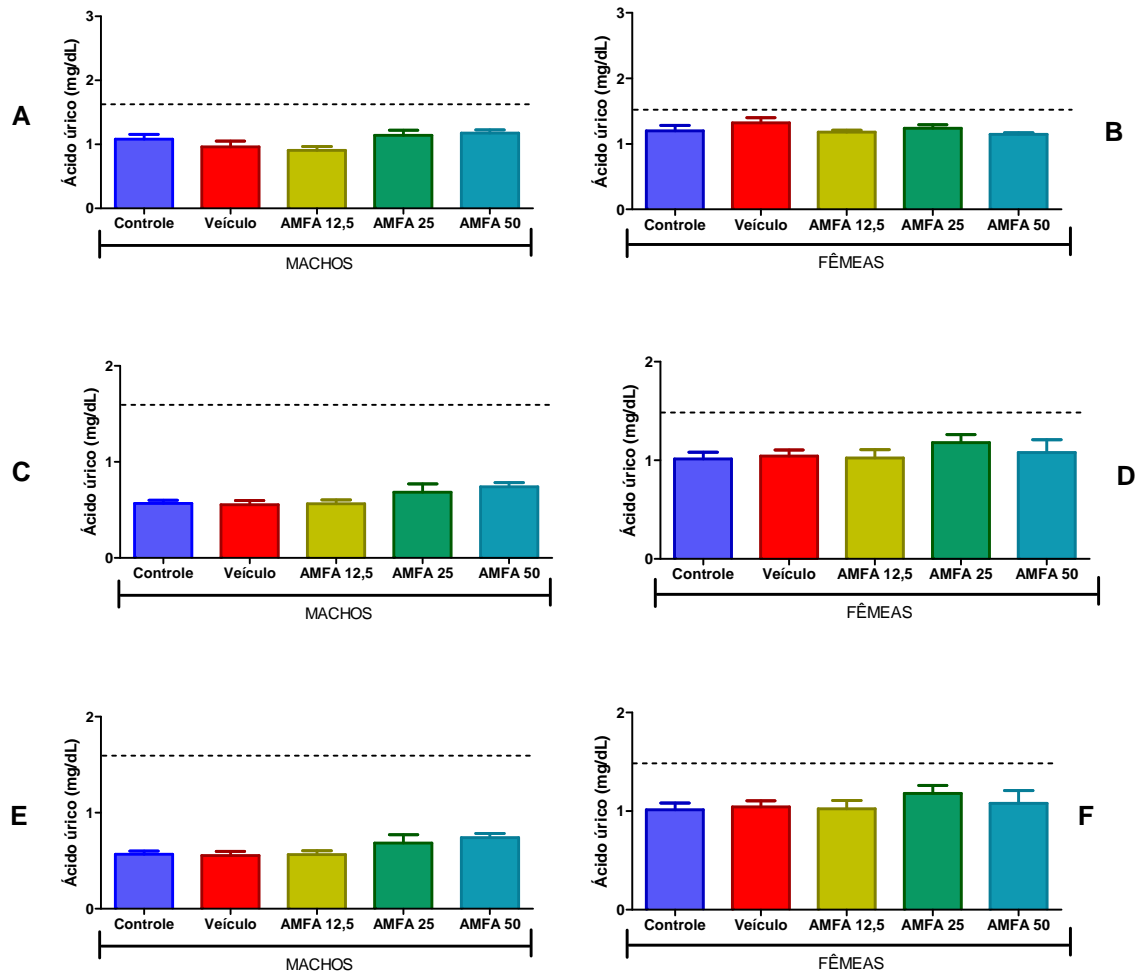
(A) Fosfatase alcalina dos machos em 30 dias. (B) Fosfatase alcalina das fêmeas em 30 dias. (C) Fosfatase alcalina dos machos em 60 dias. (D) Fosfatase alcalina das fêmeas em 60 dias. (E) Fosfatase alcalina dos machos em 90 dias. (F) Fosfatase alcalina das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 462,3 U/L para machos e 303,7 U/L para fêmeas (OZGUR *et al.*, 2006).

Figura 20: Níveis plasmáticos de amilase pancreática de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) Amilase pancreática dos machos em 30 dias. (B) Amilase pancreática das fêmeas em 30 dias. (C) Amilase dos machos em 60 dias. (D) Amilase das fêmeas em 60 dias. (E) Amilase dos machos em 90 dias. (F) Amilase das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls); a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo, c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 12,5. Média do valor de normalidade: 1252,0 U/L para machos e 771,0 U/L para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 21: Níveis plasmáticos de ácido úrico de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) Ácido úrico dos machos em 30 dias. (B) Ácido úrico das fêmeas em 30 dias. (C) Ácido úrico dos machos em 60 dias. (D) Ácido úrico das fêmeas em 60 dias. (E) Ácido úrico dos machos em 90 dias. (F) Ácido úrico das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 771,0 U/L para ambos os sexos (SUCKOW *et al.*, 2006).

O extrato acetônico de *Annona muricata* L. promoveu algumas alterações estatisticamente significantes no hemograma dos animais tratados por 90 dias. Os índices hematimétricos analisados foram VCM, HCM e CHCM, além dos parâmetros hemoglobina, hematócrito, número de hemácias, leucócitos e plaquetas.

A contagem de hemácias (Figura 22), a concentração da hemoglobina (Figura 24), a hemoglobina corpuscular média (Figura 25), a concentração hemoglobínica corpuscular média (Figura 27), o percentual de monócitos (Figura 31), o percentual de eosinófilos (Figura 32), a concentração de plaquetas (Figura 33) e a amplitude de distribuição de hemácias (Figura 34) não foram alterados durante os 90 dias de análise.

De acordo com a Figura 28C, tem-se que a contagem de leucócitos dos machos, após 60 dias de tratamento com AMFA nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg, diminuíram em relação ao grupo controle. Entretanto, é importante destacar que aos 90 dias de experimentação os níveis desse parâmetro retornaram aos valores basais do grupo controle (Figura 28E). Nas fêmeas não foram visualizadas alterações significativas desse parâmetro em nenhum dos períodos e doses estudados (Figuras 28B, 28D e 28F).

Em relação ao hematócrito, observou-se nos machos uma redução significativa aos 60 e 90 dias de experimentação nos animais tratados com AMFA 25 mg/kg e 50 mg/kg quando comparado ao grupo controle, enquanto que a dose de 12,5 mg/kg apresentou decréscimo significativo somente após 90 dias de tratamento (Figuras 23C e 23E). Nas fêmeas, a diminuição ocorreu com a dose maior de AMFA somente após 60 dias de tratamento, retornando aos níveis do controle ao final do estudo (Figuras 23D e 23F).

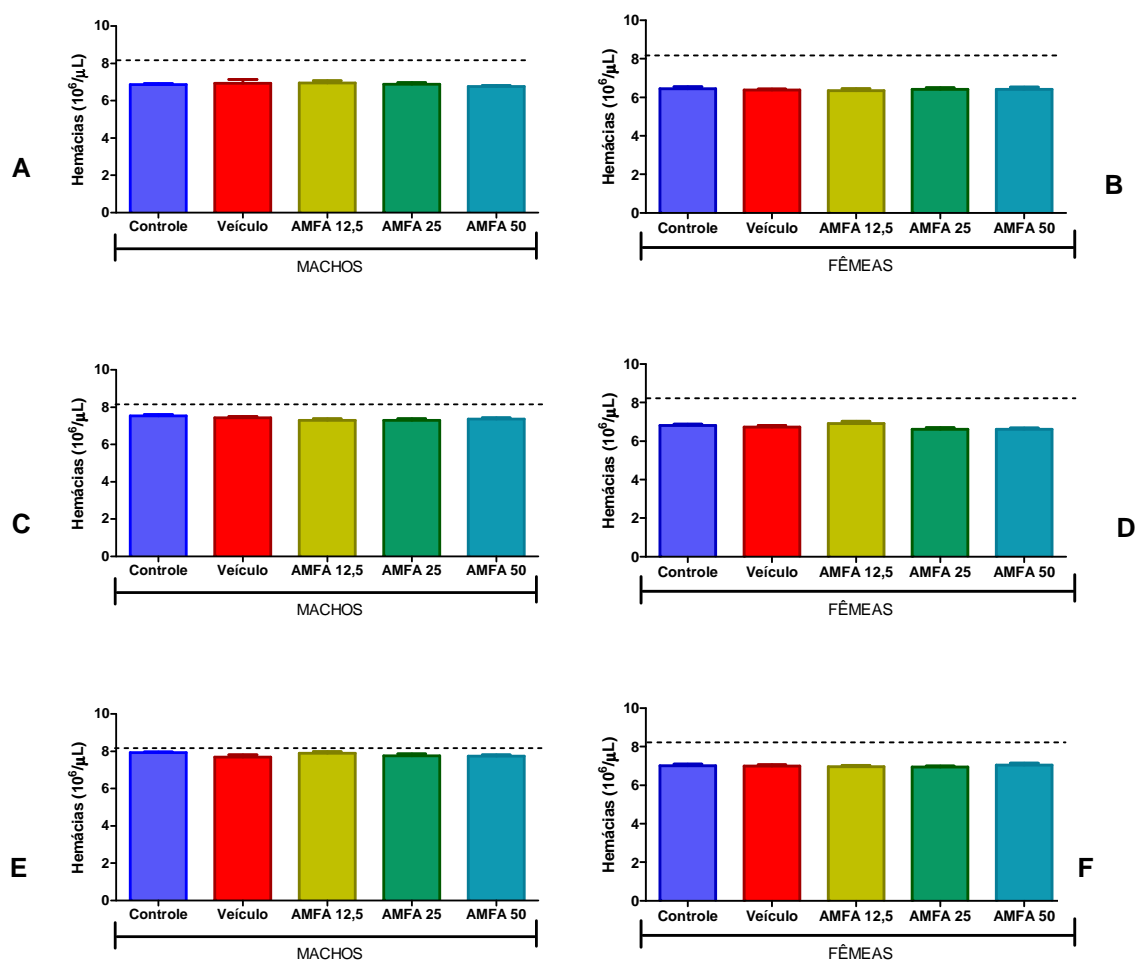
O volume corpuscular médio (VCM) foi alterado pela administração diária do extrato acetônico de *Annona muricata* L. Nos machos observou-se uma redução significativa desse parâmetro hematológico nas três doses estudadas no período correspondente a 30 dias de tratamento (Figura 26A). A redução persistiu após 60 e 90 dias de experimento, somente com a maior dose do extrato testada (Figuras 26C e 26E). Nas fêmeas, verificou-se também uma diminuição do VCM que foi significativa somente no grupo tratado com AMFA 50 mg/kg, ou seja, a maior dose (Figuras 26B, 26D e 26F).

Tanto no grupo dos machos quanto das fêmeas observaram-se alterações nos segmentados e linfócitos (Figuras 29 e 30, respectivamente). Aos 90 dias de tratamento com as três doses de AMFA constatou-se um aumento significativo no número de segmentados nos machos (Figura 29E), enquanto que nas fêmeas a elevação foi somente com a dose de

50 mg/kg (Figura 29F). As doses de 25 e 50 mg/kg do extrato em estudo foi capaz de reduzir o percentual de linfócitos tanto nos machos quanto nas fêmeas aos 90 dias de experimento quando comparado com o grupo controle (Figura 30).

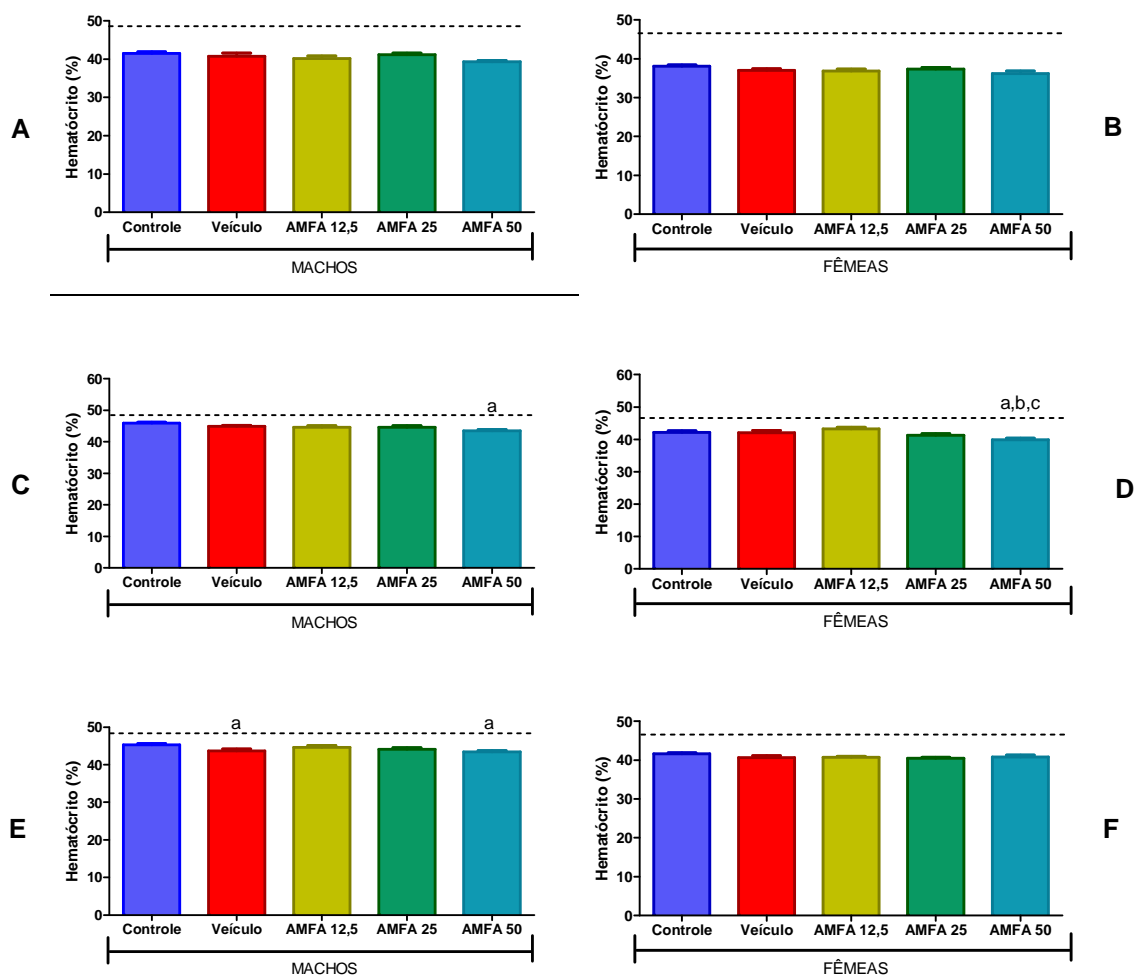
## PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Figura 22: Número de hemácias de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



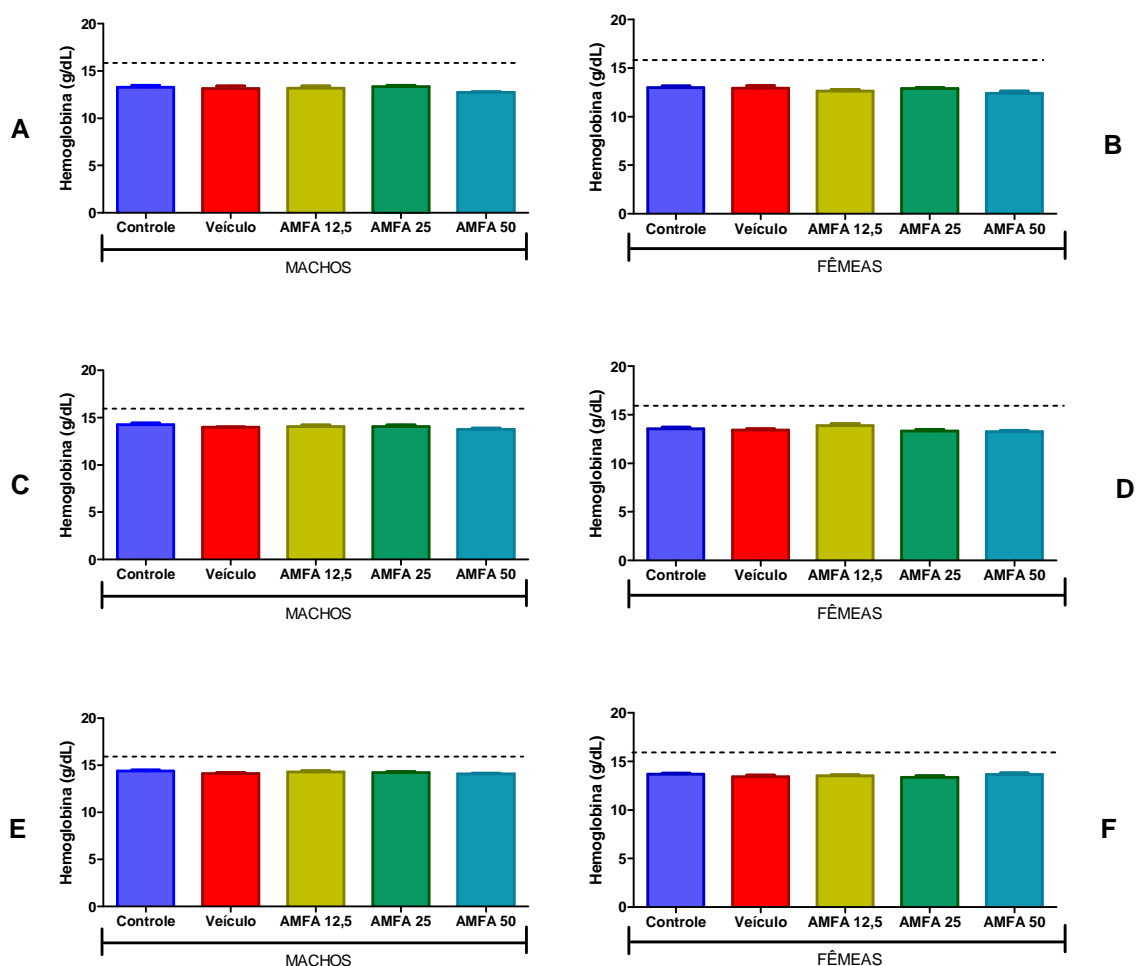
(A) Número de hemácias dos machos em 30 dias. (B) Número de hemácias das fêmeas em 30 dias. (C) Número de hemácias dos machos em 60 dias. (D) Número de hemácias das fêmeas em 60 dias. (E) Número de hemácias dos machos em 90 dias. (F) Número de hemácias das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais ( $n=10$ ) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade:  $8,14 \times 10^6/\mu\text{L}$  para machos e  $8,19 \times 10^6/\mu\text{L}$  para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 23: Hematócrito de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) Hematócrito dos machos em 30 dias. (B) Hematócrito das fêmeas em 30 dias. (C) Hematócrito dos machos em 60 dias. (D) Hematócrito das fêmeas em 60 dias. (E) Hematócrito dos machos em 90 dias. (F) Hematócrito das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo, c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 12,5. Média do valor de normalidade: 48,5% para machos e 46,5% para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

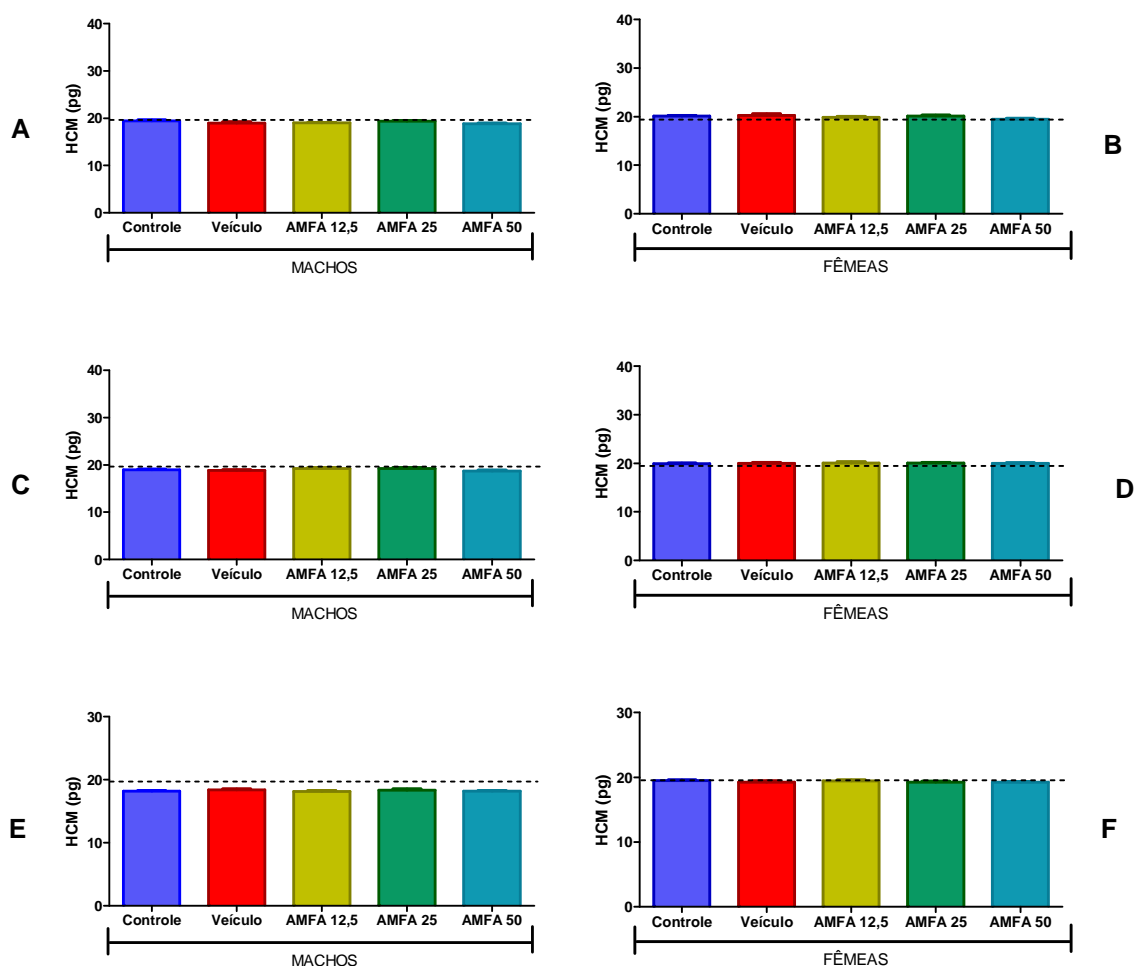
Figura 24: Valores de hemoglobina de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) Hemoglobina dos machos em 30 dias. (B) Hemoglobina das fêmeas em 30 dias. (C) Hemoglobina dos machos em 60 dias. (D) Hemoglobina das fêmeas em 60 dias. (E) Hemoglobina dos machos em 90 dias. (F) Hemoglobina das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais ( $n=10$ ) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls). Média do valor de normalidade: 15,9 g/dL para ambos os sexos (SUCKOW *et al.*, 2006).

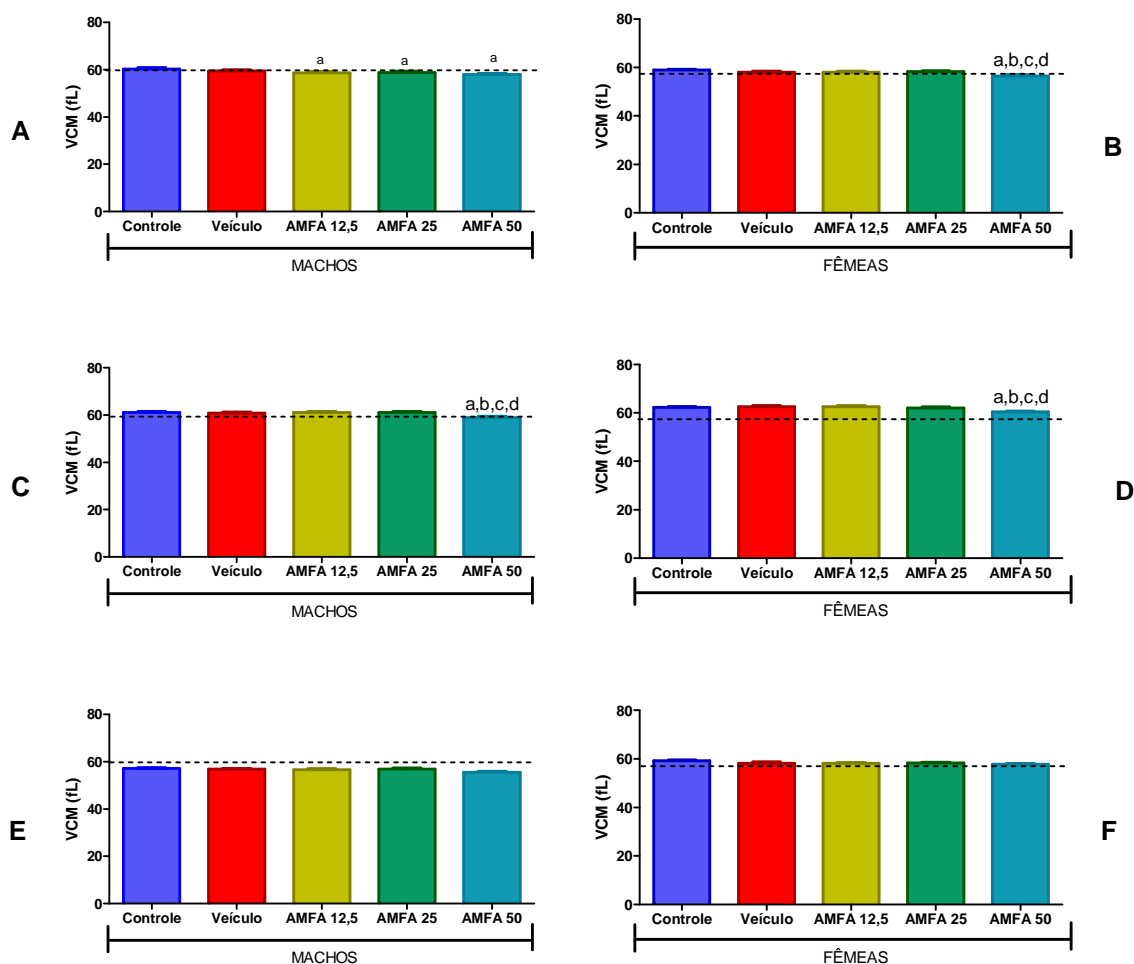


Figura 25: Hemoglobina corpuscular média (HCM) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



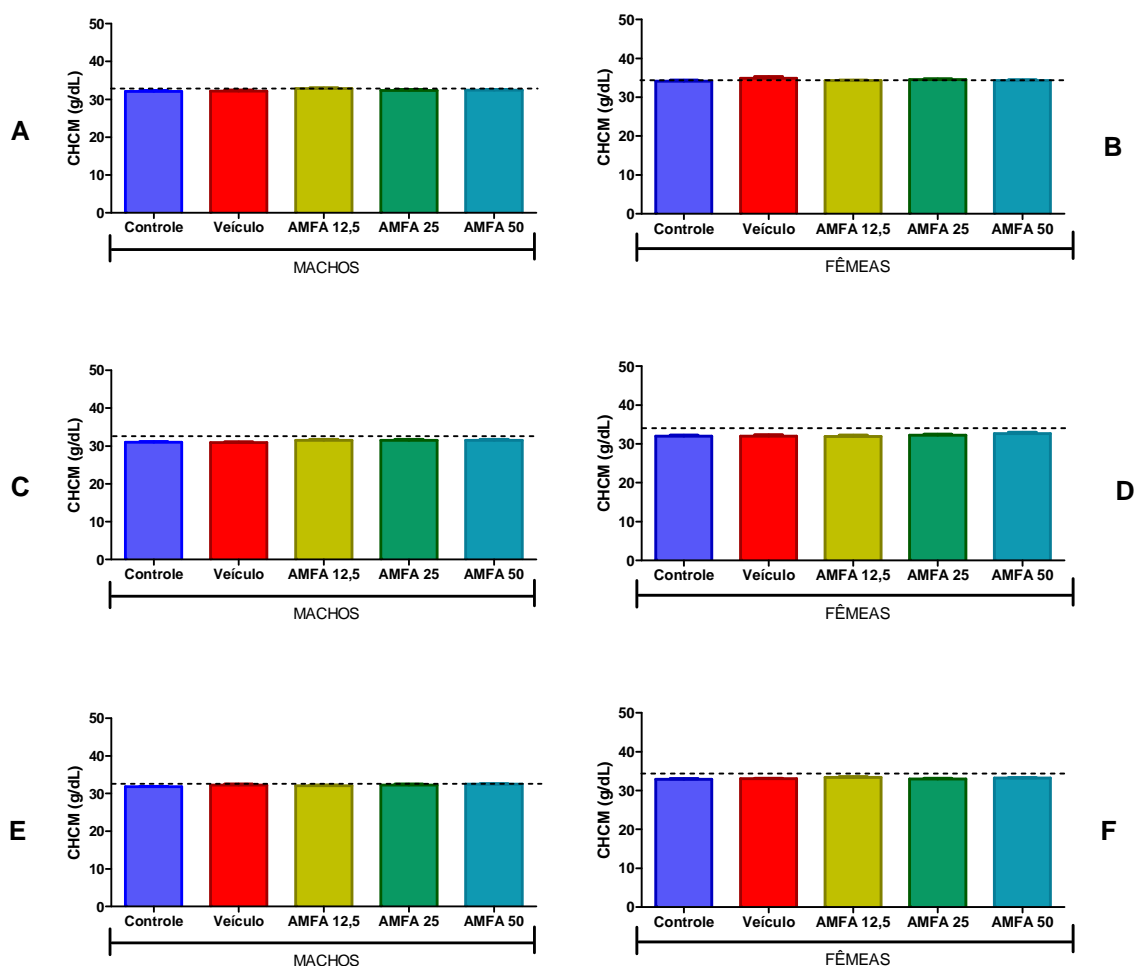
(A) Hemoglobina corpuscular média (HCM) dos machos em 30 dias. (B) Hemoglobina corpuscular média (HCM) das fêmeas em 30 dias. (C) Hemoglobina corpuscular média (HCM) dos machos em 60 dias. (D) Hemoglobina corpuscular média (HCM) das fêmeas em 60 dias. (E) Hemoglobina corpuscular média (HCM) dos machos em 90 dias. (F) Hemoglobina corpuscular média (HCM) das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais ( $n=10$ ) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 19,6 pg para machos e 19,5 pg para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 26: Volume corpuscular médio (VCM) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



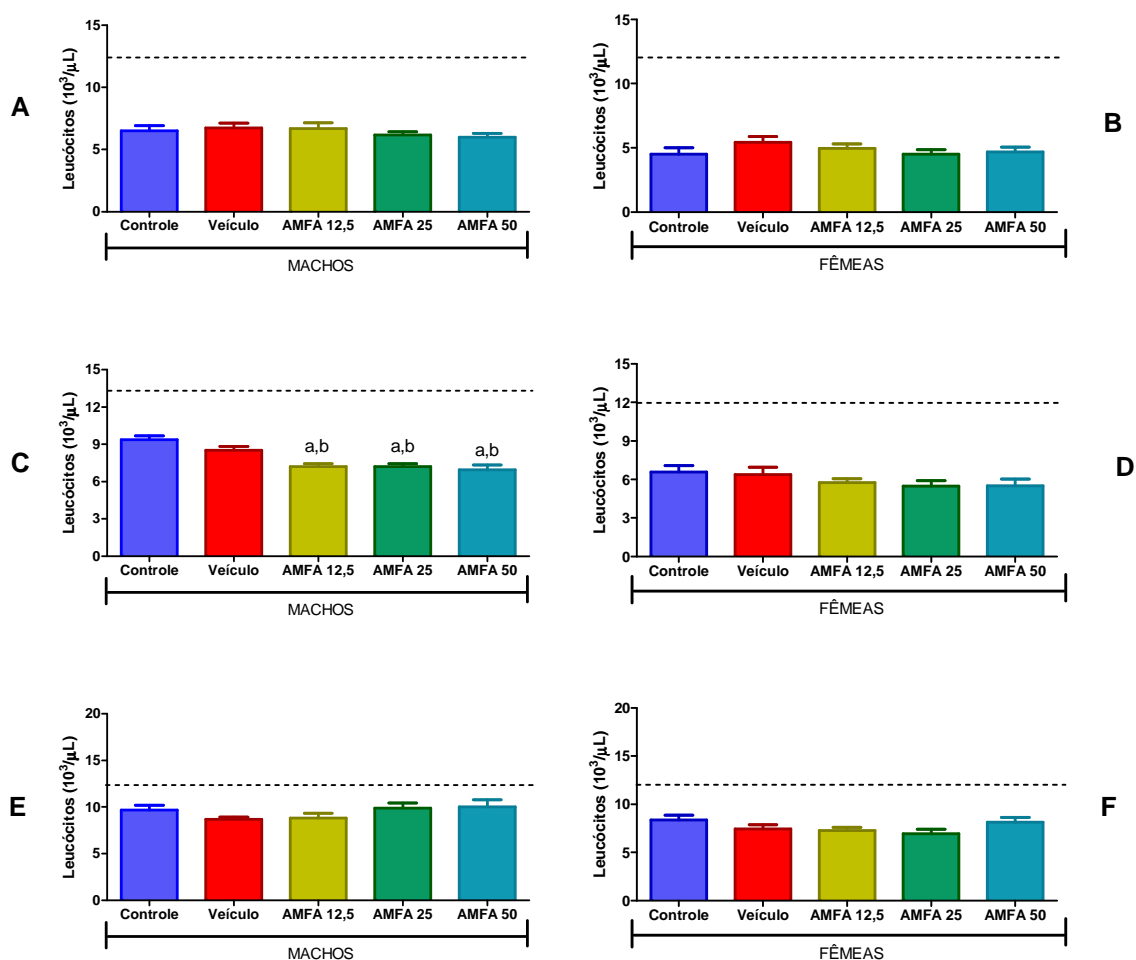
(A) Volume corpuscular médio (VCM) dos machos em 30 dias. (B) Volume corpuscular médio (VCM) das fêmeas em 30 dias. (C) Volume corpuscular médio (VCM) dos machos em 60 dias. (D) Volume corpuscular médio (VCM) das fêmeas em 60 dias. (E) Volume corpuscular médio (VCM) dos machos em 90 dias. (F) Volume corpuscular médio (VCM) das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls); a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo, c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 12,5, d =  $p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 25. Média do valor de normalidade: 56,9 fL para ambos os sexos (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 27: Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



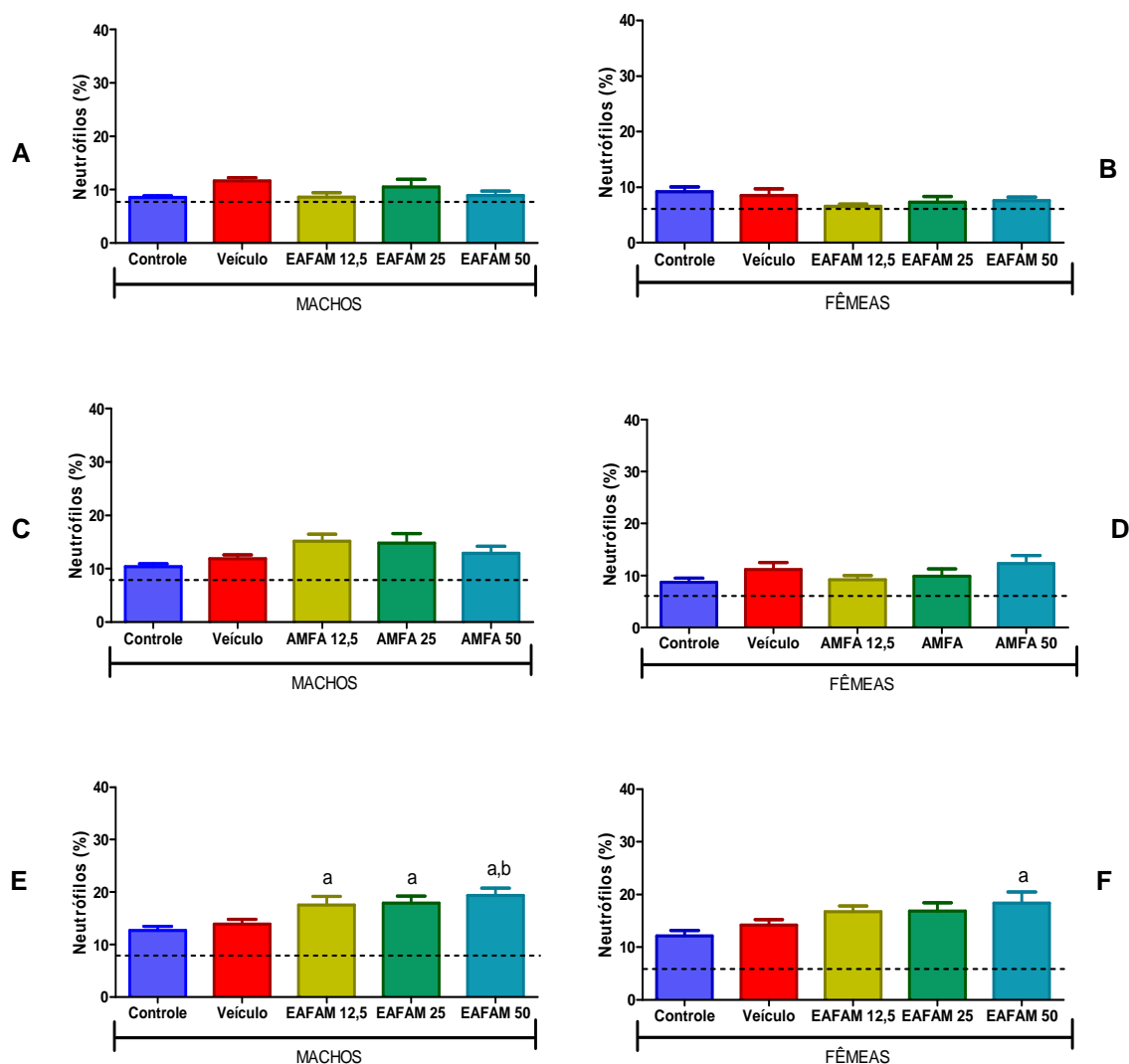
(A) Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) dos machos em 30 dias. (B) Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) das fêmeas em 30 dias. (C) Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) dos machos em 60 dias. (D) Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) das fêmeas em 60 dias. (E) Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) dos machos em 90 dias. (F) Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 32,8 g/dL para machos e 34,3 g/dL para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 28: Número de leucócitos totais de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



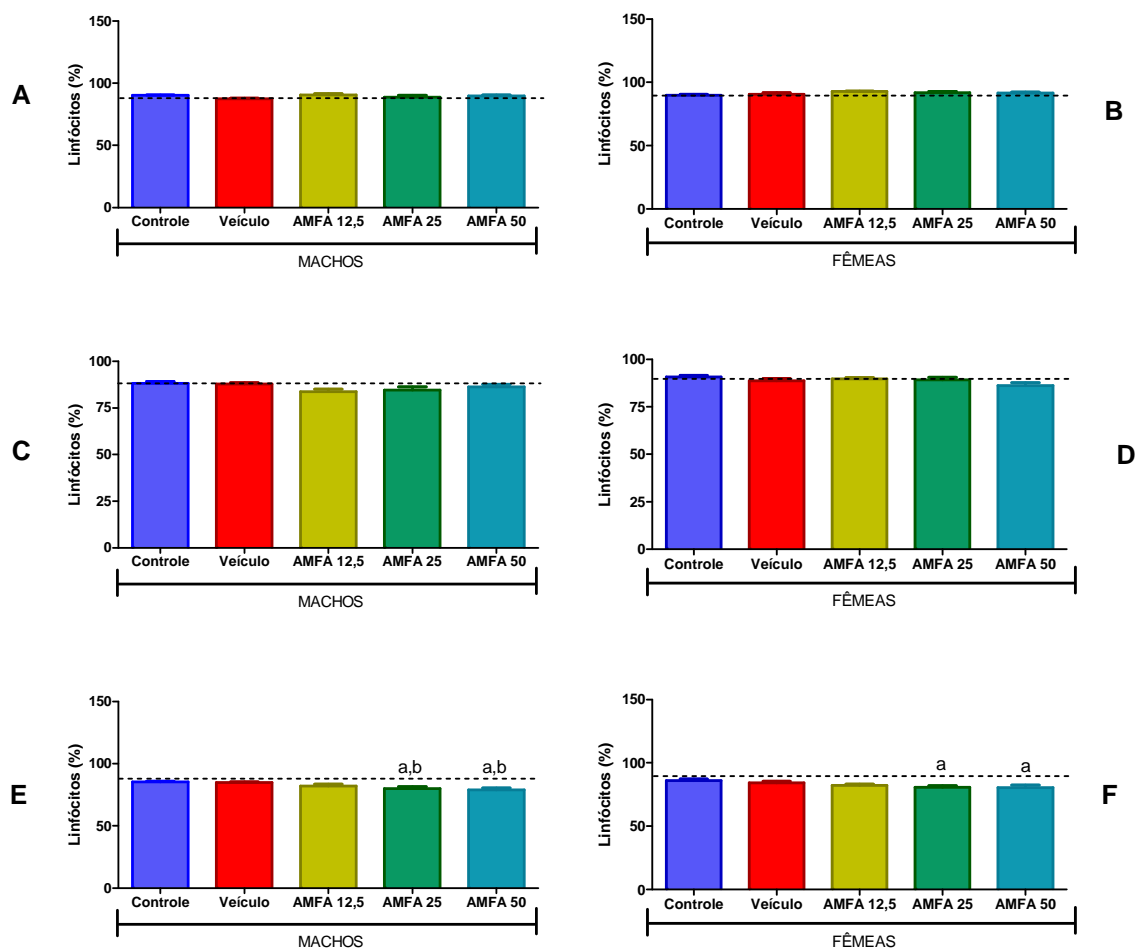
(A) Leucócitos totais dos machos em 30 dias. (B) Leucócitos totais das fêmeas em 30 dias. (C) Leucócitos totais dos machos em 60 dias. (D) Leucócitos totais das fêmeas em 60 dias. (E) Leucócitos totais dos machos em 90 dias. (F) Leucócitos totais das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais ( $n=10$ ) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade:  $12,43 \times 10^3/\mu\text{L}$  para machos e  $12,02 \times 10^3/\mu\text{L}$  para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 29: Percentual de neutrófilos de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



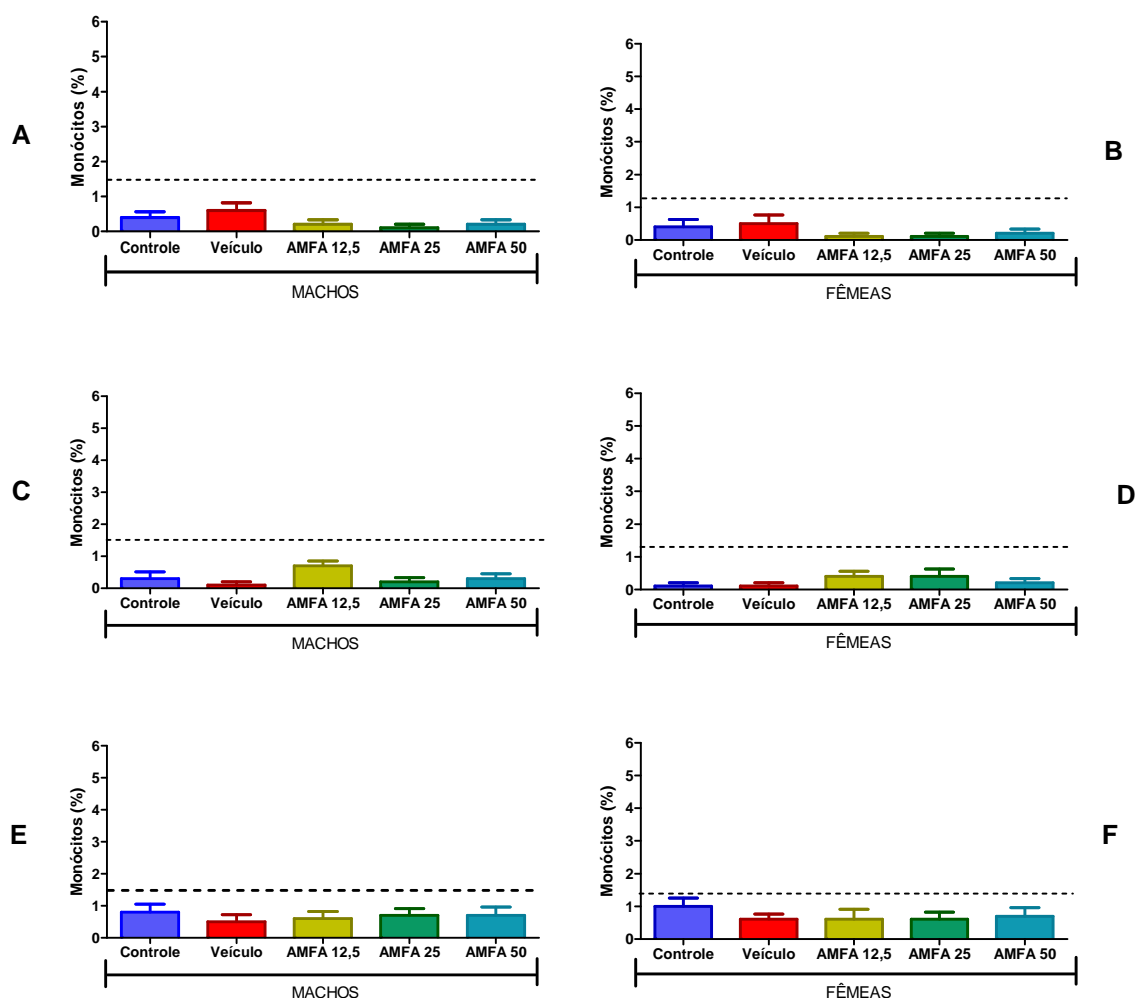
(A) Percentual de neutrófilos dos machos em 30 dias. (B) Percentual de neutrófilos das fêmeas em 30 dias. (C) Percentual de neutrófilos dos machos em 60 dias. (D) Percentual de neutrófilos das fêmeas em 60 dias. (E) Percentual de neutrófilos dos machos em 90 dias. (F) Percentual de neutrófilos das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo. Média do valor de normalidade: 7,9% para machos e 6,0% para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 30: Percentual de linfócitos de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



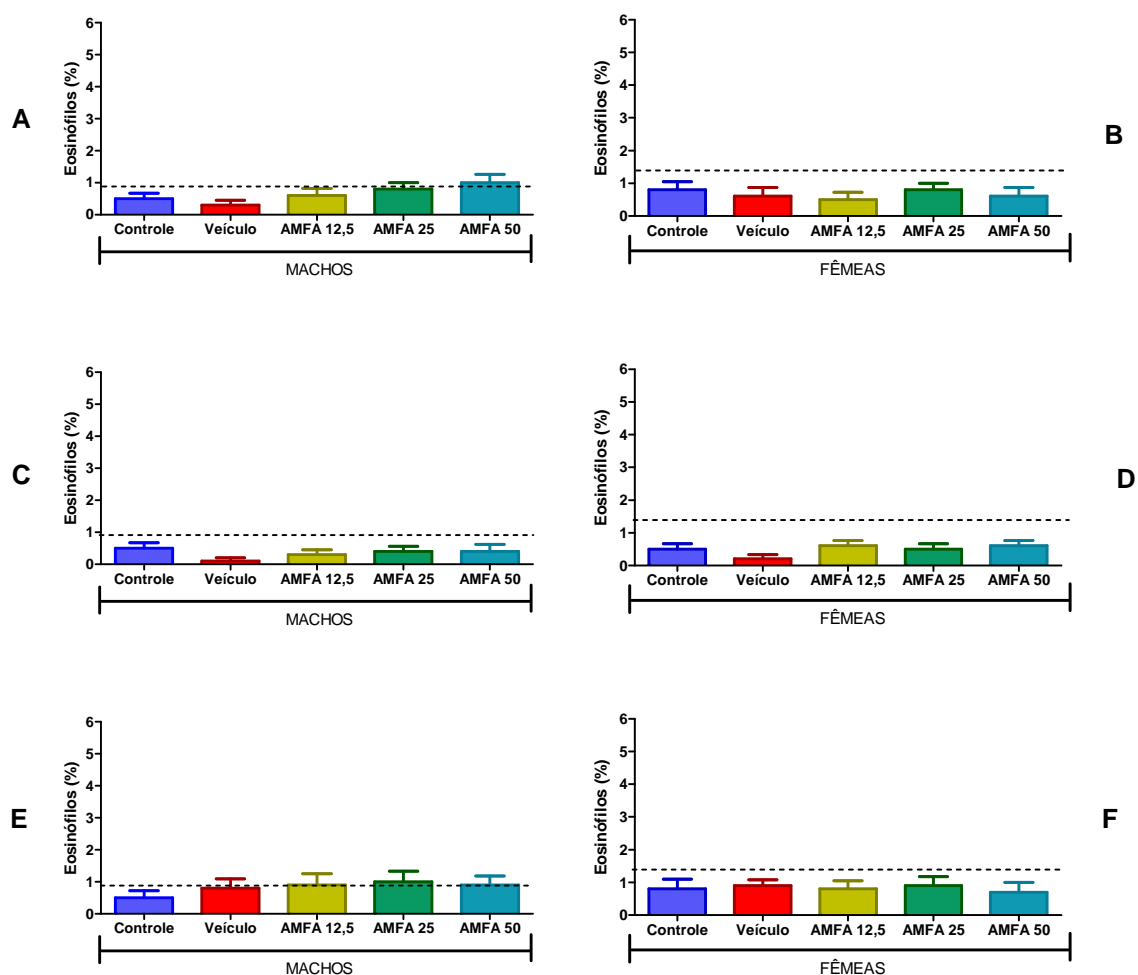
(A) Percentual de linfócitos dos machos em 30 dias. (B) Percentual de linfócitos das fêmeas em 30 dias. (C) Percentual de linfócitos dos machos em 60 dias. (D) Percentual de linfócitos das fêmeas em 60 dias. (E) Percentual de linfócitos dos machos em 90 dias. (F) Percentual de linfócitos das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo. Média do valor de normalidade: 88,0% para machos e 89,9% para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 31: Percentual de monócitos de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) Percentual de monócitos dos machos em 30 dias. (B) Percentual de monócitos das fêmeas em 30 dias. (C) Percentual de monócitos dos machos em 60 dias. (D) Percentual de monócitos das fêmeas em 60 dias. (E) Percentual de monócitos dos machos em 90 dias. (F) Percentual de monócitos das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 1,5% para machos e 1,3% para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

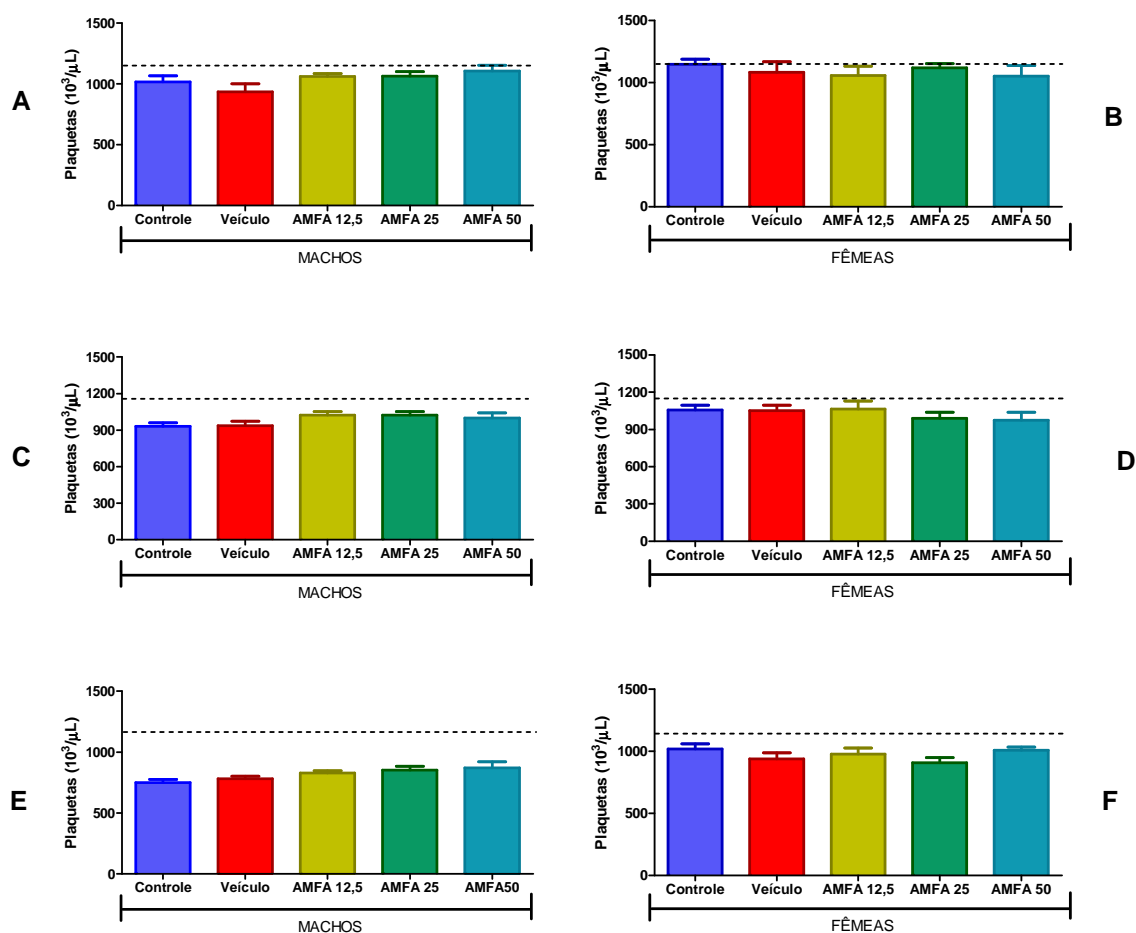
Figura 32: Percentual de eosinófilos de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) Percentual de eosinófilos dos machos em 30 dias. (B) Percentual de eosinófilos das fêmeas em 30 dias. (C) Percentual de eosinófilos dos machos em 60 dias. (D) Percentual de eosinófilos das fêmeas em 60 dias. (E) Percentual de eosinófilos dos machos em 90 dias. (F) Percentual de eosinófilos das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 0,9% para machos e 1,4% para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

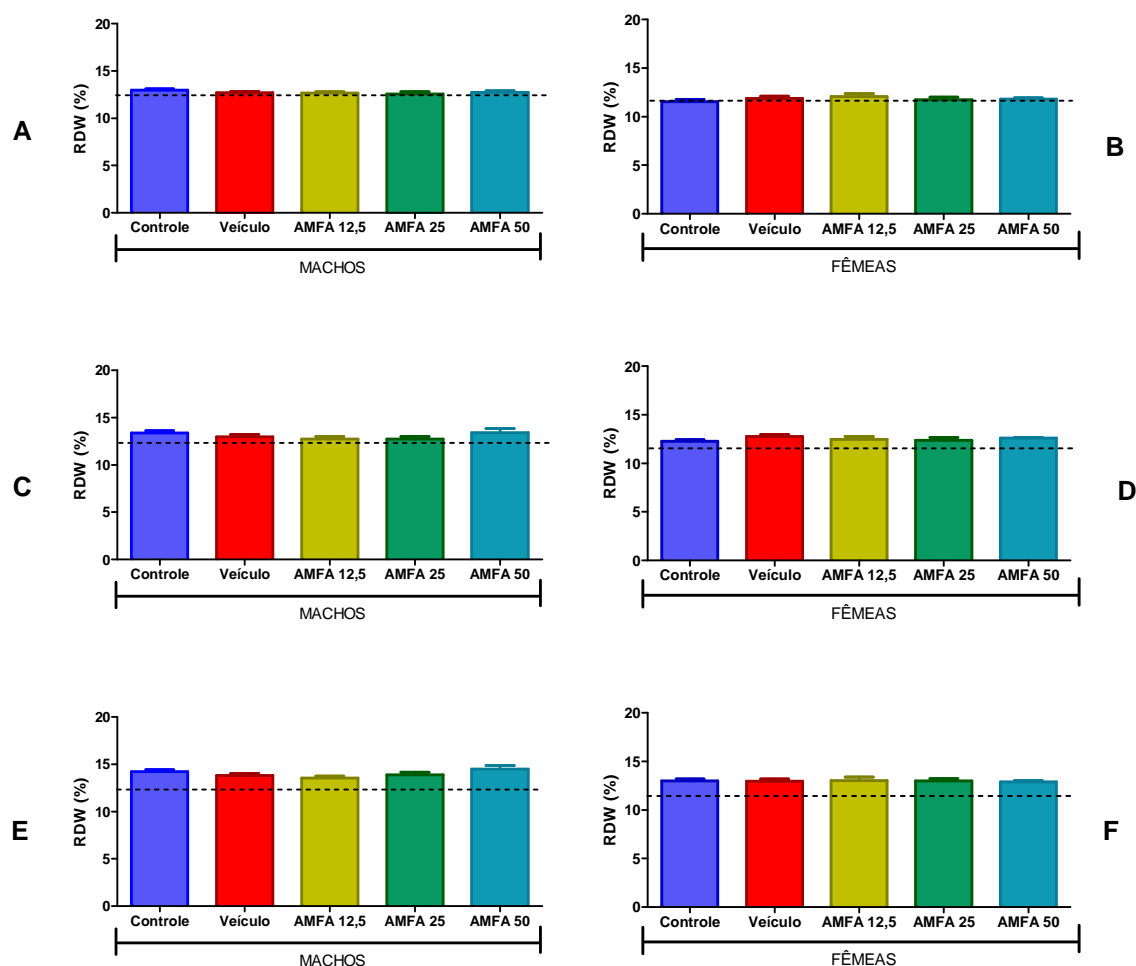


Figura 33: Número de plaquetas de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).



(A) Número de plaquetas dos machos em 30 dias. (B) Número de plaquetas das fêmeas em 30 dias. (C) Número de plaquetas dos machos em 60 dias. (D) Número de plaquetas das fêmeas em 60 dias. (E) Número de plaquetas dos machos em 90 dias. (F) Número de plaquetas das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais ( $n=10$ ) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade:  $1159 \times 10^3/\mu\text{L}$  para machos e  $1146 \times 10^3/\mu\text{L}$  para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

Figura 34: Amplitude de distribuição das hemácias (red cell distribution width - RDW) de machos e fêmeas após tratamento por 30, 60 e 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou água potável (controle).

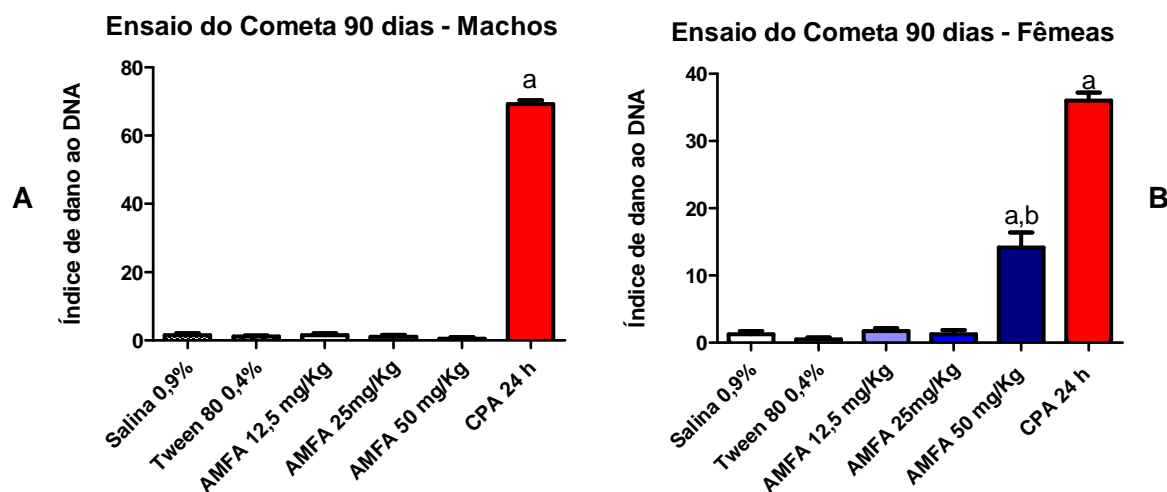


(A) Amplitude de distribuição das hemácias (red cell distribution width - RDW) dos machos em 30 dias. (B) Amplitude de distribuição das hemácias (red cell distribution width - RDW) das fêmeas em 30 dias. (C) Amplitude de distribuição das hemácias (red cell distribution width - RDW) dos machos em 60 dias. (D) Amplitude de distribuição das hemácias (red cell distribution width - RDW) das fêmeas em 60 dias. (E) Amplitude de distribuição das hemácias (red cell distribution width - RDW) dos machos em 90 dias. (F) Amplitude de distribuição das hemácias (red cell distribution width - RDW) das fêmeas em 90 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). Média do valor de normalidade: 12,4% para machos e 11,5% para fêmeas (SUCKOW *et al.*, 2006).

#### 4.4 ENSAIO DO COMETA

No ensaio do cometa, observou-se que, nas fêmeas, o AMFA, na dose de 50 mg/Kg, provocou danos ao DNA celular do sangue dos camundongos, havendo a formação do cometa com escores 3 e 4 (Figura 35B). Nas amostras do controle positivo, Ciclofosfamida 25 mg/Kg, verificou-se que, de 100 células contadas em cada animal, a maioria recebeu escores 2, 3 e 4. Já as amostras da Salina 0,9% e Tween 80 0,4% apresentaram células cujos escores, em sua grande maioria foi zero (Figura 36B), havendo apenas raros casos de escores tipo 1 (Figura 36A). Dessa forma, as análises estatísticas evidenciaram uma semelhança entre as doses de 12,5 mg/Kg e 25 mg/Kg e o controle negativo e o Tween 80 0,4%, com um  $P > 0,05$ ; em relação ao controle positivo, houve diferença estatisticamente significativa, com um  $P < 0,05$ . Os resultados sugerem que apenas a dose de 50 mg/Kg apresenta ação genotóxica, porém menos danosa que o controle positivo.

Figura 35: Ensaio do cometa *in vivo* do AMFA após tratamento por 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos e fêmeas.

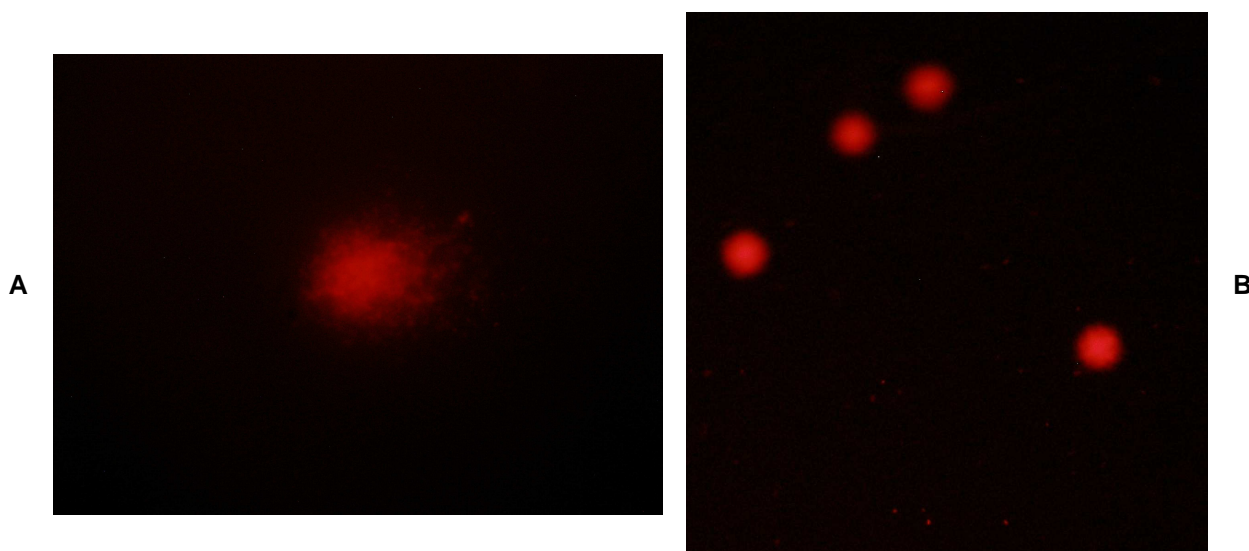


(A) Ensaio do Cometa realizado em ratos machos; (B) Ensaio do Cometa realizado em ratos fêmeas. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg, CPA 24h = Ciclofosfamida administrada durante 24 horas (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo, b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo CPA 24h.

Nos animais machos, o AMFA não provocou danos ao DNA celular do sangue dos camundongos, não havendo a formação do cometa (Figura 35A). No controle positivo, Ciclofosfamida 25 mg/Kg, verificou-se que, de 100 células contadas em cada animal, a maioria recebeu escores 2, 3 e 4. Já as amostras do controle negativo e Tween 80 0,4% apresentaram células cujos escores, em sua grande maioria foi zero (Figura 36B), havendo apenas raros casos de escores tipo 1 (Figura 36A). Dessa forma, as análises estatísticas mostraram uma semelhança entre as doses de 12,5 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg e o controle negativo e o Tween 80 0,4%, com um  $P > 0,05$ ; em relação ao controle positivo, houve diferença estatisticamente significativa, com um  $P < 0,05$ . Os resultados sugerem que nenhuma das doses testadas apresenta ação genotóxica nos animais machos.

Diante dos resultados, observa-se uma diferença na toxicidade do AMFA na dose de 50 mg/Kg em relação ao sexo, fato que necessita de estudos mais específicos para ser confirmado.

Figura 36: Ensaio do cometa *in vivo* do AMFA após tratamento por 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos e fêmeas.



(A) Microfotografia retrando exemplo de cometa do tipo I; (B) Microfotografia retratando cometas do tipo 0.

#### 4.5 ENSAIO DO MICRONÚCLEO

Os animais utilizados no ensaio de toxicidade crônica durante 90 dias foram usados para avaliar se o tratamento em doses repetidas poderia causar algum dano genotóxico em

sua medula. Ao final do experimento de 90 dias, os animais foram sacrificados e suas medulas processadas no ensaio do micronúcleo. Apenas os animais que receberam a Ciclofosfamida foram tratados por apenas um dia, sendo o primeiro grupo sacrificado 24 horas após a administração da Ciclofosfamida e o segundo grupo sacrificado 48 horas após a administração da mesma. A Ciclofosfamida foi administrada de forma aguda por ser uma substância que, em dose única, causa efeitos genotóxicos nos animais, o que inviabiliza a sua administração em doses repetidas. Cerca de 1.000 eritrócitos policromáticos (EPC) foram contados e analisados por animal.

No grupo de animais machos, não foram observados a formação estatisticamente significativa de micronúcleos em nenhuma das doses administradas, exceto nos controles positivos, como já era esperado (Tabela 8).

No grupo das fêmeas, o mesmo resultado foi observado, com exceção do controle positivo. O efeito genotóxico da Ciclofosfamida mostrou-se de forma tempo-dependente no grupo das fêmeas, havendo diferença estatisticamente significativa entre os animais sacrificados em 24 e 48 horas (Tabela 8).

Observou-se, ao final do experimento que o AMFA não apresenta características genotóxicas nas doses administradas e no tempo avaliado. Os dados de ambos os sexos estão representados na tabela 8.

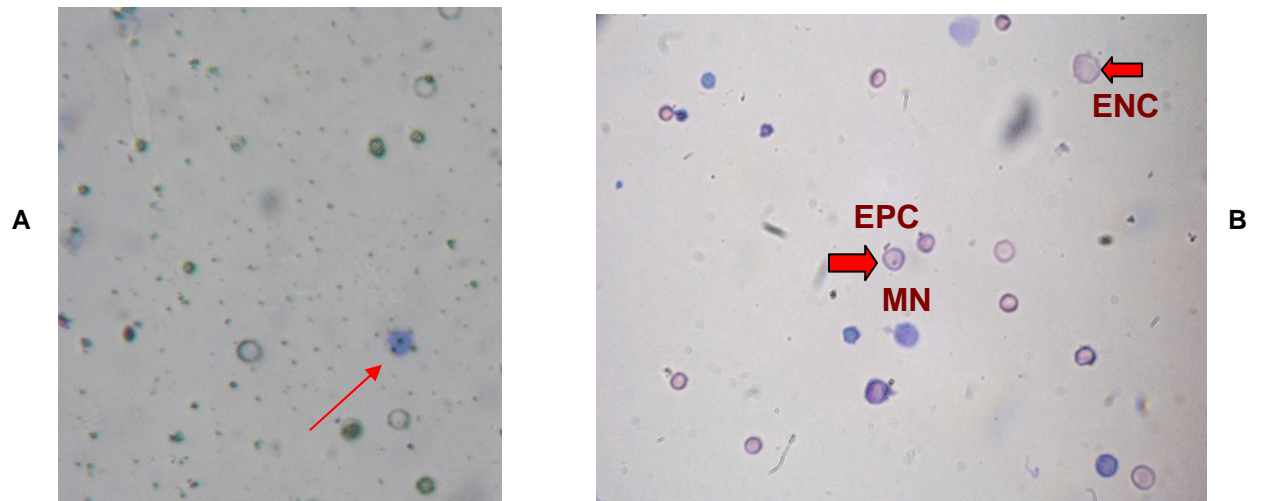
A figura 37A mostra a fotomicrografia de um eritrócito policromático (EPC) encontrado em uma amostra testada. A figura 37B mostra a diferença de coloração de um eritrócito policromático (EPC) com um micronúcleo e de um eritrócito normocromático (ENC).

Tabela 8: Ensaio do micronúcleo *in vivo* do AMFA após tratamento por 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos e fêmeas.

Grupo	Tratamento (mg/kg)	Sexo	Tempo <sup>c</sup> (dias)	Micronúcleos/1.000 EPC/animal					Média ± D.P.
				Dados individuais					
Salina	-		90	0	0	0	0	0	0,00
Tween 80 0,4%	-		90	1	2	0	1	0	0,8000 ± 0,8367
	25		1	9	11	13	12	10	11,00 ± 1,581 <sup>a</sup>
CP	25	M	2	11	14	10	11	13	11,80 ± 1,643 <sup>a</sup>
	12,5		90	2	0	0	1	0	0,600 ± 0,8944
AMFA	25		90	2	0	0	1	0	0,600 ± 0,8944
	50		90	0	0	0	1	1	0,400 ± 0,5477
Salina	-		90	0	0	0	0	0	0,00
Tween 80 0,4%	-		90	2	0	0	0	1	0,600 ± 0,8944
	25		1	12	11	13	11	13	12,00 ± 1,00 <sup>a</sup>
CP	25	F	2	10	11	12	9	8	10,00 ± 1,581 <sup>a,b</sup>
	12,5		90	0	1	0	0	0	0,20 ± 0,4472
AMFA	25		90	0	0	0	2	0	0,40 ± 0,8944
	50		90	0	1	1	1	1	0,80 ± 0,4472

Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média ± erro padrão da média (E.P.M.), onde AMFA 12,5 = AMFA 12,5 mg/kg, AMFA 25 = AMFA 25 mg/kg, AMFA 50 = AMFA 50 mg/kg, CPA 24h = Ciclofosfamida administrada durante 24 horas (ANOVA e pós-teste de Newman-keuls). a = p<0,05 em relação ao grupo veículo, b = p<0,05 em relação ao grupo CPA 24h, c= tempo de administração medido em dias.

Figura 37: Ensaio do micronúcleo in vivo do AMFA após tratamento por 90 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos e fêmeas.



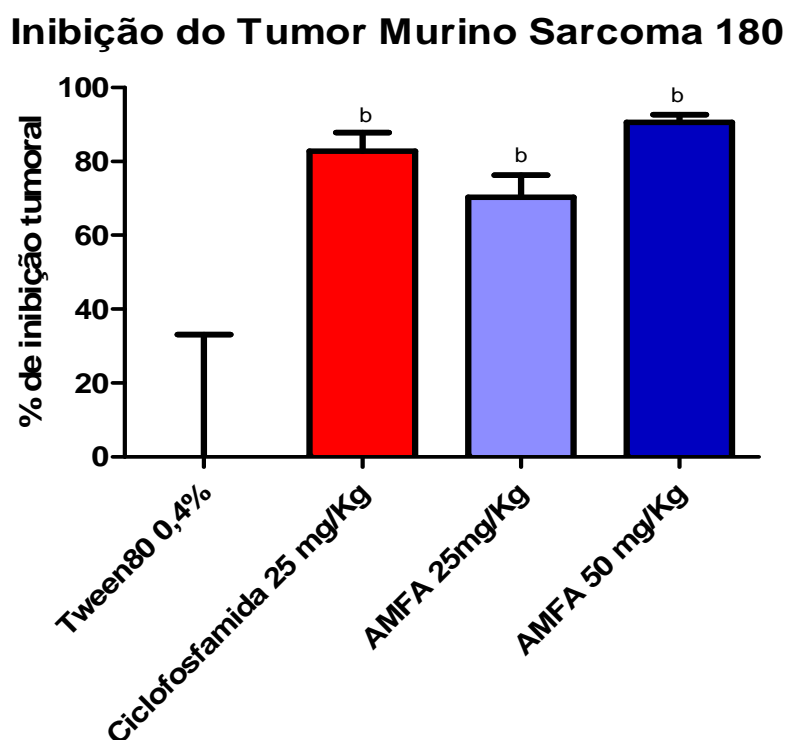
(A) Microfotografia retrando exemplo de eritrócitos policromáticos (EPC) apresentando micronúcleo.  
(B) Microfotografia de eritrócitos policromáticos (EPC) apresentando micronúcleo e eritrócitos normocromáticos (ENC).

## 4.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

### 4.6.1 Avaliação do Efeito do AMFA em Camundongos Transplantados com Sarcoma 180.

No ensaio antitumoral contra Sarcoma 180, o AMFA mostrou ter efeito inibidor do crescimento tumoral contra o tumor murino nas duas doses testadas. A maior dose utilizada teve um efeito inibitório no crescimento tumoral semelhante ao da Ciclofosfamida, que foi usada como controle positivo (Figura 38). Além do visível efeito inibidor do crescimento tumoral, o AMFA não provocou alteração no peso fresco dos órgãos avaliados no experimento, sendo todos semelhantes ao controle negativo, mesmo o grupo que recebeu a Ciclofosfamida como tratamento (Figura 39).

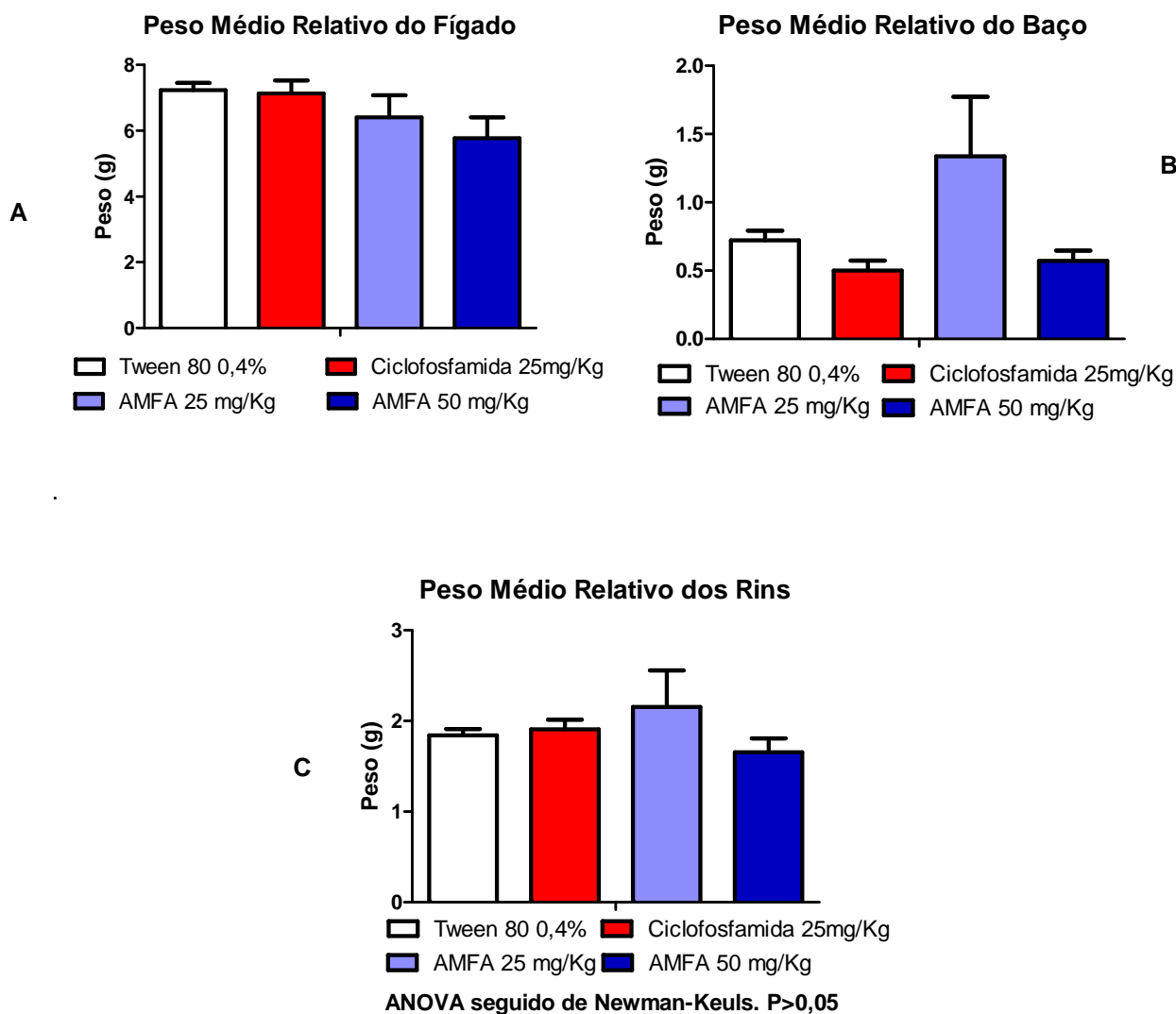
Figura 38: Ensaio antitumoral contra Sarcoma 180 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em camundongos machos. Percentual de inibição do tumor murino Sarcoma 180.



ANOVA, seguido de Newman-Keuls com  $b = P < 0,05$ . 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.  $b = p < 0,05$  em relação ao grupo veículo.



Figura 39: Ensaio antitumoral contra Sarcoma 180 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em camundongos machos.



(A) Peso médio relativo (g/100 g de animal) do fígado nos animais tratados contra tumor murino Sarcoma 180. (B) Peso médio relativo (g/100 g de animal) do baço nos animais tratados contra tumor murino Sarcoma 180. (C) Peso médio relativo (g/100 g de animal) dos rins nos animais tratados contra tumor murino Sarcoma 180. ANOVA, seguido de Newman-Keuls com  $b = P < 0,05$ . 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.

Analisando os parâmetros bioquímicos de função renal como uréia e creatinina, observou-se que somente a dose de 50 mg/Kg diminuiu a dosagem de uréia durante o

ensaio antitumoral que, embora tenha sido estatisticamente significativo, não foi uma diferença tão elevada (Tabela 9).

Analisando os parâmetros bioquímicos de função hepática como ALT e AST, em nenhuma das doses testadas ocorreu alteração dos mesmos (Tabela 9), parece que o AMFA não causou danos no fígado do animal. Entretanto, nos parâmetros bioquímicos de função renal, como uréia e creatinina, houve redução de uréia nos animais que receberam a dose de 50 mg/Kg, o que sugere que possa estar ocorrendo uma alteração metabólica da conversão da amônia em uréia, que é realizada pelo fígado.

Analisando os parâmetros hematológicos, observou-se que as duas doses testadas provocaram o aumento na contagem das plaquetas, entretanto menos significativo que o aumento provocado pela Ciclofosfamida (Tabela 10), além da redução no número de leucócitos e hemácias dos animais tratados com Ciclofosfamida.

Tabela 9: Ensaio antitumoral contra Sarcoma 180 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em camundongos machos. Parâmetros bioquímicos dos animais inoculados com Sarcoma 180.

Tratamento	Parâmetros Bioquímicos			
	AST (U/L)	ALT(U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina(mg/dL)
	Média ± D.P.	Média ± D.P.	Média ± D.P.	Média ± D.P.
<b>Tween 80 0,4%</b>	98,63 ± 5,012	39,50 ± 5,928	32,13 ± 1,959	0,2638 ± 0,019
<b>AMFA 25 mg/Kg</b>	89,63 ± 11,88	39,75 ± 2,816	36,63 ± 4,719	0,270 ± 0,020
<b>AMFA 50 mg/Kg</b>	101,0 ± 6,719	38,88 ± 5,939	26,88 ± 3,091 <sup>d</sup>	0,2688 ± 0,016
<b>CP 25 mg/Kg</b>	85,00 ± 8,367	37,00 ± 5,606	31,38 ± 7,482	0,027 ± 0,018

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. d = p<0,05 em relação ao AMFA 25 mg/Kg.

Tabela 10: Ensaio antitumoral contra Sarcoma 180 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em camundongos machos. Parâmetros hematológicos dos animais inoculados com Sarcoma 180.

	<b>Tween 80 0,4%</b> (média ± D.P.)	<b>AMFA 25 mg/Kg</b> (média ± D.P.)	<b>AMFA 50 mg/Kg</b> (média ± D.P.)	<b>CP 25 mg/Kg</b> (média ± D.P.)
<b>Leucócitos</b>	3,20 ± 0,78	3,04 ± 0,93	3,10 ± 0,52	1,92 ± 0,44 <sup>b,d,e</sup>
<b>Hemácias</b>	6,69 ± 0,52	6,74 ± 0,66	6,81 ± 0,63	5,79 ± 0,50 <sup>b,d,e</sup>
<b>Hemoglobina</b>	10,94 ± 1,03	10,98 ± 1,17	10,91 ± 0,83	10,21 ± 0,79
<b>Hematócrito</b>	37,04 ± 3,12	37,33 ± 4,13	37,16 ± 3,43	33,79 ± 3,53
<b>VCM</b>	55,34 ± 1,32	55,39 ± 2,83	54,66 ± 4,15	58,38 ± 3,40
<b>HCM</b>	16,35 ± 0,50	16,28 ± 0,69	16,05 ± 1,61	17,68 ± 0,88 <sup>b,d,e</sup>
<b>CHCM</b>	29,51 ± 0,62	29,43 ± 0,33	29,41 ± 1,21	30,2 ± 0,83
<b>Plaquetas</b>	1102 ± 79,36	1288 ± 130,1 <sup>b</sup>	1318 ± 133,5 <sup>b</sup>	1483 ± 89,5 <sup>b,d,e</sup>
<b>Linfócitos</b>	63,83 ± 5,56	61,17 ± 5,84	56,25 ± 9,17	61,33 ± 5,2
<b>Segmentados</b>	37,00 ± 4,63	42,00 ± 3,39	42,63 ± 4,59	38,00 ± 5,32
<b>Monócitos</b>	0,12 ± 0,35	0,12 ± 0,35	0,0 ± 0,0	0,12 ± 0,35
<b>Eosinófilos</b>	0,62 ± 0,91	0,50 ± 0,53	0,75 ± 1,03	0,12 ± 0,35

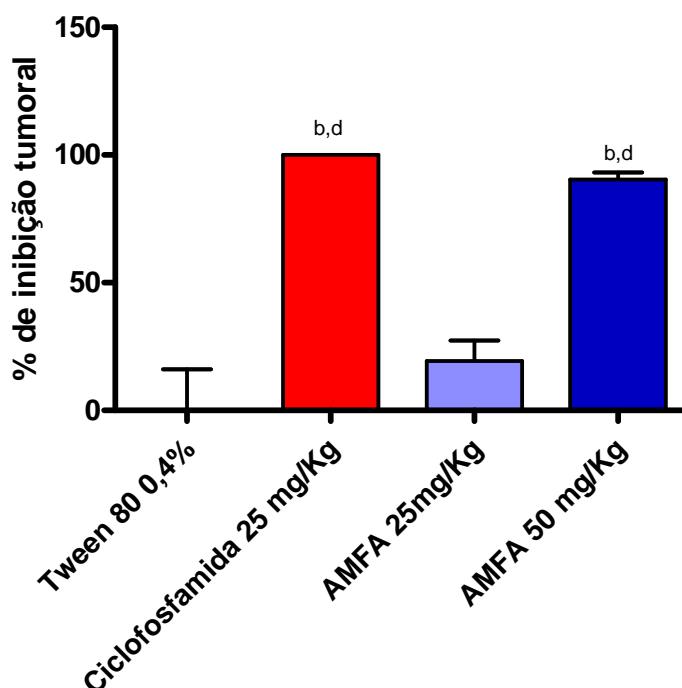
Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA e pós-teste de Newman-keuls. b = p<0,05 em relação ao Tween 80 0,4%; d = p<0,05 em relação ao AMFA 25 mg/kg; e = p<0,05 em relação ao AMFA 50 mg/kg.

#### 4.6.2 Avaliação do Efeito do AMFA em Ratos Contra o Carcinossarcoma de Walker 256.

O AMFA mostrou ter efeito inibidor do crescimento tumoral contra o carcinossarcoma de Walker 256 apenas na dose de 50 mg/Kg. A maior dose utilizada teve um efeito inibitório no crescimento tumoral semelhante ao da Ciclofosfamida, que foi usada como controle positivo (Figura 40). Além do visível efeito inibidor do crescimento tumoral, o AMFA não alterou o peso fresco dos órgãos avaliados no experimento, sendo todos semelhantes ao controle negativo, mesmo o grupo que recebeu a Ciclofosfamida como tratamento (Figura 41).

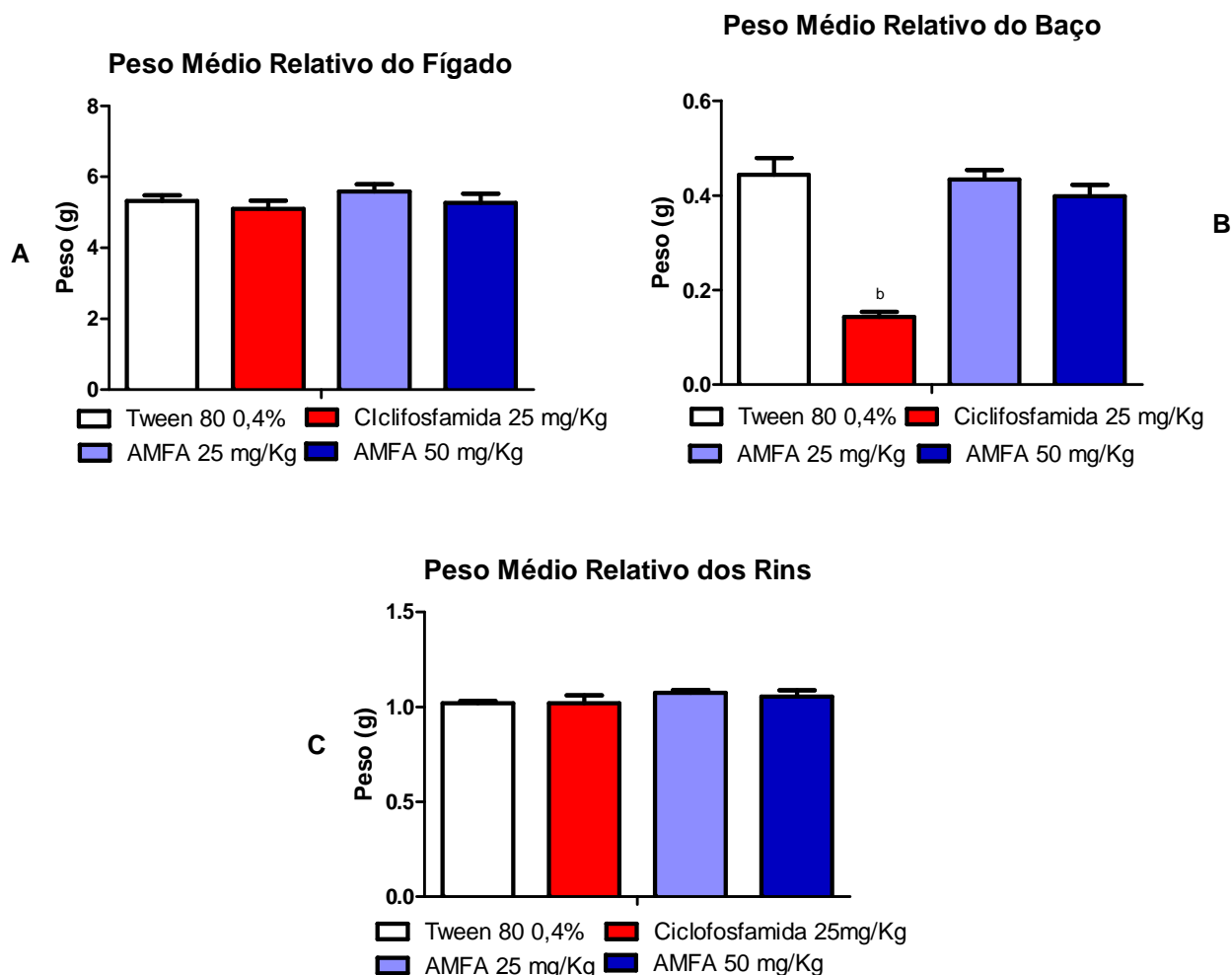
Figura 40: Ensaio antitumoral contra Walker 256 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos. Percentual de inibição do tumor Walker 256.

#### Inibição do Tumor Carcinossarcoma de Walker 256



ANOVA, seguido de Newman-Keuls com  $b = P < 0,05$ . 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.  $b = p < 0,05$  em relação ao grupo Tween 80 0,4%;  $d = p < 0,05$  em relação ao grupo AMFA 25 mg/Kg.

Figura 41: Ensaio antitumoral contra Walker 256 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos.



(A) Peso médio relativo (g/100 g de animal) do fígado nos animais tratados contra tumor Walker 256.  
 (B) Peso médio relativo (g/100 g de animal) do baço nos animais tratados contra tumor Walker 256.  
 (C) Peso médio relativo (g/100 g de animal) dos rins nos animais tratados contra tumor Walker 256.  
 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.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos de função hepática, observou-se que as doses de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg elevaram a dosagem de ALT durante o ensaio antitumoral, assim como também a Ciclofosfamida. Na avaliação dos parâmetros bioquímicos de função renal, apenas a dose de 50 mg/Kg reduziu a creatinina no sangue desses animais, embora tenha sido um valor estatisticamente significativo, não foi muito diferente do valor do controle negativo (Tabela 11).

Na avaliação dos parâmetros hematológicos, observou-se que as duas doses testadas não provocaram nenhuma alteração em nenhum dos parâmetros avaliados, observando-se apenas alterações provocadas pela Ciclofosfamida, que já eram esperadas (Tabela 12).

Tabela 11: Ensaio antitumoral contra Walker 256 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos. Parâmetros bioquímicos dos animais inoculados com Walker 256.

Tratamento	Parâmetros Bioquímicos			
	AST (U/L)	ALT(U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina(mg/dL)
	Média ± D.P.	Média ± D.P.	Média ± D.P.	Média ± D.P.
<b>Tween 80 0,4%</b>	77 ± 7,52	27,40 ± 4,99	44,75 ± 3,65	0,58 ± 0,03
<b>AMFA 25 mg/Kg</b>	84,14 ± 8,43	34,60 ± 4,14 <sup>b</sup>	43,25 ± 3,41	0,53 ± 0,03
<b>AMFA 50 mg/Kg</b>	89,71 ± 14,78	33,50 ± 4,55 <sup>b</sup>	44,38 ± 5,95	0,52 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>CP 25 mg/Kg</b>	83,17 ± 11,09	38,40 ± 5,83 <sup>b</sup>	43,13 ± 7,12	0,54 ± 0,04

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. b = P<0,05 em relação ao Tween 80 0,4%.

Tabela 12: Ensaio antitumoral contra Walker 256 do AMFA após tratamento por 7 dias com extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* (AMFA), Tween 80 0,4% (veículo) ou Ciclofosfamida (CPA, controle positivo) em ratos machos. Parâmetros hematológicos dos animais inoculados com Walker 256. 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. b = p<0,05 em relação ao Tween 80 0,4%; d = p<0,05 em relação ao AMFA 25 mg/kg; e = p<0,05 em relação ao AMFA 50 mg/kg.

	<b>Tween 80 0,4%</b> (média $\pm$ D.P.)	<b>AMFA 25 mg/Kg</b> (média $\pm$ D.P.)	<b>AMFA 50 mg/Kg</b> (média $\pm$ D.P.)	<b>CP 25 mg/Kg</b> (média $\pm$ D.P.)
<b>Leucócitos</b>	11,76 $\pm$ 2,45	11,76 $\pm$ 1,58	10,47 $\pm$ 1,74	2,48 $\pm$ 0,81 <sup>b,d,e</sup>
<b>Hemácias</b>	5,73 $\pm$ 0,48	5,73 $\pm$ 0,40	5,81 $\pm$ 0,40	4,96 $\pm$ 0,90 <sup>b,d,e</sup>
<b>Hemoglobina</b>	11,61 $\pm$ 0,99	11,56 $\pm$ 0,72	11,47 $\pm$ 0,82	9,95 $\pm$ 1,66 <sup>b,d,e</sup>
<b>Hematócrito</b>	35,02 $\pm$ 2,88	34,88 $\pm$ 1,81	34,99 $\pm$ 2,41	29,59 $\pm$ 3,40 <sup>b,d,e</sup>
<b>VCM</b>	61,10 $\pm$ 2,27	60,94 $\pm$ 1,78	60,22 $\pm$ 1,95	59,83 $\pm$ 1,38
<b>HCM</b>	20,26 $\pm$ 0,85	20,28 $\pm$ 0,64	19,73 $\pm$ 0,56	20,21 $\pm$ 0,72
<b>CHCM</b>	33,15 $\pm$ 0,77	33,11 $\pm$ 0,51	332,77 $\pm$ 0,39	33,65 $\pm$ 1,82
<b>Plaquetas</b>	1087 $\pm$ 80,00	1001 $\pm$ 55,44	1095 $\pm$ 92,03	612,2 $\pm$ 9,03 <sup>b,d,e</sup>
<b>Linfócitos</b>	59,38 $\pm$ 5,20	54,83 $\pm$ 7,57	59,88 $\pm$ 4,22	90,60 $\pm$ 4,24 <sup>b,d,e</sup>
<b>Segmentados</b>	40,71 $\pm$ 2,91	44,33 $\pm$ 8,26	39,63 $\pm$ 4,43	7,75 $\pm$ 3,61 <sup>b,d,e</sup>
<b>Monócitos</b>	0,60 $\pm$ 0,69	0,10 $\pm$ 0,31	0,10 $\pm$ 0,31	0,10 $\pm$ 0,31
<b>Eosinófilos</b>	0,80 $\pm$ 0,78	0,40 $\pm$ 0,69	0,30 $\pm$ 0,48	0,70 $\pm$ 0,94

## 5 DISCUSSÃO

Desde o início da colonização brasileira, o interesse e a exploração dos produtos naturais originados de plantas têm sido despertados (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

De acordo com a 31<sup>a</sup> Assembléia da Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é aquela que administrada ao homem ou a um animal, por qualquer via e sob qualquer forma, exerce alguma espécie de ação farmacológica (MATOS, 1999). O uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006; AGRA *et al.*, 2007; 2008).

*Annona muricata* L. (Annonaceae) é comumente conhecida como graviola (Di STASI *et al.*, 2002). Tradicionalmente as folhas são utilizadas para o tratamento de diversas doenças. Muitos compostos bioativos e fitoquímicos têm sido encontrados na graviola, e suas propriedades têm sido estudadas desde a década de 1940 (FENG *et al.*, 1962; MEYER, 1941).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a segurança do uso humano do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* e avaliar a ação antitumoral contra linhagens de tumores humanos e modelos murinos *in vivo*. Embora três grupos separados de pesquisadores tenham isolado as acetogeninas da graviola, com significativa atividade antitumoral e propriedades anticancerosas (ZENG *et al.*, 1996a; RIESER *et al.*, 1996; 1993; 1991; WU *et al.*, 1995a; 1995b; 1995c; 1995d), avaliou-se a atividade antitumoral mantendo as acetogeninas juntas no mesmo extrato.

Os estudos toxicológicos têm a finalidade de avaliar a idéia errônea de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que o uso popular de plantas medicinais serve como validação da eficácia destes medicamentos (LAPA, 1999; LAPA, 2001; CRAVEIRO *et al.*, 2008; MARLIÉRE *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2008). Exemplo disso é que há trabalhos mostrando 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 pode estar relacionada a esse dano.



No estudo de citotoxicidade pelo método do MTT, o AMFA mostrou-se tóxico para várias linhagens celulares, especialmente K-562, com uma  $CI_{50}$  de 0,14  $\mu\text{g/mL}$ , HCT-8 com uma  $CI_{50}$  de 0,25  $\mu\text{g/mL}$ , HCT-116 com uma  $CI_{50}$  de 0,29  $\mu\text{g/mL}$ , SF-295 com uma  $CI_{50}$  de 0,21  $\mu\text{g/mL}$ . AMFA teve uma menor capacidade de inibir o crescimento da linhagem MCF-7, com uma  $CI_{50}$  de 44,81  $\mu\text{g/mL}$ . Oberlies *et al.* (1997), observaram que células da linhagem MCF-7/Adr, multiresistente às drogas quimioterápicas, foram mais suscetíveis ao tratamento com acetogeninas, enquanto que o mesmo tratamento contra a linhagem sem esta resistência teve efeito apenas citostático. Os resultados obtidos mostraram uma semelhança com o que foi obtido por Oberlies na linhagem sem resistência, sendo necessário investigar se o efeito que foi observado foi apenas citostático ou citotóxico. Uma forma de esclarecer tal questão é realizar um novo ensaio de citotoxicidade, realizando-se uma leitura da absorbância antes da adição das substâncias-teste e calculando-se a inibição do crescimento (IC%) através das fórmulas propostas por Monks *et al.* (1991).

Também foi descrito na literatura a sensibilidade da linhagem PC-3 à esquamotacina, com uma  $CI_{50}$  de  $10^{-8}$   $\mu\text{g/mL}$  (ALALI *et al.*, 1999). Dessa forma, o AMFA foi testado contra PC-3M, que é uma linhagem mutante e mais resistente. Entretanto, a inibição do crescimento causada pelo AMFA foi menor que a encontrada em outras linhagens testadas, demonstrada pela  $CI_{50}$  de 43,99  $\mu\text{g/mL}$ , que é bem mais elevada que a encontrada para a esquamotacina. Esta é uma acetogenina isolada da casca do tronco de *Annona squamosa* (Hopp *et al.*, 1996) e não se pode afirmar que esteja presente no extrato de AMFA, que obtido das folhas de *Annona muricata*. Semelhantemente à linhagem MCF-7, o efeito observado pode ser apenas citostático, necessitando-se de um novo experimento para confirmar tal hipótese.

Por outro lado, o AMFA foi testado contra linfócitos humanos para verificar o quanto esta substância poderia ser tóxica às células de defesa saudáveis, e foi observado que a  $CI_{50}$  foi 18,59  $\mu\text{g/mL}$ , maior que a encontrada contra as linhagens K-562, HCT-8, HCT-116 e SF-295, porém menor que determinada para PC-3M. Não foi encontrado nenhum relato na literatura em relação à citotoxicidade de *Annona muricata* contra linfócitos humanos. Este resultado não é ruim, pois a grande maioria dos medicamentos atualmente utilizados na clínica no tratamento do câncer apresenta uma elevada citotoxicidade contra os leucócitos humanos (CARVALHO *et al.*, 2009; MARTINS; ROSA, 2004).

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. Embora exista esse relato na literatura, os resultados

obtidos com o AMFA demonstraram ser menos efetivos quando se trata de linhagens de melanoma, apresentando uma  $CI_{50}$  de 5,72  $\mu\text{g/mL}$  para a linhagem MDA-MB-435 e uma  $CI_{50}$  de 44,29  $\mu\text{g/mL}$  para a linhagem MALME-3M.

A melhor avaliação dos resultados obtidos poderá ser feita com obtenção do perfil fitoquímico, possível através de cromatografia líquida de alto desempenho associada ao espectrofotômetro de massa (HPLC-MS). Uma vez determinada a composição do AMFA, podemos avaliar se os resultados obtidos nos ensaios citotóxicos têm relação com suas estruturas moleculares. Segundo Alali *et al.*, 1999, em uma extensiva revisão dos dados de relação estrutura-atividade das acetogeninas, concluíram que (1) as acetogeninas bis-tetrahidrofuranos (bis-THF) adjacentes são as mais potentes dentro da família; os compostos bis-THF não adjacentes são, em geral, mas nem sempre, superior aos compostos mono-THF, que, por sua vez, são são mais potentes que as acetogeninas sem anéis THF. (2) A  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada no final da cadeia é crucial para a atividade. (3) Se todas as outras características estruturais forem iguais, as acetogeninas com 35 carbonos são mais potentes que as que possuem 37 carbonos. (4) A distância entre a hidroxila que fica ao lado do anel THF e a  $\gamma$ -lactona é crítica para a potência e seletividade da acetogenina. (5) Nem a hidroxila na posição 4 nem a da posição 10 na cadeia são essenciais para a atividade. (6) Três grupos hidroxilas, dois ladeando o anel THF e o outro em algum lugar ao longo da cadeia hidrocarbônica, proporcionam a posição ótima e a polaridade necessária para a atividade mais potente, por outro lado, acetogeninas tetrahidroxiladas perdem drasticamente sua atividade. (7) Uma cetona, ao invés de grupo funcional hidroxila reduz atividade. (8) acetogeninas com cetolactonas são ativas, porém menos potentes e com menos seletividade que os outros compostos. (9) Os compostos com anel tetrahidropirano (THP) são tão ativos quanto os compostos com anéis THF e apresentam o mesmo mecanismo de ação.

Além disso, é importante notar que há diferenças intraespecíficas na produção dos metabólitos secundários. Essa variação intraespecífica pode ocorrer de acordo com a posição em relação ao sol, fonte de água, contato com poluição de origem humana, contato com o vento, composição do solo, ação de predadores. As estações do ano também influenciam nesta produção, sendo necessário verificar a época de melhor produção das acetogeninas dentro das espécimes coletadas e quais espécimes as produzem em maior quantidade (McLAUGHLIN, 2008).

O balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto químico é um parâmetro importante quando se pretende verificar a sua aplicabilidade farmacológica (ANAZETTI et al., 2003).

Ao realizar-se o teste de toxicidade aguda, utilizando o método do Up and Down, o AMFA apresentou uma  $DL_{50}$  de 310,2 mg/Kg. Quando não há informações sobre uma substância a ser testada, por razões de proteção dos animais, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg peso corporal de acordo com a diretriz (do inglês, *guideline*) 423 da OECD (OECD, 2001). Diante do exposto, o valor da  $DL_{50}$  obtida pode ser considerado seguro, uma vez que o valor da dose encontrada é semelhante ao da dose recomendada pela OECD no caso citado.

A dose inicial testada de acordo com o *guideline* 425 da OECD foi de 175 mg/Kg. Pelo *screening* (do inglês, *triagem*) hipocrático, observou-se poucos efeitos adversos nos animais, sendo os mais destacados a redução da atividade geral e o comportamento rotativo unilateral esquerdo, o que pode sugerir um dano neurológico.

A segunda dose testada foi a de 550 mg/Kg, seguindo o programa desenvolvido para este teste. O animal morreu pouco tempo depois da administração da dose. Pelo *screening* hipocrático, houve redução na atividade geral do animal, logo seguido de morte.

Adewole & Ojewole (2009), realizaram um estudo de toxicidade aguda em camundongos do extrato aquoso das folhas de *A. muricata*, entretanto eles utilizaram a via intraperitoneal, com  $DL_{50}$  de  $155 \pm 20$  mg/Kg. N'Gouenmo *et al.* (1997) estabeleceram a toxicidade aguda do extrato alcoólico, entretanto a via de administração não foi descrita no trabalho. Ressaltamos que o teste de toxicidade aguda deve priorizar a via pretendida para o uso em humanos. Quando a via pretendida for a oral, a administração do produto em animais deve ser realizada por gavagem (ANVISA, 2010). Foi utilizada esta via por não haver relato de uso dos extratos de *A. muricata* por outra via em humanos e pela facilidade de administração e principalmente por ser esta a via de pretensão para uso humano.

Os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais. Além da redução do desenvolvimento ponderal, a toxicidade sistêmica se manifesta através de comportamento, apatia e má condição da pelagem (MELLO, 2001; MELLO *et al.*, 1997). O *screening* hipocrático é um ensaio bastante útil e comumente usado na triagem preliminar de plantas para detectar atividades farmacológicas e toxicológicas (LÚCIO *et al.*, 2000). O AMFA demonstrou influenciar na redução da atividade geral dos animais, que ficaram mais quietos durante a primeira hora

após a administração do extrato, e na mudança do comportamento de atividade motora, com rotação unilateral esquerdo.

A graviola tem atividade farmacológica sedativa e tranquilizante devido a capacidade de certos alcalóides presentes na mesma de serem agonistas dos receptores 5-HT 1A (HASRAT *et al.*, 1997). O AMFA passou pelo teste de alcalóides, utilizando-se o reagente de Kedde, que detecta lactonas conjugadas insaturadas (ALALI *et al.*, 1999), porém não se tem certeza se os alcalóides presentes no AMFA tem essa ação. Caso seja verdadeira, essa pode ser uma possível explicação para a redução da atividade geral observadas nos animias. Outra explicação possível seria a redução da oferta de ATP intracelular nos tecidos musculares dos animais. Londerhausen *et al.* (1991) também observou que a toxicidade causada pelas acetogeninas anonáceas em insetos resultaram em letargia e redução da mobilidade antes da morte. Os insetos tratados tinham substancialmente menores níveis de ATP intracelular, similar aos efeitos da antimicina A, conhecida como inibidora da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.

Em um estudo realizado em 2002, neurônios dopaminérgicos mesencefálicos cultivados *in vitro* foram expostos aos alcalóides totais das cascas das raízes da graviola e a dois dos alcalóides mais abundantes, a coremixina e a reticulina. Após 24 horas, cerca de 50% dos neurônios dopaminérgicos degeneraram. Os neurônios GABAérgicos também foram afetados. A morte neuronal ocorreu por apoptose, mas foi atenuada pelo aumento nas concentrações de glicose nas culturas. As acetogeninas foram retiradas após curto tempo de exposição e reduziu a morte celular (LANNUZEL *et al.*, 2002). Exposição crônica a estes alcalóides seria um fator etiológico na doença parkinsoniana de Guadalupe (CAPARROS-LEFEBVRE *et al.*, 1999).

Em outro estudo realizado em 2003, uma das principais acetogeninas da graviola, a annonacina, foi adicionada a culturas mesencefálicas por 24 horas. A  $CI_{50}$  foi de 0.018  $\mu$ M, matando os neurônios dopaminérgicos. Efeitos tóxicos também foram observados e concentrações menores foram utilizadas quando o tempo de incubação foi estendido por vários dias. A retirada da acetogenina após curto tempo de exposição deteu a morte celular. Annonacina também reduziu a sobrevivência de neurônios não-dopaminérgicos. Aumento nas concentrações de glicose ou manose, mesmo com a presença da annonacina, preveniu a morte neuronal (LANNUZEL *et al.*, 2003).

Diante de tais evidências, acredita-se que o comportamento de rotação unilateral dos animais deva ter relação com a presença de algum alcalóide ou acetogenina no extrato, mesmo o extrato sendo obtido a partir das folhas da gravioleira e não das cascas das raízes.

O teste de toxicidade de doses repetidas mostrou que as doses utilizadas de 12,5 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg não mataram os animais durante os 90 dias de experimento. O *screening* hipocrático também foi realizado durante o experimento de toxicidade de doses repetidas. Os efeitos observados durante o experimento foi redução da atividade geral dos animais, piloereção e movimento de rotação unilateral esquerdo.

Um dos aspectos mais fáceis e lógicos de serem avaliados quando o organismo é submetido a um tratamento é o peso corpóreo (BARDOCZ *et al.*, 1996). O peso dos ratos submetidos à administração de AMFA não foi alterado com o passar dos 90 dias, indicando que não houve interferência no crescimento dos animais. O consumo de água e ração durante o experimento também não foram alterados. Os estudos mostrados com cães utilizando paw paw tiveram resultados semelhantes (McLAUGHLIN *et al.*, 2009).

Outros sinais de toxicidade podem ser expressos pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (GONZÁLEZ & SILVA, 2003). Os resultados dos estudos bioquímicos do sangue dos animais mostraram, durante os 30 dias iniciais, que houve uma redução dos níveis glicêmicos no sangue dos animais machos que recebem a dose de AMFA 50 mg/Kg. Estes mesmos animais apresentaram um aumento nas taxas de colesterol e triglicerídeos, embora as fêmeas que receberam a mesma dose tenham apresentado uma elevação apenas nos triglicerídeos. A redução dos níveis de glicose pode ser devido a uma fase de adaptação dos animais ao consumo do extrato. Caso o AMFA seja rico em substâncias glicosiladas, pode-se sugerir então, que tenha ocorrido um estímulo para a produção de insulina, acarretando na redução dos níveis do parâmetro descrito. Além disso, outra especulação seria a ocorrência de um dano parcial das células  $\beta$ -pancreáticas que, em um primeiro momento (30 dias), resultou na liberação exacerbada de insulina, que conseqüentemente reduziu os níveis glicêmicos, seguido de elevação do mesmo após 60 dias de ingestão do AMFA, possivelmente pela redução na produção de insulina. Ao final dos 90 dias, os resultados mostraram uma adaptação do organismo do animal a essas variações nas taxas de glicose. Nas fêmeas, não foi observada nenhuma alteração em relação à glicose. Caso o extrato seja realmente rico em carboidratos, é possível que estes possam ter sido convertidos em triglicerídeos, que são moléculas de armazenamento energético, justificando assim, a sua elevação.

Alterações nas concentrações de lipídeos nos animais, como o colesterol, lipoproteínas de alta e baixa densidade e triglicerídeos pode nos dar úteis informações sobre o metabolismo dos lipídeos bem como a predisposição dos animais aos riscos cardiovasculares (YAKUBU *et al.*, 2008). A elevação do colesterol e dos triglicerídeos

ocorreu apenas nos animais cujo tratamento era uma dose de 50 mg/Kg. Como essa dose possui uma maior quantidade de Tween 80, que é uma substância surfactante, rico em ácidos graxos, é possível que tenha acarretado em uma ingestão aumentada de gorduras pelos animais. O extrato também pode ser outra fonte de gorduras, uma vez que a acetona utilizada para extraí-lo também dissolve substâncias relativamente apolares. É importante destacar que a elevação desses dois parâmetros só foi observada no período inicial de 30 dias, indicando que esta alteração tenha ocorrido durante o tempo de adaptação metabólica dos animais.

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, quantidade 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 extravasam para o sangue devido a alterações na permeabilidade das membranas celulares (WILLS, 1985). A mensuração dessas enzimas é uma valiosa ferramenta no diagnóstico clínico, fornecendo 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. Os animais machos que receberam a dose de AMFA 25 mg/Kg apresentaram uma elevação nos níveis séricos de AST. Entretanto, a elevação de AST indica danos teciduais inespecíficos. Já os níveis de ALT destes mesmos animais apresentaram-se reduzidos na dose de 12,5 mg/Kg com 60 e 90 dias de experimento. A enzima ALT elevada indica um dano mais específico no fígado, porém reduzida não tem correlação aparente com alterações fisiopatológicas. A não alteração nas concentrações de albumina indica que a função hepática dos animais estava preservada, uma vez que esta proteína é sintetizada exclusivamente no fígado (BENNET; PLUM, 1996).

Creatinina, uréia e ácido úrico são produtos catabólicos oriundos do metabolismo dos músculos, proteínas e purinas, respectivamente e são excretados pelos rins (AFOLAYAN *et al.*, 2009). A ausência de efeitos nesses parâmetros sugere que o AMFA não causou inflamação no sistema renal dos ratos.

Os animais de ambos os sexos apresentaram redução nos níveis de amilase nos animais machos que receberam a dose de AMFA 50 mg/Kg e nas fêmeas que ingeriram as

três doses de AMFA durante os primeiros 30 dias. A amilase é uma enzima pancreática. Esta redução na produção de amilase pode ter reduzido a absorção intestinal de amido, que pode ter contribuído para a redução nos níveis de glicose nos machos com 30 dias de experimento. Entretanto, não se encontrou nenhuma evidência que explicasse a redução dos níveis de amilase. Nas fêmeas, apesar da redução nos níveis de amilase nos primeiros 30 dias, não houve correlação com os níveis glicêmicos como observado nos machos. Contudo, nota-se pelos resultados uma adaptação do organismo dos animais no final do experimento.

Análises dos parâmetros hematológicos podem ser usadas para determinar a extensão dos efeitos deletérios de compostos estranhos, incluindo extratos de plantas, nos constituintes do sangue do animal (YAKUBU *et al.*, 2007). Mudanças no sistema hematológico têm um elevado valor preditivo para a toxicidade humana, quando os dados são extrapolados dos estudos com animais (OLSON *et al.*, 2000).

Os resultados dos estudos hematológicos dos animais mostraram, durante os primeiros 30 dias de experimento, uma redução do VCM nos animais machos nas três doses testadas e nas fêmeas, apenas na dose de 50 mg/Kg. Essa alteração manteve-se até o final do experimento apenas na maior dose em ambos os sexos. Observou-se uma redução do valor do hematócrito desses animais no período de 60 e 90 dias, havendo uma recuperação apenas nas fêmeas no final dos 90 dias. As fêmeas apresentaram uma diferença significativa em relação ao controle, Tween 80 0,4% e AMFA 12,5 mg/Kg, enquanto que os machos apresentaram diferença apenas em relação ao controle. O hematócrito é o volume em percentual ocupado pelos eritrócitos em um dado volume de sangue. Dessa forma, podemos relacionar que se houve uma redução no volume corpuscular médio das hemácias, essa alteração de volume conseqüentemente irá alterar o volume ocupado pelas mesmas no tubo de ensaio, reduzindo assim o valor do hematócrito, conforme os resultados obtidos.

Os leucócitos e alguns índices relacionados a eles foram alterados durante o período do experimento. A redução dos leucócitos nos animais machos, em todas as doses administradas, pode ser devido à insuficiência na taxa de entrada do parâmetro hematológico no sangue a partir da medula óssea e uma taxa aumentada de retirada da circulação periférica (AFOLAYAN *et al.*, 2009). A leucopenia é um efeito adverso observado em vários agentes antitumorais. O elevado nível de neutrófilos em ambos os sexos pode estimular a fagocitose nos animais. Em contraste, a redução de linfócitos observada nos resultados obtidos sugere efeito adverso nas células efectoras do sistema imune, embora

monócitos e eosinófilos tenham se mantido inalterados. Os níveis alterados de leucócitos e fatores relacionados pelo extrato, acompanhado de ausência de efeitos nos eritrócitos e fatores relacionados sugere efeito estimulatório seletivo e localizado na medula óssea. Porém, esses efeitos estimulatórios não parecem induzir clastogenicidade das células precursoras dos leucócitos de acordo com os resultados obtidos dos testes do cometa e micronúcleo dos mesmos animais.

A ausência de efeitos nos eritrócitos, exceto no VCM e hematócrito, sugere que o extrato não altera o balanço entre a razão de produção e destruição dos corpúsculos sanguíneos. O VCM, HCM e CHCM estão relacionados às células vermelhas individualmente, enquanto que a hemoglobina, hemácias e RDW (red cell distribution width) estão associadas com a população total de células sanguíneas vermelhas. A ausência de efeitos nesses índices implica que nem a incorporação da hemoglobina nas células vermelhas nem a morfologia e fragilidade osmótica dos eritrócitos foi afetado. Desta forma, é improvável que o extrato afete a capacidade de carreamento de oxigênio no animal (ADEBAYO *et al.*, 2005).

Ressalta-se a grande importância dos resultados obtidos com o veículo utilizado para dissolver o AMFA, o Tween 80 0,4%. Em nenhum dos parâmetros avaliados, seja bioquímico ou hematológico, o veículo teve resultados alterados, evidenciando que o mesmo não exerce nenhum efeito tóxico sobre os animais e parece influenciar apenas na ação do extrato em relação níveis de triglicerídeos.

Todos os resultados obtidos no ensaio de toxicidade de doses repetidas podem ser visualizados também na forma de Tabela (Anexo A).

Danos ao DNA e defeitos no reparo do DNA são os eventos moleculares básicos que dirigem a iniciação e progressão do câncer. O ensaio do cometa é amplamente usado no campo da genética toxicológica, testando células humanas, animais e vegetais (MCKENNA *et al.*, 2008).

O estudo de danos ao DNA induzido por substâncias de origem natural ou sintética é uma área essencial da toxicologia genética uma vez que mutação em cromossomos é um evento importante na carcinogênese (FENECH *et al.*, 2005). Por outro lado, compostos antitumorais clássicos como a Ciclofosfamida são reconhecidos como um agente potencialmente genotóxico. Quando se busca estabelecer os constituintes químicos de um produto natural, faz-se necessário também estabelecer seus possíveis perigos para a saúde humana. Com a *A. muricata* não se pode deixar de avaliar todos seus possíveis efeitos no



genoma das células animais e humanas, sejam eles benéficos ou maléficos, pois é uma planta utilizada com bastante frequência pela população, não só a brasileira, mas a sul-americana também. Diante disso, buscamos saber se o AMFA apresentava atividade genotóxica, o que representaria um fator mutagênico de efeitos cumulativos a médio e longo prazo.

O Ensaio do Cometa *in vivo* é bastante usado na avaliação genotóxica com várias aplicabilidades em vários tecidos e com muita sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA com pequenos números de células nas amostras biológicas (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). A versão alcalina pode detectar diferentes tipos de danos ao DNA em células eucarióticas tratadas *in vivo* ou *in vitro* com agentes genotóxicos com aplicações para o monitoramento humano e seus resultados podem ser correlacionados com os de outros biomarcadores de danos ao DNA (ALBERTINI et al., 2000).

Nos estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* foram utilizados linfócitos e células da medula óssea, respectivamente, como modelo experimental pelo fato de serem indicadores sensíveis aos agentes genotóxicos, apresentarem uma vida relativamente longa, circularem por todos os tecidos e serem de fácil obtenção (ALBERTINI et al., 2000). Diante disso, avaliamos o potencial mutagênico *in vivo*, utilizando os ensaios do cometa e micronúcleo, que avaliam a possível genotoxicidade do AMFA sobre a medula óssea de camundongos.

Um estudo realizado por Garcia e Nepomuceno em 2011, avaliou o potencial genotóxico e/ou antigenotóxico da polpa da graviola através do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*. Os autores chegaram à conclusão de que a polpa não apresentou ação genotóxica nem substâncias pró-mutagênicas que sejam detectadas por este teste. A polpa da graviola também não induziu mutações nem recombinações genéticas nos ensaios realizados por eles.

O AMFA em administração crônica mostrou-se danosa apenas na dose de 50 mg/Kg nas fêmeas, embora não tenha se mostrado tão prejudicial quanto à Ciclofosfamida 25 mg/Kg, fato evidenciado pela diferença estatística existente entre as duas doses testadas. As outras doses nas fêmeas e todas as doses nos machos, assim como o veículo utilizado para a diluição do extrato não causaram danos ao DNA, apresentando em sua maioria cometas 0 e 1 nas lâminas, semelhante aos resultados obtidos por Garcia e Nepomuceno (2011) para a polpa da graviola. É muito importante os resultados obtidos com o Tween 80

0,4% não ter apresentado ação genotóxica, uma vez que parece não influenciar na ação do AMFA e ser seguro para diluição do extrato.

Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos compostos de material cromossômico perdido do núcleo principal, como consequência de um dano genético, que pode ser causado por agentes químicos, físicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda de material genético. O teste do micronúcleo detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (VILLELA *et al.*, 2003).

O teste de micronúcleo em organismos de exposição aguda, menos de quatro semanas, é realizado em eritrócitos jovens, denominados policromatófilos (EPC), que se cora de forma diferenciada por conter RNA ribossomal.

No ensaio do micronúcleo, não houve formação de micronúcleos em quantidades semelhantes ao controle positivo, a Ciclofosfamida, mesmo quando administrada em doses crônicas. Os resultados obtidos foram mais semelhantes ao controle negativo e ao veículo utilizado na dissolução do AMFA. A Ciclofosfamida é um agente alquilante, utilizado no tratamento de neoplasias em geral. Este agente inibe a replicação do DNA e a transcrição de RNA através do cruzamento inter e intracadeias (ROESER *et al.*, 1978). Como sua mutagenicidade e clastogenicidade é amplamente conhecida, utiliza-se esta substância para realizar os experimentos como controle positivo.

Os resultados, para o controle positivo, quanto à frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em 1000 células analisadas foi igual a 13. O controle negativo teve seus resultados expressos em média de 0/1000 eritrócitos policromáticos micronucleados. Segundo Rabelo-Gay *et al.* (1991), a taxa espontânea de eritrócitos policromáticos com micronúcleos é baixa e consistente, cerca de 3/1000. Nosso teste avaliou a taxa de micronúcleos por eritrócito policromático nos animais que receberam apenas a substâncias de diluição do AMFA, no caso foi utilizado Tween 80 0,4%. A taxa encontrada foi de 1/1000. É importante determinar a frequência de micronúcleos nas células animais tratados com substâncias controle negativo, além dos veículos utilizados para solubilizar a substância, de modo que todo o efeito destes solventes (água destilada, soro fisiológico, DMSO ou outros, como Tween 80) seja conhecido e, que substâncias conhecidas capazes de induzir o micronúcleo na medula óssea, deve ser inclusa em cada experimento para confirmar que todas as características do protocolo foram realizadas corretamente (MAC GREGOR *et al.*, 1987). Os animais machos que receberam o extrato apresentaram uma média de 1/1000 eritrócitos policromáticos micronucleados na dose de

12,5 mg/Kg, 3/1000 na dose de 25 mg/Kg e 2/1000 na dose de 50 mg/kg. As fêmeas tiveram uma média de 1/1000 eritrócitos policromáticos micronucleados na dose de 12,5 mg/Kg, 2/1000 na dose de 25 mg/Kg e 4/1000 na dose de 50 mg/kg.

Sabe-se que a relação entre EPC e NCE pode indicar a toxicidade de uma substância em ensaio. Segundo Mavournin *et al.* (1990), a razão entre a frequência de EPC e NCE decresce quando a substituição dos EPCs originados dos eritroblastos é deprimida. Pelos resultados obtidos, verificou-se que não houve decréscimo estatisticamente significativo da relação EPC/NCE no em comparação ao controle negativo em todas as doses ( $P > 0,05$ ). Assim, foi observado que o AMFA não apresentou atividade tóxica nas condições experimentais utilizadas.

Não há relato de testes semelhantes com extratos de *A. muricata* na literatura, apenas com espécies próximas, como *A. cherimolia* e *A. crassiflora*. Aguirre *et al.* (2008) descreveu os efeitos genotóxicos produzidos por uma fração de acetogenina isolada de *A. cherimolia*. Os referidos autores demonstraram um aumento de micronúcleos em eritrócitos policromáticos induzidos pela fração da acetogenina, além de determinar sua citotoxicidade em fibroblastos de ratos e em ensaios *in vitro* de células derivadas de câncer de cólon. Similarmente, Vilar *et al.* (2008), em estudos conduzidos pelo teste do micronúcleo em camundongos, demonstraram que o araticum (*Annona crassiflora*) possui um potencial citotóxico, calculado pelos autores pela razão entre eritrócitos policromáticos e monocromáticos.

O teste do micronúcleo deve ser usado em conjunto com outros testes, em protocolo combinado que permita a comparação de vários métodos sob idênticas condições experimentais (CONNOR *et al.*, 1979). Muitas vezes o teste do micronúcleo não é suficientemente sensível, quando substâncias que dão resultados positivos são detectadas em doses muito próximas da dose máxima que pode ser testada, isto é, da dose que mata o animal (RABELLO-GAY *et al.* 1991). Diante do exposto, foi realizado concomitantemente, utilizando-se os mesmos animais, o teste do cometa e toxicidade crônica para assegurar as idênticas condições experimentais, e garantir a comparação dos resultados obtidos.

Estudos que envolvam outros testes, como o teste do micronúcleo em cultura de linfócitos, teste do cometa, teste de Ames, além de outras concentrações do AMFA permitirão identificar o dano genotóxico nos tecidos e poderão elucidar com mais precisão o seu efeito clastogênico e a dose máxima tolerada.

Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intrincada 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 humanos (KAMB, 2005). Fundamentando no uso de tumores experimentais para a identificação de substâncias com potencial antitumoral, a atividade *in vivo* do AMFA foi avaliada usando camundongos transplantados com Sarcoma 180 e ratos transplantados com Carcinossarcoma de Walker 256.

O Sarcoma 180 é um tumor original de camundongo e uma das linhagens celulares mais frequentemente usadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (MAGALHÃES *et al.*, 2010). Dentre as concentrações estudadas, ambas mostraram atividade neste modelo, causando a redução de, aproximadamente, 90% do crescimento tumoral quando comparado ao controle negativo. Não houve mudança nos pesos relativos dos órgãos estudados.

Asimicina, bulatacina e bulatacinona foram ativas contra leucemia L-1210 implantadas em camundongos convencionais. O taxol foi usado como controle, porém a bulatacina foi trezentas vezes mais potente que o taxol neste teste *in vivo*. Os animais tratados com taxol perderam 10% do peso corpóreo durante o período de 10 dias de tratamento, enquanto que os animais tratados com bulatacinona ganharam 5% do peso, sugerindo menos toxicidade que o taxol (McLAUGHLIN, 2008).

Nos animais inoculados com Sarcoma 180, a avaliação dos parâmetros bioquímicos mostrou que somente a dose de 50 mg/Kg diminuiu a dosagem de uréia durante o ensaio antitumoral que, embora tenha sido estatisticamente significativa, não foi uma diferença tão elevada. Este resultado indica que o extrato, mesmo na presença do tumor, não altera 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 creatinina (ANIAGU *et al.*, 2005).

A avaliação dos parâmetros hematológicos mostrou que as duas doses testadas provocaram o aumento na contagem das plaquetas, entretanto menos significativo que o aumento provocado pela Ciclofosfamida sugerindo uma produção acentuada de precursores de plaquetas pela medula óssea. A elevação de plaquetas também aumenta os riscos de embolias e acidentes vasculares.

O carcinossarcoma de Walker 256 é um tumor de rato que apresenta uma resistência maior à ação dos agentes antineoplásicos. Para avaliar a capacidade de ação antitumoral do AMFA, nós testamos o potencial de inibição do crescimento deste tumor *in vivo*.

Dentre as doses estudadas, apenas a maior dose mostrou atividade neste modelo, causando a redução de, aproximadamente, 90% do crescimento tumoral quando comparado ao controle negativo. Entretanto, faz-se necessário uma nova avaliação do efeito antitumoral, porém levando-se em consideração a associação do AMFA com a Ciclofosfamida. Acredita-se que juntos possam atuar de forma sinérgica, reduzindo o crescimento tumoral próximo de 100% devido aos mecanismos de ação de ambos serem diferentes e poderem atuar de forma complementar.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos mostrou que as duas doses testadas elevaram a dosagem de ALT durante o ensaio antitumoral, assim como também a Ciclofosfamida, indicando um provável dano hepático. Apenas a dose de 50 mg/Kg reduziu a creatinina no sangue desses animais, embora tenha sido um valor estatisticamente significativo, não foi muito diferente do valor do controle negativo, mas que sugere que a função renal não foi afetada pelo AMFA.

A avaliação dos parâmetros hematológicos mostrou que as duas doses testadas não provocaram nenhuma alteração em nenhum dos parâmetros avaliados, observando-se apenas alterações provocadas pela Ciclofosfamida, que já eram esperadas.

Outra evidência *in vivo* que aponta toxicidade de substâncias são as alterações pós-tratamento (aumento ou redução) no peso relativo dos órgãos (BARDOCZ *et al.*, 1996). Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre o peso relativo dos órgãos avaliados, sugerindo mais uma evidência de que o extrato não foi tóxico.

Diante de tantos resultados, o mais importante e relevante foi mostrar a enorme diferença existente entre a dose tóxica aos animais, ou seja, a  $DL_{50} = 310,2$  mg/Kg e a dose necessária para tratar os tumores avaliados, cerca de 50 mg/Kg. Sugere-se que o tratamento dos tumores experimentais com o AMFA é praticamente livre de efeitos tóxicos causados pelo extrato. Acredita-se que tal efeito também possa ser observado em humanos, necessitando-se para isso, estudos clínicos completos.

Em resumo, podemos dizer que a maior contribuição do presente trabalho foi permitir o conhecimento básico necessário para a realização dos estudos clínicos que, por sua vez,

proporcionará o conhecimento necessário para a implementação do uso dessa planta como um antitumoral seguro e útil à população brasileira.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final deste trabalho, foi concluído que:

- ✓ O AMFA mostrou-se tóxico frente a células tumorais de várias linhagens humanas, porém foi pouco tóxico para células normais humanas, como os linfócitos, sendo a  $CI_{50} = 18,59 \mu\text{g/mL}$ . Faz-se necessário avaliar posteriormente se o AMFA é citotóxico ou citostático para algumas das linhagens testadas;
- ✓ A  $D_{L50}$  do AMFA foi de aproximadamente de 310,2 mg/Kg, evidenciando que esta é uma substância com toxicidade aceitável;
- ✓ O perfil toxicológico parcial do AMFA foi estabelecido, sendo este extrato praticamente inócuo ao organismo dos animais roedores utilizados, porém com alterações bioquímicas e hematológicas estatisticamente significantes;
- ✓ O AMFA não demonstrou atividade genotóxica importante, resultados evidenciados tanto pelo ensaio do cometa como o do micronúcleo. Será importante repetir tais experimentos com doses mais elevadas para avaliar se os resultados são mantidos, além de complementar o estudo com novos ensaios, como o teste de Ames;
- ✓ O AMFA mostrou ter a capacidade de inibir o crescimento tumoral, tanto em camundongos, no modelo Sarcoma 180, quanto em ratos, no modelo carcinossarcoma de Walker 256, com potencial semelhante ao da Ciclofosfamida e de efeito dose-dependente. Deve-se repetir o ensaio, porém associando-se o AMFA com a Ciclofosfamida para avaliar o efeito da atuação conjunta de ambas. Outros modelos tumorais *in vivo* também merecem ser considerados para melhor delineação do efeito antitumoral do AMFA.
- ✓ A melhor concentração de AMFA estudada, que concentrou poucos efeitos tóxicos e bons efeitos antitumorais, foi a dose de 50 mg/Kg.

## **7 CONCLUSÃO**

Ao término do trabalho, concluiu-se que o AMFA, nas doses utilizadas, não apresentou efeitos tóxicos significantes, porém teve a capacidade de inibir o crescimento de tumores em modelos animais.



## 8 REFERÊNCIAS

ABDULLAH, F.; SINA, I. The Potential of Soursop Seed Extract *Annona muricata* Linn as a Biopesticide against Aphids *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) on Chilly. **Malaysian Journal of Science**, v.22 , n.2, p. 11-16, 2003.

ADEBAYO, J. O.; ADESOKAN, A. A.; OLATUNJI, L. A.; BUORO, D. O.; SOLADOYE, A. O. Effect of ethanolic extract of *Bougainvillea spectabilis* leaves on haematological and serum lipid variables in rats. **Biokemistri**, v.17, p.45-50, 2005.

ADEDEJI, A. O. **Rapid interpretation of routine clinical tests**. Zaria, Nigeria: Asekome and Company, 1992.

ADEYEMI, D. O.; KOMOLAFE, O. A.; ADEWOLE, O. S.; OBUOTOR, E. M.; ADENOWO, T. K. Anti-hyperglycemic activities of *Annona muricata* (linn). **African Journal of Traditional, Complimentary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 1, p. 62-69, 2009.

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**, v.6, n.1, p. 30 – 41, 2009.

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.**, v.12, n.4, p. 814-820, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 01 de março de 2010. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>.

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.17, p.114-140, 2007.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 18, p. 472-508, 2008.

AHMED, Z.; AND BICKNELL, R. Angiogenic signalling pathways. **MethodsMol. Biol.** v. 467, p.3–24, 2009.

AKDOGAN, M.; KILINC, I.; ONCU, M.; KARAOZ, E.; DELIBAS, N. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha spicata* L on kidney tissue in rats. **Human and Experimental Toxicology**. v.22, p. 213-219, 2003.

ALALI, F. Q., KAAKEH, W.; BENNET, G. W.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins as natural pesticides; potent toxicity against insecticide-susceptible and resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). **J. Econ. Entomol.**, v.91, n.3, p.641-9, 1998.

ALALI, F. Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: Recent progress. **J.**

**Nat. Prod.**, v.62, p. 504-540, 1999.

ALBERTINI, R.J. et al. A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, **Mutat. Res.**, v.463, p.111–172, 2000.

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

ALVES, A. P. N. N.; GUEDES, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. E. A.; PESSOA, C. O.; FERREIRA, F. V. A.; MORAES, M. O. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 2561. **Acta Cir Bras**, v. 19, n.4. Disponível em :<<http://www.scielo.br/acb>. 2004.>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Facts**, 2012. Disponível em :<<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>> Acesso: 23 Ago. 2012.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v.188, p. 261-274, 2003.

ANIAGU, S. O.; NWINYI, F. C.; AKUMBA, D. D.; AJOKU, G. A.; DZARMA, S.; IZEBE, K. S. Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. **African Journal of Biothecnology**, v.4, n.1, p.72-78, 2005.

ANTOUN, M.D., et al. Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactives. **Int. J. Pharmacog.**, v.31, n.4, p.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 glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. **Ver. Per. Med. Exp. Salud. Publica**, v. 22, n.4, p. 247-253, 2005.

BAGULEY, B. C.; KERR, D. J. **Anticancer Drug Development**. Academic Press, 1997.

BAILLY, C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. **Curr. Med. Chem.**, v.7, p.39-58, 2000.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and Cancer: back to Virchow? **Lancet**, v.357, p. 539-545, 2001.

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.

BARILE, A. F. Introduction to principles of toxicology. *In*: \_\_\_\_\_. **Principles of Toxicology Testing**. [S.I.]: CRC Press, 2007.

BARLOW, S.M., et al. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 40, n. 2/3, p. 145-191, feb./mar. 2002.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Altern. Lab. Anim.**, v. 31, n. 3, p. 277-281, 2003.

BENNETT, J. C.; PLUM, F. **Cecil-tratado de Medicina Interna**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

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.**, v.22, n.2, p.269-303, 2005.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.801-807, 2006.

BOLZANI, V.S., YOUNG, M.C.M., FURLAN, M., CAVALHEIRO, A.J., ARAÚJO, A.R., SILVA, D.H., LOPES, M.N. Search for Antifungal and Anticancer Compounds from Native Plant Species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v.71, p. 181-189, 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.**, v.57, n.5, p.434-436, 1991.

BOTHAM, P. A. **Acute systemic toxicity**. v. 43, Suppl. S, p. 27-30, 2002.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10242&word=toxicidade%20aguda%20de%20fitoter%C3%A1picos>>. Acesso em: 10 set. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução RDC nº 219 de 20 de setembro de 2004. Aprova o regulamento para elaboração de dossiê para a obtenção de comunicado especial (CE) para a realização de pesquisa clínica com medicamentos e produtos para a saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 de setembro de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997. Aprova normas de pesquisa envolvendo seres humanos para a área 91 temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 01 de 13 de junho de 1988. Regulamenta o credenciamento de Centros de Pesquisa no país e recomenda a criação de um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em cada centro. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de junho de 1988.

BRENDLER-SCHWAAB, SUSANNE; ANDREAS HARTMANN, STEFAN PFUHLER; GU UNTER SPEIT. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245--254, 2005.

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.**, v.89, n.3, p.180-184, 2008.

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**, v. 354, n.9175, p.281-286, 1999.

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

CARMELIET, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. **Oncology**, v. 69 (Suppl 3), p. 4–10, 2005.

CARVALHO, M. W. A.; ARAÚJO, A. A.; NÓBREGA, M. M. L. Nursing diagnoses for patients with hematological toxicity after antineoplastic chemotherapy based on the ICNP. **Rev. Enferm. UFPE on line**. v.3, n.4, p.801-7, 2009.

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

CAVALCANTI, B.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* E *Topsentia ophiraphidites*, DA ASCÍDIA *Didemnum ligulum* E DO OCTOCORAL *Carijoa riisei*. **Quim. Nova**, v. 30, n.5, p.1194-1202, 2007.

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 388–392, Mar. 2006.

CHAMPY, P.; HOGLINGER, G. U.; FEGER, J.; GLEYE, C.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **J. Neurochem.**, v. 88, n.1, p.63-69, 2004.

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

CHASE, A.; CROSS, N. C.; Signal transduction therapy in haematological malignancies: identification and targeting of tyrosine kinases. **Clin. Sci.**, v.111, p.223-249, 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, 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.

CHO, R. W., CLARKE, M. F. Recent advances in cancer stem cells. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v.18, p.1–6, 2008.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. *In*: CHOY, W. N. (Ed.). **Genetic toxicology and cancer risk assessment**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 93-113

COECKE, S.; BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N. *et al.* Toxicokinetics and metabolism. **Altern. Lab. Anim.**, suppl 1, p. 147-175, 2005.

CONNOR, T. H. *et al.* A combined testing protocol approach for mutagenicity testing. **Mutation Res.**, v.64, p.19-26, 1979.

CORTNER, J.; WOUDE G. F. V. Essentials of molecular biology – cDNA libraries. *In*: DEVITA JR., V.T.; HELLMAN, S.; ROSEMBERG, S. A. **Cancer: Principles and practice of oncology**. 5. ed. Philadelphia : Lippincott – Raven Publishers,1997.

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

COSTA-LOTUFO, L. V.; LUCENA, D. F.; ANDRADE-NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; LEAL, L. K. A. M.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Analgesic, Antiinflammatory and Central Depressor Effects of the Hydroalcoholic Extract and Fractions from *Aeolanthus suaveolens*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v. 27, n. 6, p. 821-824, 2004a.

COSTA-LOTUFO, L. V.; ARAUJO, E.E.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). **Die Pharmazie** (Berlin), Alemanha, v. 59, n. 1, p. 78-79, 2004b.

COSTA-LOTUFO, L. V.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; LEAL, L.K.A.M. ; CUNHA, G. M. A. ; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K.M.; VIANA, G.S.B.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. ; PESSOA, C. Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis* A.C. Smith. Zeitschrift für Naturforschung. C, A **Journal of Biosciences**<sup>JCR</sup>, Alemanha, v. 58c, n. 9/10, p. 675-680, 2003.

COSTA-LOTUFO, L.V.; FERREIRA, M.A.D.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, G.M.A. Toxicity to sea urchin egg development of the quinone fraction obtained from *Auxemma oncocalyx*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brazil, v. 35, n. 8, p. 927-930, 2002a

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C. *et al.* The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a

diterpene isolated from *Copaifera lahgdorffi* oleo-resin. **Toxicon.**, v. 40, p. 1231-1234, 2002b.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J. Nat. Products**, 75, p.311-335, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRAGG, G.M.; BOYD, M.R.; GREVER, M.R.; MAYS, T.D.; NEWMAN, D.J.; SCHEPARTZ, S.A. Natural product drug discovery and development at the National Cancer Institute. Policies for international collaboration and compensation. **Missouri Botanical Garden Monograph Series**, v.48,p.161-167, 1994.

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, 1990. p.11-20,

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981.

CRAVEIRO, A. C. S.; CARVALHO, D. M. M.; NUNES, R. S.; FAKHOURI, R. RODRIGUES, A. S.; TEIXEIRA-SILVA, F. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18 (*Supl.*), p. 739-743, 2008.

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

DAYAN, A. **The Toxicological Background**. London: Department of Toxicology, St. Bartholomew's Hospital Medical College.

DEJANA, E.; ORSENIGO, F.; MOLENDINI, C.; BALUK, P.; MCDONALD, D. M. Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. **Cell Tissue Res**. v.335, p.17-25, 2009.

DE SMET, P. A. G. M..The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, p. 801-840, 1997.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**, 2.ed.: São Paulo Editora UNESP, 2002.

DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; SANTOS; H. B.; OLIVEIRA, K. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; AGUIAR; F. B.; TOSCANO, M. G.; RIBEIRO, E. A. N. Padronização dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de Camundongos *Swiss* e Ratos *Wistar*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 10, n. 2, p.171-176, 2006.

DIRAT, B.; BOCHET, L.; ESCOURROU, G.; VALET, P.; MULLER, C. Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes? **Endocr. Dev**. v.19, p.45-52, 2010.

DORATO, M. A.; BUCKLEY, L. A. Toxicology in the Drug Discovery and Development Process. *In*: ENNA, S. J. et al. **Current Protocols in Pharmacology**. New Jersey: Willey InterScience, 1998. Cap. 10.

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

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.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. **Note for Guidance on the Pre- Clinical Evaluation of Anticancer Medicinal Products – CPMP/SWP/997/96**. London: 1998. Disponível em: <<http://www.emea.eu.int/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>> Acesso em: 15 jul. 2012.

ESPOSTI, M. D.; GHELLI, A.; RATTA, M. *et al.* Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). **Biochem. J.**, v. 301, p. 161-167, 1994.

EVANS, H. J.; NEARY, G.J.; WILLIAMSON, F. S. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on vicia faba roots and the effect of oxygen. **Int. J. Radiation Biol.**, v. 1, p. 216-229, 1959.

FAEGRI, K.; PIJL, L. van der. **The principles of pollination ecology**. 3.ed. New York: 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**, v.1, n.4, p. 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**, v.12, n.1, p.27-32, 1982.

FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D. Global Importance of Medicinal Plants. *In*: AKEREB, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Eds). **Conservation of Medicinal Plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

FÁVARO, O. C. N.; OLIVEIRA, M. M.; ROSSINI, A.; KAMARA, C. R.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. Seleção por meio de Células KB de Substâncias e Extratos potencialmente Ativos em Quimioterapia do Câncer. **Anais Acad. Bras. Ciências**. Rio de Janeiro, v.62 , n.3, p.217-224, 1990.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods Mol. Med.**, v. 111, p. 3-32, 2005.

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

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

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

FERREIRA, P. M. P. **Determinação do potencial antitumoral de diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz.** Dissertação de mestrado. -- Universidade Federal do Ceará, 2006.

FOLB, P. I. **Animal Tests as Predictors of Human Response.** África do Sul: Department de Pharmacology, University of Cape Town Medical School.

GARCIA, T. A.; NEPOMUCENO, J. C. Atividade antigenotóxica da polpa da graviola (*Annona muricata*), avaliada por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*. **UNIPAM**, v. 8, n.2, p.70-80, 2011.

GBEASSOR, M., *et al.* In vitro antimalarial activity of six medicinal plants. **Phyther. Res.**, v.4, n.3, p.115–17, 1990.

GERMPLASM RESOURCES INFORMATION NETWORK (GRIN). TAXON: *ANNONA MURICATA* L. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?3492>.

GLEYE, C., *et al.* Cis-mono tetrahydrofuran acetogenins from the roots of *Annona muricata* L. **J. Nat. Prod.**, v.61, n.5, p.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.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária.** Porto Alegre: UFRGS, 2003.

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. WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**,v.144, 2011.

HARTWELL, J. L. Plants used against cancer: a survey. **Quarterman Publications**, v.198, p. 438-39.

HARVEY, A. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discov. Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, July 2000.

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.**, v.49, n.11, p.1145-9, nov.1997.



HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**, v. 18, n. 2, p. 187-190, May 1973.

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

[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322), acesso em 23/08/2012.

[http://www.rarexoticseeds.com/Fruits/Graines\\_Anonna\\_Muricata\\_Seeds\\_Soursop\\_Corosollier](http://www.rarexoticseeds.com/Fruits/Graines_Anonna_Muricata_Seeds_Soursop_Corosollier); Acessado em 18 de setembro de 2010.

[http://www.qsbg.org/IMAGES/Plans/May/ann\\_mur.jpg](http://www.qsbg.org/IMAGES/Plans/May/ann_mur.jpg); Acessado em 18 de setembro de 2010.

<http://janguadeiroonline.com.br/uploads/2010/02/1266415440graviola.jpg>. Acessado em 18 de setembro de 2010.

<http://botgard.bio.uu.nl/seedlist/Images/Annona%20muricata%2083GR00169.jpg>; Acessado em 25 de setembro de 2010.

[http://content6.eol.org/content/2009/04/20/22/28822\\_large.jpg](http://content6.eol.org/content/2009/04/20/22/28822_large.jpg); Acessado em 25 de setembro de 2010.

<http://www.reservaecocerradobrasil.org/>. Acessado em 25 de setembro de 2010.

<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=166>, acessado em 20/08/2012.

HÖGSTEDT, B.; GULLBERG, B.; MASRK-VENDEL, E.; MITELMAN, F. G.; SKERFVING, S. Micronuclei and chromosome aberrations in bone marrow cells and lymphocytes of humans exposed mainly to petroleum vapors. **Hereditas**, v. 94, n. 2, p. 179-187, 1981a.

HÖGSTEDT, B.; NILSSON, P. G.; MITELMAN, F. Micronuclei in erythropoietic bone marrow cells: relation to cytogenetic pattern and prognosis in acute nonlymphocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 3, n. 3, p. 185-193, apr. 1981b.

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

HUWILER, A.; ZANGEMEISTER-WITTKE, U. Targeting the conversion of ceramide to sphingosine 1-phosphate as a novel strategy for cancer therapy. **Crit. Ver. Oncol. Hematol.**, v.63, p.150-159, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – CIH. **M3 (R1): Maintenance of the CIH Guideline on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals.** Geneva: 2000. Disponível em: <<http://www.CIH.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 01 maio 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – CIH. **Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals – S2B**. Geneva: 1997. Disponível em: <<http://www.CIH.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 01 abr. 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – CIH. **Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility S5(R2)**. Geneva: 1993. Disponível em: <<http://www.CIH.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 15 abr. 2012.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **J. Ethnopharmacol.** v. 90, p. 33-8, 2004.

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

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.

JORDAN, M. A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Curr. Med. Anticancer Agentes**, v.2, p.1-17, 2002.

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

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

KARJALA, G., CHAN, Q., MANZO, E., ANDERSEN, R. J.; ROBERGE, M. Ceratamines, structurally simple microtubule-stabilizing antimitotic agents with unusual cellular effects. **Cancer Res.**, v.65, p.3040-3043, 2005.

KATO, M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry**, v.57, p. 621-623, 2001.

KAWABE, T. G2 Checkpoint abrogators as anticancer drugs. **Mol. Cancer Ther.**, v.3, p.513-519, 2004.

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

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

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.

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.

LANNUZEL, A. *et al.* Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Mov. Disord.** v.17 , n.1, p. 84-90, 2002.

LANNUZEL, A. *et al.* The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. **Neuroscience**, v.121, n.2, p. 287-296, 2003.

LAPA, A. J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. *In*: SIMÕES, C. M. O. (Ed). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999. p.181-196.

LAPA, A. J.; CADEN, S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Salvador: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), 2001.

LE COINTE, P. **A Amazônia Brasileira III. Árvores e Plantas Úteis (indígenas e aclimatadas)**. São Paulo: Ed. Nacional, 1947.

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

LEYVA, A.; PESSOA, C.; BOOGAERDT, F.; SOKAROSKI, R.; LEMOS, T. L.; WETMORE, L. A.; HURUTA, R. R.; MORAES, M. O. Oncocalyxones A and C, 1,4-anthracenediones from *Auxemma oncocalyx*: comparison with anticancer 1,9-anthracenediones. **Anticancer Res.**v.20, n.2A, p.1029-31, mar./apr. 2000.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; CHEN, S. *et al.* Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Bioorg. & Med. Chem.**, v.13, p. 4767-4776, 2005.

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.** , v.65, p.470-475, 2002.

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**, v.41, p.591-594, 2003.

LOBO, N. A.; SHIMONO, Y.; QIAN, D.; CLARKE, M. F. The biology of cancer stem cells. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.23, p.675-699, 2007.

LONDERHAUSEN, M.; LECIHT, W.; LIEB, F.; MOESCHLER, H.; WEISS, H. **Pestic. Sci.**, v.33, p.427-438, 1991.

LOPEZ, A. M. Plant extracts with cytostatic properties growing in Cuba. I. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v.31, n.2, p. 97–104, 1979.

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

LOS, M.; BUREK, C. J.; STROH, C.; BENEDYK, K.; HUG, H.; MACKIEWICZ, A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. **Drug Discov. Today**, v.8, p.67-77, 2003.

LÚCIO, E. M. R. A.; ROSALEN, P. L.; SHARAPIN, N.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Rev. Bras. Farmacogn.**,v. 9/10, p.23-25, 2000.

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

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

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mut. Res.**, v. 189, p. 103–112, 1987.

MAGALHÃES, H. I. F., FERREIRA, P. M. P., MOURA, E. S., TORRES, M. R., ALVES, A. P. N. N., PESSOA, O. D. L., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O., PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.82, p.407-416, 2010.

MALIÉRE, L. D. P.; RIBEIRO, A. Q.; BRANDÃO, M. G. L.; KLEIN, C. H.; ACURCIO, F. A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18 (Supl.), p.754-760, 2008.

MALONE, M. H.; ROBCIHAUD, R.C. The pharmacological evaluation of natura products – General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J. Ethnopharmacol.**, v.8, p.127-147, 1983.

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, 1997. p. 20-35.

MANS, D. R. A.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. **Oncologist**, v.5, p.185, 2000.

MARTINS, I.; ROSA, H. V. D. Considerações Toxicológicas da Exposição Ocupacional aos Fármacos Antineoplásicos. **Rev. Bras. Med. Trab.**, Belo Horizonte, v.2, n.2, p. 118-125, abr./jun. 2004.

MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**, 2. ed. UFC, 1994.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1988.

MAVOURNIN, K. H.; BLABUY, D. M.; CIMINO, M. C.; SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency gene. **Tox. Program. Mutation Res.**, v. 239, p.29-80, 1990.

MCKENNA, D. J.; MCKEOW, S. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 183-190, 2008.

McLAUGHLIN, J. L.; BENSON, G. B.; TURGEON, T. A.; FORSYTHE, J. W. Use of standardized mixtures of paw paw extract (*Asimia triloba*) in cancer patients: case studies. *In: Botanical Medicine: from bench to bedside*, 2009.

McLAUGHLIN, J. L. Paw paw and Cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products. **J. Nat. Prod.**, v.71, p.1311-1321, 2008.

MELLO, F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. Porto Alegre, 120 p. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias. -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

MELLO, J. R. B.; LANGELOH, A.; HABERMEHL, G.; KREBS, H. C.; BATATINHA, M. J. M.; ALMEIDA, C. C. R.; BASTOS, F. C.; BASSANI, M.; BARUFFALDI, C.; ALAVARES, F.; FRANCISCO, D.; KUMMER, R. Avaliação do extrato aquoso dos frutos de *Crotalaria retusa* Leguminosae sobre a fertilidade de ratas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS.**, v.25, p.34-42, 1997.

MERCADO COMUM DO SUL – MERCOSUL. Resolução nº 129/96. **Regulamento Técnico sobre a Verificação de Boas Práticas de Pesquisa Clínica**. Fortaleza, 13 de dezembro de 1996.

MEYER, T. M. The alkaloids of *Annona muricata*. **Ing. Ned. Indie**, v. 8, n.6, p.64, 1941.

MIYOSHI, H.; OHSHIMA, M.; SHIMADA, H.; AKAGI, T.; IWAMURA, H.; MCLAUGHLIN, J. L. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1365, p.443-452, 1998.

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

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GROODICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Cell Lines. **Journal of National Cancer Institute.**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 24, n.105, 2001.

MORAES, M. O.; FONTELES, M. C.; MORAES, M. E. A. Screening for anticancer activity of Plants From the Northeast Of Brazil. **Fitoterapia**, Itália, v. 68, n. 3, p. 235-240, 1997.

- MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications Inc., 2000.
- MORTON, J. F. A survey of medicinal plants of Curacao. **Econ. Bot.**, v.22, p.87-92, 1968.
- MORTON, J. F. Soursop. *In: Fruits of Warm Climates*. Miami, 1987. p. 75–80
- 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, 1997. p. 315-322.
- MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. Características Botânicas das Principais Anonáceas e Aspectos Fisiológicos de Maturação. **EMBRAPA-Documentos**, n. 106, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NAGY, J.A., CHANG, S.H., SHIH, S.C., DVORAK, A.M., AND DVORAK, H.F. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. **Semin. Thromb. Hemost.**, v.36, p.321–331, 2010.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **What is cancer?** Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertropics/whatisacancer>> Acesso em: 30 Jan. 2008.
- NEWMAN, J. D; CRAGG, M. G AND SNADER, M. K. Natural Products as Sources of New Drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.
- N'GOUEMO, P.; KOUDOGBO, B.; TCHIVOUNDA, H.P.; NGUEMA, C.A.; ETOUA, M.M. Effects of Ethanol Extract of *Annona muricata* on Penylenetetrazol-induced Convulsive Seizures in Mice. **Phytotherapy Research**, v.11, n.3, p. 243-245, 1997.
- NICOLAS, H., *et al.* Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. **J. Med. Chem.**, v.40, n.13, p.2102–6, 1997.
- OBERLIES, N. H.; KROLL, D. Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. **J. Nat. Prod.**, v.67, p.129, 2004.
- 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.**, v.40 , n.13, p.2102-2106, 1997.
- OBERLIES, N. H.; JONES, J. L.; CORBETT, T. H., FOTOPOULOUS, S. S.; MCLAUGHLIN, J. L. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins, in an in vitro disk diffusion assay. **Cancer Lett.**, v. 96, p.55-62, 1995.
- OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K. V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.32, p. 56-67, 2000.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 2001.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, n. 1, p. 291-298, aug. 1984.

OZGUR, K ; HAYIRLI,A; YILDIZ, A. ; OKUMU, Z. ; KISA, F.; EMEL BANU BUYUKUNAL BAL; POLAT, H.; ERDEM, F. Reference Values for Some Physiological and Biochemical Parameters in Rats at Puberty. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.5, p.1121-1128, 2006.

PADMA, P., *et al.* Effect of *Annona muricata* and *Polyalthia cerasoides* on brain neurotransmitters and enzyme monoamine oxidase following cold immobilization stress. **J. Natural Remedies**, v.1, n.2, p.144–46, 2001.

PANDEY, R. C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. **Med. Res. Rev.**, v. 18, p. 333-346, 1998.

PASQUALE, E. B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond. **Nat. Rev. Cancer** , v.10, p.165–180, 2010.

PATIÑO, V. M. **Plantas Cultivadas y Animales Domesticos em America Equinoccial**. Cali-Colombia: Imprenta Departamental,1963. Tomo I.

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.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2002.

PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LEYVA, A.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. **Advances in Phytomedicine** , v.2, p.197–211, 2006.

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

PIETRAS, K., AND OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Exp. Cell Res.**, v.316, p.1324–1331, 2010.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M.; Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n.2, p. 281-293, 2004.

PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER. B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P. *et al.* The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed

approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Altern. Lab. Anim.**, v. 34, n. 3, p. 315-41, 2006.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicol. Sci.**, v. 43, n. 2, p. 86-101, 1998.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, carcinogênese, teratogênese: critérios e métodos de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

RÄSÄNEN, K., AND VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. **Exp. Cell Res.**, v.316, p.2713–2722, 2010.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. *In*: RIBEIRO, R. L. **Mutagênese ambiental**. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003. p. 173-198.

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

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

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

ROESER, H. P.; STOCKS, A.; SMITH, A. Testicular damage due to cytotoxic drugs and recovery after cessation of therapy. **Aust. N. Z. J. Med.**, v.8, p.250-254, 1978.

RUOSLAHTI, E. Specialization of tumour vasculature. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 83–90, 2002.

RUOSLAHTI, E.; BHATIA, S. N.; SAILOR, M. J. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. **J. Cell Biol.**, v.188, p.759–768, 2010.

RUPPRETCH, J. K.; HUI, Y-H.; McLAUGHLIN, J. L; Annonaceous Acetogenins: a review. **Journal of Natural Product** ., v.53, n.2, p.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 Graviolera (*Annona muricata* L.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 329-331, 2003.

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

SANTOS, L. A. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A.-St. Hill. **Ver. Bras. Pl. Med.**, v.9, n.3, p. 48-51, 2007.



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

SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. D. A.; SUN, N. J.; CASSADY, J. M.; DE OLIVEIRA, A. B. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona Crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, v.42, p.705, 1996.

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacol. Ther.**, v.1, p.411 - 435, 1977.

SCHMID, W. The micronuclei test. **Mut. Res.**, v. 31, p. 9-15, 1975.

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.**, v.120, p.194-198, 2004.

SCHWARTSMANN, G.; WORKMAN, P. Anticancer Drug Screening and Discovery in the 1990s: A European Perspective. **Eur. J. Cancer**, p.3-14, 1993.

SCHWARTSMANN, G.; RATAIN, M. J.; CRAGG, G. M.; WONG, J. E.; SAIJO, N.; PARKINSON, D.R.; FUJIWARA, Y.; PAZDUR, R.; NEWMAN, D.J.; DAGHER, R.; DI LEONE, L. Anticancer Drug Discovery and Development Throughout the World. **Journal of Clinical Oncology**, v.15, n.20, (18 suppl.), p.47S-59S, 2002.

SHIMADA, H.; GRUTZNER, J. B.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L. **Biochemistry**, v.37, p.854-866, 1998a.

SHIMADA, H.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L. **Pharmacol. Res.**,v.37, p.357-364, 1998b.

SHIMODA, M.; MELLODY, K.T.; ORIMO, A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v.21, p.19–25, 2010.

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

SILVA, J. A. G. Estimativa 2012: Incidência do Câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2/>> Acesso em 23 Ago. 2012.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 618-626, 2008.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 175, n. 1, p. 184-191, mar. 1988.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS,A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

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, 2008, Minas Gerais. **Anais...Minas Gerais**, 2008.

SPIELMANN, H.; GENSCHOW, M.; LIEBSCH, M.; HALLE, W., Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. **Altern. Lab. Anim.**, v. 27, p. 957-966, 1999.

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**. London: Macmillan Press., 1995.

STROBL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discov. Today**, v. 5, p. 29- 41, 2000.

SUCKOW, M. A.; WEISBROTH, S. H.; FRANKLIN, C. L.; eds. **The Laboratory Rat**. San Diego, CA.: Elsevier, 2006.

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.**, v. 20, n.1, p.21-26, 2006.

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

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

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.**, v.14, n.3, p.147-54, 2003.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v.42, p.189-306, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Laboratório de Proteção Florestal. **Proteção florestal: toxicologia** Disponível em: < [http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind\\_toxicologia.html](http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/ind_toxicologia.html)>. Acesso em: 2 set. 2008.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50. **Rev. Eletrônica Farm.**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

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

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discov. Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.

VIDAL HERNÁNDEZ, L. **La reproducción sexual y multiplicación vegetativa de las anonáceas**. Xalapa, Veracruz: Universidade Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas, 1993. Publicación Técnica, 3.

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

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

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; MACHADO, L. K. A.; BEVILÁQUA, C. M. L.; COSTA, I. R. S.; BRASIL, N. V. G. P. S.; JÚNIOR, H. F. A. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n.5, p.567-571, set./out. 2011.

VILAR, J. B. *et al.* Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Braz. J. Biol.**, v.68, n.1, p. 141-147, 2008.

VILLELA, I. V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H. C.; SILVEIRA, J. D. Bioensaios para monitoramento de genotoxicidade ambiental. *In*: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre, RS: Ed. Alcance, 2003.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; *In*: CORDELL, G. A. **The Alkaloids**. San Diego: Ed. Academic Press, 1998. v. 50. p. 509–520.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOKE, C. E.; PALMER, K. H.; MEPHAIL, A. T.; SIM, G. A. (1966). Plant antitumor agents I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukaemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, p. 3888-3890.

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

WENIGER, B.; ROUZIER, M.; DAGUILH, R.; HENRYS, D.; HENRYS, J.H.; ANTON, T. Popular medicine of the Central Plateau of Haiti 2. Ethnopharmacological inventory. **J Ethnopharmacol**, v. 17, p.13-30, 1986.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Handbook – Non Clinical Safety Testing**. Geneva: TDR/WHO, 2004. 117p. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/publications/safety-handbook.htm>>. Acesso em: 03 ago. 2012.

WILLS, D. E. **Biochemical basis of medicine**. 3<sup>ed.</sup> England, 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.**, v.58, n.6, p.909–15, 1995a.

WU, F.E. *et al.* Two new cytotoxic monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, anomuricins A and B, from the leaves of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, n.6, p. 830–36, 1995b.

WU, F.E., *et al.* Additional bioactive acetogenins, anomutacin and (2,4-trans and cis)-10 Rannonacin-A-ones, from the leaves of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, n.9, p. 1430–37, 1995c.

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

YAKUBU, M.T.; AKANJI, M. A.; OLADIJI, A. T. Alterations in serum lipid profile of male rats by oral administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem. **Res. J. Med. Plant.**, v. 2, p. 66-73, 2008.

YAKUBU, M.T.; AKANJI, M. A.; OLADIJI, A. T. Haematological evaluation in male albino rats following chronic administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem. **Pharmacol. Manag.**, v.3, p.34-38, 2007.

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.**, v. 72, n.25, p. 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.**, v.13, n.4, p.275–306, 1996b.

ZHANG, J. T. New drugs derived from medicinal plants. *Therapie*, v. 57, p.2137-2150, 2002.

## 9 ANEXO A

Tabela 13: Contagem diferencial dos parâmetros hematológicos dos animais fêmeas do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.

Parâmetros hematológicos	Dias de tratamento	Grupos experimentais				
		Controle	Tween 80 0,4%	AMFA 12,5	AMFA 25	AMFA 50
Segmentados (%)	30 dias	9,20 ± 0,84	8,50 ± 1,20	6,60 ± 0,37	7,30 ± 1,03	7,60 ± 0,65
Segmentados (%)	60 dias	8,70 ± 0,83	11,20 ± 1,29	9,20 ± 0,78	9,90 ± 1,39	12,30 ± 1,59
Segmentados (%)	90 dias	12,10 ± 1,05	14,20 ± 1,05	16,70 ± 1,11	16,90 ± 1,50	18,40 ± 2,11 <sup>a</sup>
Linfócitos (%)	30 dias	89,80 ± 0,90	90,60 ± 1,25	92,80 ± 0,39	91,90 ± 1,02	91,60 ± 0,65
Linfócitos (%)	60 dias	90,70 ± 0,87	88,60 ± 1,29	89,70 ± 0,68	89,20 ± 1,39	86,10 ± 1,58
Linfócitos (%)	90 dias	86,00 ± 1,26	84,30 ± 1,11	82,30 ± 0,93	80,80 ± 1,12 <sup>a</sup>	80,50 ± 2,04 <sup>a</sup>
Eosinófilos (%)	30 dias	0,50 ± 0,16	0,30 ± 0,15	0,60 ± 0,22	0,80 ± 0,20	1,00 ± 0,26
Eosinófilos (%)	60 dias	0,50 ± 0,16	0,20 ± 0,13	0,60 ± 0,16	0,50 ± 0,16	0,60 ± 0,16
Eosinófilos (%)	90 dias	0,80 ± 0,29	0,90 ± 0,17	0,80 ± 0,24	0,90 ± 0,27	0,70 ± 0,30
Monócitos (%)	30 dias	0,40 ± 0,22	0,50 ± 0,26	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,20 ± 0,13
Monócitos (%)	60 dias	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,40 ± 0,16	0,40 ± 0,22	0,20 ± 0,13
Monócitos (%)	90 dias	1,00 ± 0,25	0,60 ± 0,16	0,60 ± 0,30	0,60 ± 0,12	0,70 ± 0,26

ANOVA, seguido de Newman-Keuls: a = P<0,05 em relação ao controle.

Tabela 14: Contagem diferencial dos parâmetros hematológicos dos animais machos do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.

Parâmetros hematológicos	Dias de tratamento	Grupos experimentais				
		Controle	Tween 80 0,4%	AMFA 12,5	AMFA 25	AMFA 50
Segmentados (%)	30 dias	8,50 ± 0,34	11,60 ± 0,62	8,60 ± 0,82	10,50 ± 1,42	8,90 ± 0,81
Segmentados (%)	60 dias	10,40 ± 0,56	11,90 ± 0,69	15,20 ± 1,24	14,80 ± 1,77	12,90 ± 1,30
Segmentados (%)	90 dias	12,70 ± 0,76	13,90 ± 0,92	17,56 ± 1,63 <sup>a</sup>	17,90 ± 1,35 <sup>a</sup>	19,40 ± 1,34 <sup>a,b</sup>
Linfócitos (%)	30 dias	90,30 ± 0,37	87,40 ± 0,70	90,70 ± 0,93	88,80 ± 1,48	89,80 ± 0,89
Linfócitos (%)	60 dias	88,20 ± 1,05	87,90 ± 0,75	83,80 ± 1,20	84,60 ± 1,71	86,40 ± 1,29
Linfócitos (%)	90 dias	85,40 ± 0,68	84,80 ± 0,72	82,00 ± 1,70	80,10 ± 1,41 <sup>a,b</sup>	79,00 ± 1,54 <sup>a,b</sup>
Eosinófilos (%)	30 dias	0,50 ± 0,16	0,30 ± 0,15	0,60 ± 0,22	0,80 ± 0,20	1,00 ± 0,25
Eosinófilos (%)	60 dias	0,50 ± 0,16	0,10 ± 0,10	0,30 ± 0,15	0,40 ± 0,16	0,40 ± 0,22
Eosinófilos (%)	90 dias	0,50 ± 0,22	0,80 ± 0,29	0,90 ± 0,34	1,00 ± 0,33	0,90 ± 0,27
Monócitos (%)	30 dias	0,40 ± 0,16	0,60 ± 0,22	0,20 ± 0,13	0,10 ± 0,10	0,20 ± 0,13
Monócitos (%)	60 dias	0,30 ± 0,21	0,10 ± 0,10	0,70 ± 0,15	0,20 ± 0,13	0,30 ± 0,15
Monócitos (%)	90 dias	0,80 ± 0,25	0,50 ± 0,22	0,60 ± 0,22	0,70 ± 0,21	0,70 ± 0,26

ANOVA, seguido de Newman-Keuls: a = P<0,05 em relação ao controle; b = P<0,05 em relação ao Tween 80 0,4%;

Tabela 15: Parâmetros bioquímicos dos animais fêmeas do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.

Parâmetros bioquímicos	Dias de Tratamento	Grupos experimentais				
		Controle	Tween 80 0,4%	AMFA 12,5	AMFA 25	AMFA 50
GLI (mg/dL)	30 dias	84,4 ± 4,06	83,0 ± 7,15	68,0 ± 4,92	77,4 ± 3,57	70,1 ± 2,69
GLI (mg/dL)	60 dias	82,0 ± 4,58	76,0 ± 8,75	71,1 ± 6,47	71,2 ± 3,51	81,1 ± 5,21
GLI (mg/dL)	90 dias	93,4 ± 5,26	96,6 ± 6,11	101,5 ± 9,00	111,1 ± 7,07	116,5 ± 7,54
CT (mg/dL)	30 dias	76,1 ± 2,27	69,5 ± 2,26	67,1 ± 3,89	71,4 ± 2,96	77,7 ± 4,11
CT (mg/dL)	60 dias	74,40 ± 1,74	73,50 ± 2,98	76,50 ± 2,28	71,90 ± 2,15	78,40 ± 3,77
CT (mg/dL)	90 dias	67,4 ± 2,47	65,8 ± 3,82	68,6 ± 4,73	69,1 ± 4,21	71,2 ± 3,01
TG (mg/dL)	30 dias	46,6 ± 5,83	42,9 ± 4,03	51,0 ± 5,30	48,7 ± 5,47	92,8 ± 3,65 <sup>a,b,c,d</sup>
TG (mg/dL)	60 dias	44,4 ± 7,34	38,9 ± 5,03	40,3 ± 4,09	34,2 ± 3,56	38,2 ± 4,43
TG (mg/dL)	90 dias	43,7 ± 3,40	46,5 ± 6,59	45,3 ± 4,82	43,3 ± 4,44	37,7 ± 3,57
UR (mg/dL)	30 dias	47,7 ± 1,64	46,7 ± 3,09	48,2 ± 1,23	47,2 ± 1,88	47,4 ± 2,15
UR (mg/dL)	60 dias	43,0 ± 3,12	41,9 ± 2,51	41,0 ± 2,49	43,3 ± 1,77	48,1 ± 3,06
UR (mg/dL)	90 dias	55,7 ± 1,77	54,3 ± 2,35	49,0 ± 2,55	56,2 ± 2,19	51,9 ± 2,67
CR (mg/dL)	30 dias	0,47 ± 0,033	0,45 ± 0,021	0,48 ± 0,018	0,45 ± 0,010	0,41 ± 0,035
CR (mg/dL)	60 dias	0,48 ± 0,017	0,53 ± 0,025	0,49 ± 0,008	0,52 ± 0,025	0,51 ± 0,019
CR (mg/dL)	90 dias	0,55 ± 0,027	0,61 ± 0,029	0,63 ± 0,019	0,62 ± 0,025	0,62 ± 0,014
AU (mg/dL)	30 dias	1,20 ± 0,078	1,32 ± 0,079	1,18 ± 0,031	1,23 ± 0,054	1,14 ± 0,027
AU (mg/dL)	60 dias	0,98 ± 0,12	0,85 ± 0,11	0,52 ± 0,036 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,063 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,053 <sup>a</sup>
AU (mg/dL)	90 dias	1,01 ± 0,067	1,04 ± 0,060	1,02 ± 0,087	1,18 ± 0,080	1,08 ± 0,131
AST (U/L)	30 dias	85,3 ± 6,57	82,1 ± 4,18	80,6 ± 3,15	81,8 ± 3,99	79,4 ± 3,81
AST (U/L)	60 dias	70,3 ± 2,27	68,6 ± 2,50	71,8 ± 4,06	68,4 ± 2,97	61,5 ± 3,48
AST (U/L)	90 dias	59,6 ± 3,37	73,9 ± 4,10	63,6 ± 3,30	70,1 ± 4,58	71,8 ± 5,06

continua

Parâmetros bioquímicos	Dias de tratamento	Grupos experimentais				
		Controle	Tween 80 0,4%	AMFA 12,5	AMFA 25	AMFA 50
ALT (U/L)	30 dias	32,3 ± 1,22	32,1 ± 1,46	34,1 ± 1,72	29,7 ± 0,97	31,1 ± 1,37
ALT (U/L)	60 dias	30,3 ± 1,19	30,0 ± 1,70	30,9 ± 1,17	35,2 ± 1,34	33,9 ± 1,59
ALT (U/L)	90 dias	26,3 ± 1,60	24,1 ± 1,10	28,1 ± 1,34	28,5 ± 0,86	28,7 ± 1,51
FA (U/L)	30 dias	294,6 ± 12,62	275,6 ± 19,52	320,2 ± 18,53	298,3 ± 10,39	285,3 ± 9,28
FA (U/L)	60 dias	190,9 ± 10,10	168,1 ± 11,45	199,7 ± 9,86	173,6 ± 6,22	176,8 ± 6,37
FA (U/L)	90 dias	59,4 ± 4,56	51,1 ± 3,68	61,6 ± 5,30	60,1 ± 3,51	64,0 ± 4,71
ALB (g/dL)	30 dias	3,83 ± 0,05	3,72 ± 0,04	3,75 ± 0,03	3,85 ± 0,05	3,88 ± 0,06
ALB (g/dL)	60 dias	4,19 ± 0,07	4,12 ± 0,06	4,27 ± 0,04	4,23 ± 0,04	4,06 ± 0,05
ALB (g/dL)	90 dias	4,05 ± 0,05	3,97 ± 0,06	4,06 ± 0,06	4,08 ± 0,05	3,96 ± 0,05
GLOB (g/dL)	30 dias	1,68 ± 0,08	1,75 ± 0,05	1,78 ± 0,07	1,81 ± 0,09	1,76 ± 0,08
GLOB (g/dL)	60 dias	1,77 ± 0,07	1,62 ± 0,07	1,69 ± 0,05	1,72 ± 0,08	1,82 ± 0,05
GLOB (g/dL)	90 dias	1,44 ± 0,08	1,54 ± 0,08	1,63 ± 0,07	1,43 ± 0,07	1,62 ± 0,14
PT (g/dL)	30 dias	5,51 ± 0,09	5,5 ± 0,06	5,52 ± 0,07	5,65 ± 0,07	5,67 ± 0,08
PT (g/dL)	60 dias	5,98 ± 0,10	5,76 ± 0,09	6,01 ± 0,07	5,97 ± 0,07	5,88 ± 0,06
PT (g/dL)	90 dias	5,50 ± 0,03	5,51 ± 0,07	5,69 ± 0,08	5,50 ± 0,06	5,65 ± 0,10
AMI (U/L)	30 dias	758,5 ± 1,74	747,8 ± 4,51	726,1 ± 7,50 <sup>a,b</sup>	725,8 ± 5,05 <sup>a,b</sup>	708,7 ± 7,04 <sup>a,b</sup>
AMI (U/L)	60 dias	762,5 ± 4,73	768,1 ± 2,17	766,8 ± 1,91	769,9 ± 7,60	760,1 ± 2,51
AMI (U/L)	90 dias	724,1 ± 7,55	715,5 ± 6,03	701,6 ± 9,20	721,5 ± 4,63	715,7 ± 7,95

ANOVA, seguido de Newman-Keuls: a =  $p < 0,05$  em relação ao controle; b =  $p < 0,05$  em relação ao Tween 80 0,4%; c =  $p < 0,05$  em relação ao AMFA 12,5 mg/kg; d =  $p < 0,05$  em relação ao AMFA 25 mg/kg.



Tabela 16: Parâmetros bioquímicos dos animais machos do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.

Parâmetros bioquímicos	Dias de tratamento	Grupos experimentais				
		Controle	Tween 80 0,4%	AMFA 12,5	AMFA 25	AMFA 50
GLI (mg/dL)	30 dias	83,9 ± 4,27	85,3 ± 4,46	83,9 ± 3,48	75,0 ± 2,67	65,4 ± 3,94 <sup>a,b,c</sup>
GLI (mg/dL)	60 dias	60,8 ± 4,68	60,5 ± 3,22	78,9 ± 3,21 <sup>a,b</sup>	81,3 ± 7,01 <sup>a,b</sup>	95,5 ± 6,43 <sup>a,b</sup>
GLI (mg/dL)	90 dias	124,0 ± 4,09	125,3 ± 6,27	113,2 ± 2,95	112,9 ± 6,45	113,5 ± 3,88
CT (mg/dL)	30 dias	79,4 ± 2,54	71,5 ± 1,96	74,5 ± 2,24	69,2 ± 3,11	88,0 ± 3,79 <sup>a,b,c,d</sup>
CT (mg/dL)	60 dias	88,3 ± 3,41	88,4 ± 2,39	85,2 ± 2,70	78,2 ± 2,78	86,9 ± 2,96
CT (mg/dL)	90 dias	78,9 ± 2,66	76,0 ± 2,53	78,1 ± 2,78	76,1 ± 1,55	83,5 ± 3,35
TG (mg/dL)	30 dias	107,4 ± 8,91	125,2 ± 10,00	110,2 ± 12,00	127,6 ± 11,75	153,3 ± 12,27 <sup>a,c</sup>
TG (mg/dL)	60 dias	76,3 ± 8,04	89,6 ± 7,58	95,4 ± 9,41	86,3 ± 8,01	88,6 ± 6,81
TG (mg/dL)	90 dias	84,6 ± 8,07	108,3 ± 5,65	94,1 ± 8,47	104,5 ± 11,38	87,7 ± 12,35
UR (mg/dL)	30 dias	40,8 ± 2,11	42,3 ± 1,38	39,6 ± 1,30	39,6 ± 1,35	39,7 ± 1,37
UR (mg/dL)	60 dias	45,1 ± 2,21	37,7 ± 2,09	39,4 ± 1,75	42,3 ± 2,15	45,0 ± 2,19
UR (mg/dL)	90 dias	45,1 ± 1,62	41,1 ± 0,94	39,9 ± 1,79	46,3 ± 1,62	46,1 ± 2,58
CR (mg/dL)	30 dias	0,45 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,44 ± 0,01
CR (mg/dL)	60 dias	0,49 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,47 ± 0,01	0,49 ± 0,03	0,49 ± 0,02
CR (mg/dL)	90 dias	0,57 ± 0,01	0,65 ± 0,04	0,62 ± 0,03	0,68 ± 0,04	0,65 ± 0,02
AU (mg/dL)	30 dias	1,08 ± 0,07	0,96 ± 0,09	0,90 ± 0,06	1,15 ± 0,08	1,18 ± 0,05
AU (mg/dL)	60 dias	0,49 ± 0,06	0,41 ± 0,09	0,37 ± 0,07	0,38 ± 0,05	0,34 ± 0,03
AU (mg/dL)	90 dias	0,57 ± 0,03	0,55 ± 0,04	0,56 ± 0,03	0,68 ± 0,08	0,74 ± 0,04
AST (U/L)	30 dias	89,3 ± 2,57	84,6 ± 3,30	76,8 ± 3,20	105,9 ± 7,11 <sup>a,b,c,e</sup>	92,7 ± 3,75
AST (U/L)	60 dias	78,5 ± 3,37	70,9 ± 4,31	63,8 ± 4,51	78,4 ± 2,45	69,1 ± 4,74
AST (U/L)	90 dias	66,5 ± 4,80	59,2 ± 1,96	55,6 ± 2,12	66,4 ± 3,04	64,3 ± 4,00

continua

Parâmetros bioquímicos	Dias de tratamento	Grupos experimentais				
		Controle	Tween 80 0,4%	AMFA 12,5	AMFA 25	AMFA 50
ALT (U/L)	30 dias	41,0 ± 1,16	39,0 ± 1,70	36,4 ± 1,19	40,9 ± 1,82	37,0 ± 0,82
ALT (U/L)	60 dias	39,0 ± 3,78	37,2 ± 1,40	30,1 ± 1,17 <sup>a,b,d,e</sup>	40,5 ± 1,42	40,3 ± 1,56
ALT (U/L)	90 dias	31,1 ± 1,30	28,8 ± 0,85	25,9 ± 1,25 <sup>a,d,e</sup>	32,1 ± 1,56	30,2 ± 0,48
FA (U/L)	30 dias	452,8 ± 28,42	461,2 ± 19,43	457,3 ± 17,42	509,5 ± 26,42	480,6 ± 30,61
FA (U/L)	60 dias	350,6 ± 17,11	342,1 ± 14,87	315,4 ± 16,91	345,4 ± 17,95	320,6 ± 23,94
FA (U/L)	90 dias	118,3 ± 7,18	112,3 ± 4,32	107,4 ± 4,97	112,2 ± 5,74	104,7 ± 4,84
ALB (g/dL)	30 dias	3,59 ± 0,04	3,58 ± 0,06	3,64 ± 0,04	3,66 ± 0,05	3,65 ± 0,05
ALB (g/dL)	60 dias	3,92 ± 0,04	3,97 ± 0,06	3,84 ± 0,04	4,00 ± 0,04	3,99 ± 0,05
ALB (g/dL)	90 dias	3,85 ± 0,06	3,95 ± 0,08	4,04 ± 0,04	3,93 ± 0,05	3,99 ± 0,03
GLOB (g/dL)	30 dias	1,87 ± 0,12	1,66 ± 0,05	1,69 ± 0,03	1,80 ± 0,08	1,87 ± 0,10
GLOB (g/dL)	60 dias	1,84 ± 0,05	1,73 ± 0,06	1,83 ± 0,05	1,70 ± 0,08	1,62 ± 0,03
GLOB (g/dL)	90 dias	1,34 ± 0,03	1,18 ± 0,07	1,26 ± 0,06	1,40 ± 0,06	1,29 ± 0,04
PT (g/dL)	30 dias	5,46 ± 0,11	5,24 ± 0,06	5,34 ± 0,05	5,47 ± 0,10	5,53 ± 0,08
PT (g/dL)	60 dias	5,74 ± 0,06	5,69 ± 0,06	5,65 ± 0,04	5,71 ± 0,08	5,60 ± 0,06
PT (g/dL)	90 dias	5,16 ± 0,07	5,07 ± 0,06	5,28 ± 0,04	5,33 ± 0,07	5,26 ± 0,05
AMI (U/L)	30 dias	742,1 ± 11,66	748,2 ± 3,81	751,9 ± 4,54	725,8 ± 8,28	712,8 ± 6,84 <sup>a,b,c</sup>
AMI (U/L)	60 dias	760,3 ± 7,81	747,8 ± 3,99	762,2 ± 3,16	751,9 ± 4,66	760,8 ± 2,57
AMI (U/L)	90 dias	733,8 ± 4,45	723,0 ± 4,66	708,5 ± 9,46	720,0 ± 7,14	731,0 ± 6,85

ANOVA, seguido de Newman-Keuls: a = p<0,05 em relação ao controle; b = p<0,05 em relação ao Tween 80 0,4%; c = p<0,05 em relação ao AMFA 12,5 mg/kg; d = p<0,05 em relação ao AMFA 25 mg/kg.

Tabela 17: Parâmetros hematológicos dos animais fêmeas do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.

Parâmetros hematológicos	Dias de tratamento	Grupos experimentais				
		Controle	Tween 80 0,4%	AMFA 12,5	AMFA 25	AMFA 50
Le ( $10^3/\mu\text{L}$ )	30 dias	6,5 ± 0,41	6,7 ± 0,40	6,7 ± 0,47	6,2 ± 0,25	6,0 ± 0,30
Le ( $10^3/\mu\text{L}$ )	60 dias	9,3 ± 0,31	8,5 ± 0,31	7,2 ± 0,22 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,22 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,39 <sup>a</sup>
Le ( $10^3/\mu\text{L}$ )	90 dias	9,7 ± 0,50	8,7 ± 0,23	8,8 ± 0,53	9,8 ± 0,53	10,0 ± 0,77
He ( $10^6/\mu\text{L}$ )	30 dias	6,9 ± 0,05	6,9 ± 0,20	6,9 ± 0,12	6,8 ± 0,09	6,7 ± 0,05
He ( $10^6/\mu\text{L}$ )	60 dias	7,5 ± 0,07	7,4 ± 0,06	7,3 ± 0,08	7,3 ± 0,08	7,4 ± 0,08
He ( $10^6/\mu\text{L}$ )	90 dias	7,9 ± 0,05	7,7 ± 0,12	7,9 ± 0,08	7,6 ± 0,11	7,7 ± 0,07
Hb (g/dL)	30 dias	13,3 ± 0,20	13,1 ± 0,27	13,2 ± 0,20	13,3 ± 0,13	12,7 ± 0,08
Hb (g/dL)	60 dias	14,3 ± 0,15	13,9 ± 0,06	14,1 ± 0,19	14,0 ± 0,19	13,7 ± 0,14
Hb (g/dL)	90 dias	14,4 ± 0,09	14,1 ± 0,12	14,3 ± 0,13	14,2 ± 0,09	14,1 ± 0,09
Ht (%)	30 dias	41,5 ± 0,42	40,8 ± 0,86	40,2 ± 0,66	41,2 ± 0,41	39,3 ± 0,32
Ht (%)	60 dias	45,92 ± 0,35	44,94 ± 0,28	44,61 ± 0,55	44,61 ± 0,55	43,52 ± 0,39 <sup>a</sup>
Ht (%)	90 dias	45,3 ± 0,28	43,7 ± 0,51 <sup>a</sup>	44,7 ± 0,43	44,1 ± 0,46	43,4 ± 0,43 <sup>a</sup>
HCM (pg)	30 dias	19,5 ± 0,18	18,9 ± 0,28	19,0 ± 0,15	19,4 ± 0,14	18,9 ± 0,09
HCM (pg)	60 dias	18,9 ± 0,16	18,8 ± 0,14	19,2 ± 0,20	19,2 ± 0,20	18,7 ± 0,20
HCM (pg)	90 dias	18,2 ± 0,11	18,4 ± 0,15	18,1 ± 0,15	18,4 ± 0,18	18,2 ± 0,12
VCM (fL)	30 dias	60,4 ± 0,47	59,4 ± 0,35	58,7 ± 0,54 <sup>a</sup>	58,8 ± 0,43 <sup>a</sup>	58,1 ± 0,30 <sup>a</sup>
VCM (fL)	60 dias	61,1 ± 0,44	60,8 ± 0,38	61,1 ± 0,38	61,1 ± 0,38	58,9 ± 0,48 <sup>a,b,c,d</sup>
VCM (fL)	90 dias	57,2 ± 0,28	56,9 ± 0,29	56,7 ± 0,37	56,9 ± 0,41	55,5 ± 0,40 <sup>a</sup>
CHCM (g/dL)	30 dias	32,1 ± 0,22	32,2 ± 0,21	32,8 ± 0,18	32,4 ± 0,23	32,5 ± 0,13
CHCM (g/dL)	60 dias	31,0 ± 0,13	30,9 ± 0,21	31,5 ± 0,22	31,5 ± 0,22	31,5 ± 0,19
CHCM (g/dL)	90 dias	31,8 ± 0,11	32,3 ± 0,18	32,1 ± 0,16	32,3 ± 0,24	32,5 ± 0,11

<b>PL (10<sup>3</sup>/μL)</b>	30 dias	1016,0 ± 50,63	935,7 ± 65,24	1061,0 ± 22,56	1064,0 ± 38,19	1105,0 ± 48,55
<b>PL (10<sup>3</sup>/μL)</b>	60 dias	930,1 ± 31,00	936,5 ± 36,96	1025,0 ± 28,74	1025,0 ± 28,74	999,6 ± 43,52
<b>PL (10<sup>3</sup>/μL)</b>	90 dias	750,5 ± 25,94	780,7 ± 22,70	828,9 ± 19,63	852,0 ± 31,36	872,3 ± 49,15
<b>RDW (%)</b>	30 dias	12,9 ± 0,15	12,7 ± 0,14	12,7 ± 0,15	12,6 ± 0,20	12,7 ± 0,16
<b>RDW (%)</b>	60 dias	13,4 ± 0,23	12,9 ± 0,21	12,7 ± 0,28	12,7 ± 0,28	13,4 ± 0,40
<b>RDW (%)</b>	90 dias	14,2 ± 0,21	13,8 ± 0,20	13,5 ± 0,22	13,9 ± 0,28	14,5 ± 0,37

ANOVA, seguido de Newman-Keuls: a = p<0,05 em relação ao controle; b = p<0,05 em relação ao Tween 80 0,4%; c = p<0,05 em relação ao AMFA 12,5 mg/kg; d = p<0,05 em relação ao AMFA 25 mg/kg.

Tabela 18: Parâmetros hematológicos dos animais machos do ensaio de toxicidade crônica 90 dias.

Parâmetros hematológicos	Dias de tratamento	Grupos experimentais				
		Controle	Tween 80 0,4%	AMFA 12,5	AMFA 25	AMFA 50
Le ( $10^3/\mu\text{L}$ )	30 dias	4,5 ± 0,52	5,4 ± 0,44	4,9 ± 0,33	4,5 ± 0,35	4,7 ± 0,36
Le ( $10^3/\mu\text{L}$ )	60 dias	6,6 ± 0,49	6,4 ± 0,57	5,7 ± 0,30	5,4 ± 0,42	5,5 ± 0,50
Le ( $10^3/\mu\text{L}$ )	90 dias	8,4 ± 0,53	7,4 ± 0,42	7,3 ± 0,34	6,9 ± 0,48	8,1 ± 0,50
He ( $10^6/\mu\text{L}$ )	30 dias	6,4 ± 0,07	6,4 ± 0,05	6,3 ± 0,09	6,4 ± 0,08	6,4 ± 0,11
He ( $10^6/\mu\text{L}$ )	60 dias	6,8 ± 0,07	6,7 ± 0,08	6,9 ± 0,10	6,6 ± 0,07	6,6 ± 0,07
He ( $10^6/\mu\text{L}$ )	90 dias	7,0 ± 0,07	6,9 ± 0,06	6,9 ± 0,06	6,9 ± 0,05	7,0 ± 0,10
Hb (g/dL)	30 dias	13,0 ± 0,16	12,9 ± 0,26	12,6 ± 0,17	12,8 ± 0,12	12,4 ± 0,21
Hb (g/dL)	60 dias	13,5 ± 0,15	13,4 ± 0,14	13,9 ± 0,19	13,3 ± 0,16	13,3 ± 0,14
Hb (g/dL)	90 dias	13,6 ± 0,10	13,4 ± 0,15	13,5 ± 0,11	13,4 ± 0,14	13,6 ± 0,14
Ht (%)	30 dias	38,0 ± 0,40	37,0 ± 0,44	36,8 ± 0,49	37,4 ± 0,44	36,2 ± 0,61
Ht (%)	60 dias	42,2 ± 0,47	42,0 ± 0,72	43,2 ± 0,52	41,2 ± 0,49	39,9 ± 0,45 <sup>a,b,c</sup>
Ht (%)	90 dias	41,6 ± 0,26	40,7 ± 0,51	40,7 ± 0,28	40,4 ± 0,31	40,8 ± 0,48
HCM (pg)	30 dias	20,1 ± 0,14	20,3 ± 0,35	19,8 ± 0,18	20,1 ± 0,19	19,4 ± 0,20
HCM (pg)	60 dias	19,9 ± 0,15	19,9 ± 0,22	20,0 ± 0,24	20,0 ± 0,15	20,0 ± 0,13
HCM (pg)	90 dias	19,5 ± 0,06	19,3 ± 0,16	19,4 ± 0,16	19,3 ± 0,16	19,3 ± 0,09
VCM (fL)	30 dias	58,9 ± 0,29	58,0 ± 0,39	58,0 ± 0,43	58,3 ± 0,36	56,5 ± 0,41 <sup>a,b,c,d</sup>
VCM (fL)	60 dias	62,3 ± 0,34	62,6 ± 0,39	62,6 ± 0,45	62,1 ± 0,43	60,5 ± 0,24 <sup>a,b,c,d</sup>
VCM (fL)	90 dias	59,3 ± 0,26	58,2 ± 0,44	58,2 ± 0,30	58,3 ± 0,37	57,7 ± 0,27 <sup>a</sup>
CHCM (g/dL)	30 dias	34,2 ± 0,23	34,8 ± 0,46	34,3 ± 0,13	34,5 ± 0,19	34,3 ± 0,24
CHCM (g/dL)	60 dias	31,9 ± 0,25	31,9 ± 0,37	31,9 ± 0,34	32,3 ± 0,18	32,6 ± 0,31
CHCM (g/dL)	90 dias	32,9 ± 0,15	33,0 ± 0,12	33,4 ± 0,15	33,0 ± 0,16	33,2 ± 0,16

continua

<b>PL (10<sup>3</sup>/μL)</b>	30 dias	1148,0 ± 40,53	1083,0 ± 85,55	1056,0 ± 73,83	1120,0 ± 31,59	1052,0 ± 85,33
<b>PL (10<sup>3</sup>/μL)</b>	60 dias	1057,0 ± 38,61	1052,0 ± 44,75	1066,0 ± 61,67	989,0 ± 50,17	975,7 ± 63,48
<b>PL (10<sup>3</sup>/μL)</b>	90 dias	1019,0 ± 41,60	938,9 ± 48,92	976,9 ± 48,79	907,0 ± 40,82	1008,0 ± 27,02
<b>RDW (%)</b>	30 dias	11,5 ± 0,24	11,8 ± 0,24	12,0 ± 0,27	11,7 ± 0,25	11,8 ± 0,16
<b>RDW (%)</b>	60 dias	12,3 ± 0,17	12,7 ± 0,21	12,5 ± 0,29	12,3 ± 0,30	12,6 ± 0,07
<b>RDW (%)</b>	90 dias	13,0 ± 0,19	12,9 ± 0,22	13,0 ± 0,34	13,0 ± 0,22	12,9 ± 0,13

ANOVA, seguido de Newman-Keuls: a = p<0,05 em relação controle; b = p<0,05 em relação ao Tween 80 0,4%; c = p<0,05 em relação ao AMFA 12,5 mg/kg; d = p<0,05 em relação ao AMFA 25 mg/kg.