



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

FRANCISCO STEFÂNIO BARRETO

**ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPOSTOS OBTIDOS DO
EXTRATO ACETÔNICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L. POR
FRACIONAMENTO BIOGUIADO**

FORTALEZA

2014

FRANCISCO STEFÂNIO BARRETO

**ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPOSTOS OBTIDOS DO
EXTRATO ACETÔNICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L. POR
FRACIONAMENTO BIOGUIADO**

Dissertação submetida à coordenação do programa de pós-graduação em Farmacologia pertencente ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Co-orientador: Dr. Diego Veras Wilke

FORTALEZA

2014

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

B262e

Barreto, Francisco Stefânio.

Estudo da atividade citotóxica de compostos obtidos do extrato acetônico das folhas de *Amnona muricata* L. por fracionamento bioguiado/ Francisco Stefânio Barreto. – 2014.
89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2014.

Área de concentração: Farmacologia.

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

Coorientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

1. Acetogeninas. 2. Annonaceae. 3. Citotoxinas. I. Título.

CDD 615.32322

FRANCISCO STEFÂNIO BARRETO

**ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPOSTOS OBTIDOS DO
EXTRATO ACETÔNICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L. POR
FRACIONAMENTO BIOGUIADO**

Dissertação submetida à coordenação do programa de pós-graduação em Farmacologia pertencente ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Diego Veras Wilke (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará

Dra. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará

Dr. Marcos Venício Alves Lima
Instituto do Câncer do Ceará

Dedico esta dissertação à minha mãe, Maria de Fátima Barreto (*in memoriam*), à minha avó Francisca Leite de Oliveira, aos meus irmãos Stênio Viana da Silva e Lucitânia Viana da Silva, aos meus sobrinhos Laís Viana Rodrigues, Marcos Vinícius de Sousa Viana, Cícero Aurélio de Sousa Viana e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Aos que se tornaram familiares,

Aos que nasceram familiares

E aos que conheci antes de ontem.

Agradeço tanto aos que me deixam louco,

Quanto aos que enlouqueço.

Aos que me criticam em tudo,

E a um ou outro que atura minha "chatura"

Aos amigos que correm,

Aos amigos que contemplam.

Aos que me consideram muito,

E aos muitos que, com razão, fazem pouco.

Aos que conhecem o que penso,

E aos que só conhecem o que faço.

Aos que passam o dia todo comigo,

E aos que estão todo tempo em mim.

Este trabalho é a soma de todos vocês!

E se ele não é melhor,

É por falta de memória,

Mas não por falta de amigos.

Texto extraído do livro *Biologia da Conservação*

(Richard B. Primack & Efraim Rodrigues)

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho, e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor”.

J. W. Von Goethe

RESUMO

O câncer é uma complexa doença de origem genética, resultante de mutações em proto-oncogenes e/ou genes supressores tumorais. É considerada uma das principais causas de morte por doença no mundo. Estudos preliminares com o extrato acetônico e compostos isolados da espécie *Annona muricata* evidenciaram o seu potencial antitumoral. *Annona muricata* L. (Annonaceae) é popularmente conhecida como gravioleira; possui ampla distribuição, principalmente em regiões tropicais. No Brasil, a espécie é utilizada como analgésico, hipoglicemiante, anti-inflamatório, antitérmico, hepatoprotetor, antinevrálgico, antiparasitário e antirreumático. O presente trabalho descreve o isolamento de uma acetogenina, denominada anonacina, com anel mono-tetrahydrofurano, fórmula molecular $C_{35}H_{64}O_7$ e massa de 596 u.m.a à partir do extrato acetônico das folhas da referida espécie, através de prospecção química bioguiada pela citotoxicidade usando o ensaio do MTT. Todas as frações obtidas e a acetogenina isolada na prospecção apresentaram potencial citotóxico nas linhagens tumorais testadas. Os valores de concentração inibitória média dessa acetogenina, apresentaram-se na ordem de nano-molar. O ensaio de citotoxicidade mostrou que esse composto apresenta atividade antiproliferativa frente à todas as linhagens tumorais testadas, com CI_{50} variando de 3.280 nM a 1,56 nM em HL-60 e HCT-116, respectivamente após 72 horas de incubação, onde a substância foi mais ativa frente às linhagens HCT-116, OVCAR-8, SF-295 e PC-3M. Essa acetogenina não foi capaz de inibir a proliferação de células mononucleares do sangue periférico, embora tenha apresentado efeito hemolítico em eritrócitos de camundongos. A acetogenina AMFA-4, em linhagem de célula de câncer colorretal, apresentou efeito citotóxico dependente da dose e do tempo de incubação, sendo capaz de alterar o número de células viáveis e não-viáveis após 48 e 72 h de exposição. Nesses dois tempos de incubação, essa molécula foi capaz de alterar a morfologia das células HCT-116, onde a mesma teve aumento do núcleo e citoplasma e aspecto fusiforme. O presente trabalho mostrou que o extrato acetônico das folhas de *A. muricata* é uma fonte promissora para obtenção de compostos pertencentes a classe das acetogeninas com atividade citotóxica relevante em células tumorais de origem humana.

Palavras-chave: Acetogeninas. Annonaceae. Citotoxinas.

ABSTRACT

Cancer is a complex disease of genetic origin, resulting from mutations in proto-oncogenes and / or tumor suppressor genes. It is considered one of the major causes of death in the world. Preliminary studies with the acetone extract and isolated compounds from the *Annona muricata* species demonstrated their antitumor potential. *Annona muricata* L. (Annonaceae), popularly known as soursop, has wide distribution, mainly in the tropical regions. In Brazil, the species is widely used as analgesic, hypoglycemic, anti-inflammatory, antipyretic, hepatoprotective, anti-neuralgic, anti-parasitic and anti-rheumatic. This study reports the isolation of an acetogenin, called Annonacin, with a mono-tetrahydrofuran ring, the molecular formula: $C_{35}H_{64}O_7$ and a mass of 596 u.m.a from the acetone extract of *Annona muricata* leaves through a bioguided chemical prospecting by cytotoxicity using the MTT assay. All the obtained fractions and the isolated acetogenin showed a cytotoxic potential in the tested tumor cell lines. The values of the mean inhibitory concentration of this acetogenin, had an order of nano-molar. The cytotoxicity assay demonstrated that the compound has anti-proliferative activity against all the tested tumor cell lines, with an IC₅₀ ranging from 3.280 nM to 1.56 nM in HL-60 and HCT-116, respectively, after 72 hours of incubation, where the substance was most active against the following tumor cell lines: HCT-116, OVCAR-8, SF-295 and PC-3M. This acetogenin was not able to inhibit the proliferation of normal peripheral blood cells, although it showed a hemolytic effect on mice erythrocytes. The Annonacin, in a colorectal cancer cell line, showed a cytotoxic effect strongly related to the dose and incubation time, being able to change the number of viable and non-viable cells after 48 and 72 h of exposure. In both incubation times, this molecule was able to modify the HCT-116 cell morphology, where it had an increase on the cytoplasm and nucleus size, besides a fusiform appearance. This study showed that the acetone extract from the *A. muricata* leaves is a promising source for obtaining compounds belonging to the acetogenins class with significant cytotoxic activity on tumor cells of human origin.

Key words: Acetogenins. Annonaceae. Cytotoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Heterogeneidade intratumoral.....	16
Figura 2	Taxas brutas de incidência das localizações primárias estimadas para 2014, em homens e mulheres, exceto pele não melanoma.....	17
Figura 3	Características das células tumorais.....	18
Figura 4	Mapa de distribuição da família Annonaceae no mundo.....	22
Figura 5	Fotos de <i>Annona muricata</i>	23
Figura 6	Estruturas químicas de acetogeninas citotóxicas isoladas de <i>Annona muricata</i>	25
Figura 7	Alcaloides isoquinolínicos citotóxicos isolados de <i>A. muricata</i>	27
Figura 8	Desenho experimental do trabalho, com as etapas e metodologias adotadas.	29
Figura 9	Preparação do extrato bruto acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> L.....	40
Figura 10	Cromatograma analítico do extrato acetônico de <i>A. muricata</i>	41
Figura 11	Etapas do fracionamento bioguiado pelo ensaio de citotoxicidade (MTT) do extrato acetônico de <i>A. muricata</i>	42
Figura 12	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> em dose única de 25 µg/mL das frações oriundas do extrato acetônico de <i>A. muricata</i> através do método do MTT após 72 horas de incubação em 3 linhagens de células tumorais.....	43
Figura 13	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> em dose única de 25 µg/mL das frações oriundas da partição de AMFA-A através do método do MTT após 72 horas de incubação em 3 linhagens de células tumorais.....	45
Figura 14	Cromatograma analítico da fração enriquecida com a anonacina.....	48
Figura 15	Citotoxicidade dose-tempo dependente da anonacina na linhagem tumoral de cólon HCT-116 avaliado pelo método do MTT após 48 e 72 h de incubação.....	51
Figura 16	Efeito da anonacina na viabilidade de HCT-116 determinado pelo método de exclusão do corante azul de Trypan após 48 (A) e 72 h (B) de incubação.....	53
Figura 17	Análise morfológica de células HCT-116 após 48 e 72 h de incubação com anonacina e coradas pelo kit panótico rápido.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens tumorais usadas no ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade.....	33
Tabela 2	Concentração inibitória média (CI ₅₀) e avaliação do potencial hemolítico <i>in vitro</i> das frações AMFA-A e AMFA-M através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 4 linhagens de células tumorais.....	44
Tabela 3	Concentração inibitória média (CI ₅₀) das frações AMFA-A através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 4 linhagens de células tumorais.....	46
Tabela 4	Concentração inibitória média (CI ₅₀) da fração A12.2 através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 4 linhagens de células tumorais.....	47
Tabela 5	Estrutura e características químicas da anonacina.....	49
Tabela 6	Concentração inibitória média da anonacina em linhagens celulares tumorais e não-tumorais (CMSP) através do método do MTT após 72 horas de incubação.....	50
Tabela 7	Concentração inibitória média da anonacina determinado pelo método do MTT na linhagem tumoral HCT-116 após 48 h de incubação.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
AMFA	<i>Annona muricata</i> Folhas Acetona
ANOVA	<i>Analisy of variance</i> (Análise de variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CI₅₀	Concentração inibitória média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DOX	Doxorrubicina
DPM	Desvio Padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Espectrometria de massa
GTP	Guanosina trifosfato
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HTS	<i>High Troughtput Screening</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LabNOE	Laboratório Nacional de Oncologia Experimental
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
NCI	National Cancer Institute
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	Proteína tumoral 53
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROT	Rotenona

rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
SFB	Soro Fetal Bovino
THF	Tetrahidrofurano
u.m.a	Unidade de massa atômica
UNIFAC	Unidade de Farmacologia Clínica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Câncer.....	16
1.2 Bases do tratamento das neoplasias.....	18
1.3 Produtos naturais utilizados no tratamento do câncer.....	19
1.4 Família Annonaceae.....	21
1.4.1 Gênero <i>Annona</i>	22
1.4.2 <i>Annona muricata</i> L.....	23
1.4.3 Acetogeninas.....	24
1.4.4 Alcaloides.....	26
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Materiais utilizados.....	29
3.2 Desenho experimental.....	29
3.3 Coleta e identificação do material vegetal.....	30
3.4 Obtenção do extrato bruto.....	30
3.5 Métodos cromatográficos.....	30
3.6 Fracionamento guiado pela citotoxicidade do extrato acetônico de <i>A. muricata</i>	31
3.6.1 Elucidação estrutural da acetogenina presente na fração AMFA-4.....	32
3.7 Manutenção das linhagens tumorais.....	32
3.7.1 Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> – Ensaio do MTT.....	33
3.7.2 Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleares do sangue periférico – Ensaio do alamar blue.....	34
3.7.3 Verificação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos swiss (<i>Mus musculus</i>).....	35
3.7.4 Avaliação da atividade antiproliferativa em linhagem de câncer colorretal através do método de exclusão do corante azul de Trypan.....	37
3.7.5 Análise morfológica – Coloração diferencial com panótico rápido.....	38
4 RESULTADOS.....	40

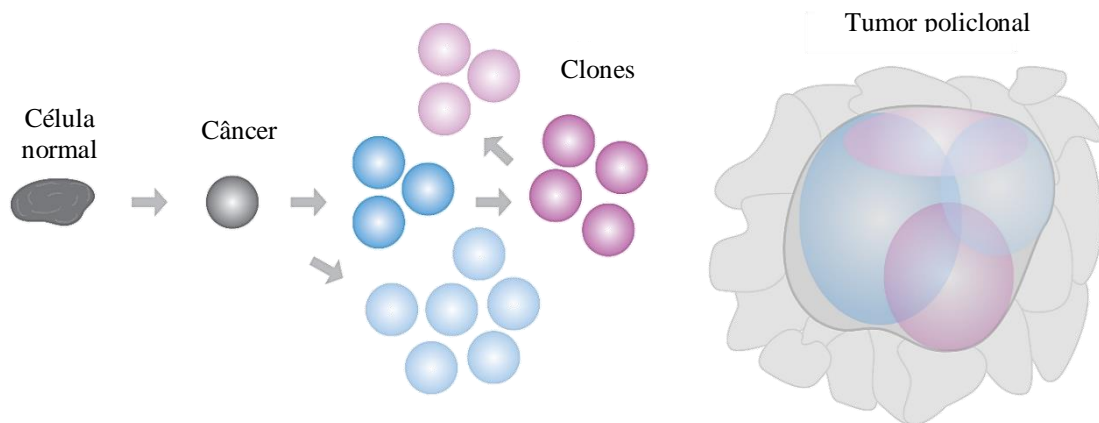
4.1 Fracionamento bioguiado de AMFA.....	40
4.2 Fracionamento bioguiado da fração acetato de etila.....	44
4.3 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade citotóxica da anonacina (MTT).....	49
4.4 Atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus</i>.....	52
4.5 Atividade antiproliferativa em HCT-116 através do método de exclusão do corante azul de Trypan.....	52
4.6 Análise morfológica das células HCT-116 tratadas com anonacina.....	53
5 DISCUSSÃO.....	56
6 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICE A.....	79
APÊNDICE B.....	80
APÊNDICE C.....	81
ANEXO A.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma complexa doença de origem genética, resultante de mutações em proto-oncogenes e/ou genes supressores tumorais, sendo desenvolvida por alterações em vias de sinalização celular (OUYANG et al., 2012). Hoje, é aceito que o tumor não é apenas uma massa de células cancerosas em proliferação e sim, um tecido complexo constituído por vários tipos de células diferentes que interagem entre si, consolidando a teoria que o câncer apresenta origem policlonal (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Durante a progressão do câncer podem ocorrer novas mutações em células individuais e estas células recém-transformadas podem continuar a proliferar e formar clones (Figura 1) (GERLINGER et al., 2012; LANDAU et al., 2013).

Figura 1. Heterogeneidade intratumoral.



Fonte: Adaptado de (LANDAU et al., 2013; GERLINGER et al., 2012)

A acumulação progressiva de mutações somáticas resulta em um tumor policlonal heterogêneo em que os diferentes clones podem responder de forma diferente ao tratamento.

O câncer foi amplamente considerado como uma doença de países desenvolvidos. No entanto, esse cenário vem mudando e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (NCI, 2013). Hoje, o câncer é considerado como um problema de saúde pública mundial e a Organização

Mundial da Saúde (OMS) estimou que, para o ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer e 17 milhões de mortes por causa da doença (INCA, 2012).

Ainda segundo o INCA (2013), as estimativas para os anos de 2014/2015, apontam a ocorrência de aproximadamente de 580 mil casos novos da doença no país, incluindo pele não melanoma. A figura 2 mostra os tipos mais incidentes para o sexo masculino e para o sexo feminino estimados para 2014 e 2015.

Figura 2. Taxas brutas de incidência das localizações primárias estimadas para 2014, em homens e mulheres, exceto pele não melanoma. Valores apresentados a cada 100 mil casos.



Fonte: INCA, 2014.

Uma revisão de literatura sobre as características das células cancerosas foi publicada por Hanahan e Weinberg (2011), fornecendo uma sólida base para a compreensão da biologia do câncer. A partir desta revisão concluiu-se que as células cancerosas possuem instabilidade genômica, evidenciando que os tumores apresentam a expressão de genes mutados, com desregulação do metabolismo energético em comparação à células não tumorais, autossuficiência em fatores de crescimento, que ocorre através da desregulação da produção e liberação de sinais que promovem a proliferação celular, causando alteração na arquitetura e função do tecido normal (MORENO-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ; MARÍN-HERNÁNDEZ, 2007; HANAHAN; WEINBERG, 2011). A homeostase do tecido fica comprometida uma vez que as células apresentam resistência a morte celular programada (apoptose) e aos sinais antiproliferativos evocados pelos genes supressores de tumores. Os dois protótipos genes supressores tumorais codificam as proteínas RB (associada ao retinoblastoma) e p53 (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além das características supracitadas, as células tumorais apresentam competência para invasão de tecidos adjacentes e percorrem o organismo até se alojar em um outro tecido, diferente daquele de origem (RIETHDORF et al., 2007). Todas essas características estão esquematizadas e resumidas na figura 3.

Figura 3. Características das células tumorais.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

1.2 Bases do tratamento das neoplasias

O câncer, em sua fase inicial, pode ser controlado cirurgicamente, método que pode ser aplicado com objetivo paliativo ou curativo. Cerca de 60% de todos os pacientes portadores de câncer necessitam de cirurgia para o seu tratamento (DUNCAM et al., 2003; SEGRETO, 2006).

Dos métodos terapêuticos disponíveis para o tratamento dos tumores, destaca-se o uso da radiação ionizante (adotado desde o final do século XIX) cujo objetivo é alcançar um índice terapêutico favorável, levando as células neoplásicas a perderem a sua clonogenicidade e, ao mesmo tempo, preservando os tecidos normais (SEGRETO, 2006). Nesse método, o dano celular é um processo complexo, que ocorre em decorrência da absorção da energia ionizante com a matéria viva, formando produtos altamente reativos, levando-as a ativação das vias intracelulares de morte, como a apoptose (INCA, 2002).

A quimioterapia antineoplásica consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação (poliquimioterapia). Os fármacos interferem nas funções bioquímicas vitais para as células, sendo o tratamento de escolha para doenças do sistema hematopoiético e para

os tumores sólidos, que apresentam ou não metástases regionais ou a distância (INCA, 2002). A maioria dos quimioterápicos antineoplásicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto benignas. Os antineoplásicos agem diretamente na célula, atuando nas diversas fases do ciclo celular (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004; SOUZA et al., 2007).

Para o desenvolvimento do organismo e manutenção da homeostase tecidual, a taxa de proliferação celular deve ser compensada com a taxa de morte celular. Nesse aspecto, a morte celular possui grande importância quando o tecido sofre injúrias, como nos processos inflamatórios e no câncer (JAIN et al., 2013). A morte celular pode ser classificada em apoptose, necrose, autofagia ou catástrofe mitótica, dentre outras. Estas vias podem estar interagindo ou não para a eliminação das células cancerosas do organismo (KROEMER et al., 2009). As drogas antitumorais, oriundas ou não de produtos naturais, visam restabelecer o processo de morte celular por um dos mecanismos supracitados.

Apesar dos avanços nas bases do tratamento dos pacientes portadores do câncer, ainda não há o método ideal que possa ser adotado com o intuito de suprimir os efeitos adversos sistêmicos, como depressão da medula óssea e das funções renal, hepática, pulmonar, gastrointestinal (MARTINS; ROSA, 2004; INCA, 2002). Nesse cenário, torna-se imprescindível a realização de pesquisas para a descoberta de novas drogas com especificidade para células tumorais, com maior eficácia terapêutica, que proporcionem um perfil toxicológico insignificante do ponto de vista clínico para os pacientes e que possam vencer a resistência das células neoplásicas ao tratamento com múltiplas drogas.

1.3 Produtos naturais utilizados no tratamento do câncer

Fitoterapia (do grego *phyton* = vegetal e *therapeia* = tratamento) significa o uso de plantas para o tratamento de doenças. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (NASCIMENTO et al., 2000). A OMS (2003) afirma que plantas medicinais são todas aquelas silvestres ou cultivadas, utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar processos fisiológicos, patológicos ou não, ou ainda empregadas como fonte de fármacos ou de seus precursores/derivados.

A Medicina Tradicional Chinesa é conhecida desde 2.500 anos a.C, e utiliza, até os dias atuais, plantas medicinais para o tratamento de várias enfermidades que acometem os seres humanos, como o câncer. Os recursos terapêuticos disponíveis até o século XIX eram exclusivamente oriundos de plantas medicinais e extratos vegetais (preparação de consistência

líquida, sólida ou intermediária, obtida a partir de matéria-prima de origem vegetal). No século XX, inicia-se a tendência de se isolar os princípios ativos, que é substância ou classe química caracterizada, cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do medicamento (GRUENWALD, 1998; GROTHEY, 1998; CHENG; LEUNG; LEUNG, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2003), as plantas medicinais são as melhores fontes para se obter uma variedade de drogas para manutenção da saúde humana, e cerca de 80% da população mundial usa a medicina tradicional na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (NASCIMENTO et al., 2000; CAETANO et al., 2002).

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais. Para sobreviver e evoluir, os vegetais têm que competir por espaço e se defender do ataque de herbívoros e patógenos. Neste embate, as plantas foram desenvolvendo suas próprias defesas químicas. Esta é uma das razões pelas quais a constituição química das plantas é tão complexa. Metabólitos secundários de plantas são produzidos para modular seus próprios metabolismos e, conseqüentemente, também podem alcançar alvos terapêuticos de doenças humanas, como o câncer (FERREIRA; PINTO, 2010).

Cragg e Newman (2013), em um artigo de revisão sobre produtos naturais, mostram que houve um enorme avanço na realização de pesquisas com produtos naturais no campo da oncologia, notadamente com plantas, organismos marinhos (cuja investigação descreveu mais de 840 novas estruturas biologicamente ativas) e microrganismos, propiciando a descoberta de diversas substâncias químicas utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. Cerca de 62% dos fármacos anticâncer introduzida na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais. Nesse contexto, o conhecimento empírico tem grande relevância na descoberta de novas plantas medicinais, fornecedoras de substâncias químicas bioativas oriundas principalmente do metabolismo celular secundário do vegetal. O estudo desses mecanismos e o isolamento dos princípios ativos das plantas é uma das prioridades da farmacologia.

Diversos metabólitos vegetais são utilizados na quimioterapia antineoplásica, com destaque para os derivados e os correspondentes produtos naturais bioproduzidos pelas espécies *Catharanthus roseus* ou *Vinca rósea* (Apocynaceae), *Camptotheca acuminate* (Nyssaceae), *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi* (Berberidaceae). Estas substâncias naturais, incluindo os alcaloides camptotecina, vincristina e vimblastina e seus derivados sintéticos, atuam em diferentes tipos de câncer, revelando espectro de atividade e toxicidade diferentes,

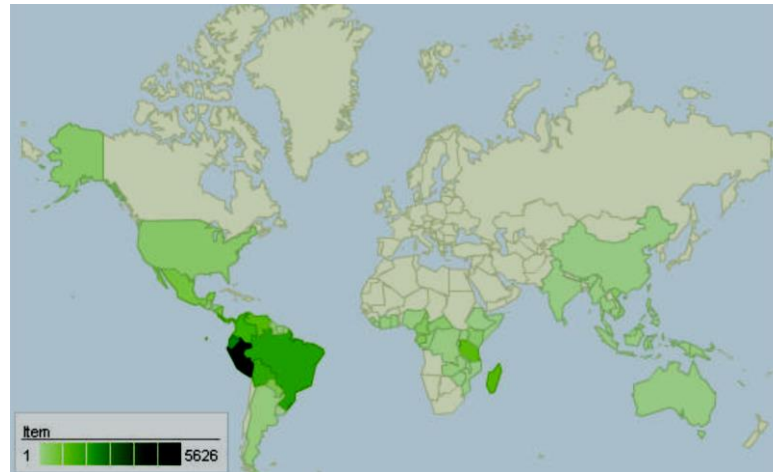
ampliando a utilidade medicinal em benefício da saúde. O reixo-do-pacífico (*Taxus brevifolia*), do qual é extraído o paclitaxel, apresenta atividade anticancerígena em tumores de ovário, seios e pulmão, assim como a substância lasiodiplodina, com ação antileucêmica, que pode ser encontrado em *Euphorbia splendens* (Euphorbiaceae) e em *Annona dioica*, (Annonaceae) (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Muitas outras espécies, por meio de testes pré-clínicos, foram estudadas demonstrando atividade antineoplásica, onde podemos destacar *Struthantus* sp (Loranthaceae), *Hymathanthus sucuuba* (Apocinaceae), *Apidosperma porvifolium* (Apocinaceae), *Physalis angulata* L. (Solanaceae) e *Annona muricata* L. (Annonaceae) cujos extratos e frações são promissoras para o isolamento de substâncias antineoplásicas, demonstrando que em testes *in vitro*, inibem o crescimento de várias células tumorais (LORENZI & MATOS, 2002; HSIEH et al., 2006, ARAÚJO et al., 2007).

1.4 Família Annonaceae

A família Annonaceae corresponde a uma das principais angiospermas, e a maior família da ordem Magnoliales (APG III, 2009), com cerca de 2.500 espécies e 135 gêneros com distribuição marcadamente tropical e subtropical (CHATROU et al., 2004); geralmente estão distribuídas entre as áreas tropicais da América, África e Ásia, conforme Figura 4. No Brasil, está representada por 26 gêneros, dos quais sete são endêmicos, abrangendo cerca de 260 espécies (ERKENS et al., 2006). Três gêneros, *Annona*, *Rollinia* e *Duguetia*, produzem frutos comestíveis, sendo o gênero *Annona* o de maior importância econômica, onde podemos encontrar diversas espécies, como *Annona muricata* e *Annona squamosa*, *Annona cherimola*, *Annona dioica* (MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006; MANICA, 1997).

Figura 4. Mapa de distribuição da família Annonaceae no mundo.



Fonte: Missouri Botanical Garden, 2010.

A família é constituída por árvores, arbustos, que se caracterizam por apresentar flores vistosas, andróginas, solitárias, ou em inflorescências; cálice de três sépalas, corola de seis pétalas, estames numerosos e livres e distribuídos espiraladamente em torno do receptáculo floral; a polinização é realizada predominantemente por coleópteros; fruto sincárpico ou apocárpico, muricado ou não; sementes com endosperma ruminado (PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004, SOUZA; LORENZI, 2005). Flores de tamanhos variados, com cores que vão do esbranquiçado até cor-de-vinho; a dispersão das sementes ocorre principalmente por meio de animais, como pássaros, peixes e répteis (RINALDI, 2007).

1.4.1 Gênero *Annona*

O gênero *Annona*, que possui mais de 120 espécies catalogadas (JOLY, 1998), tem sido muito pesquisado devido ao isolamento e caracterização de diversas classes de substâncias químicas com atividades farmacológicas, principalmente as acetogeninas, também conhecidas como policetídeos, uma classe de substâncias de potente ação anti-neoplásica, citotóxica, pesticida, vermicida, antimicrobiana, imunossupressora, antimalárica, abortiva (YUAN et al., 2003; LEBOEUF et al., 1982). Além das acetogeninas, as plantas deste gênero são ricas em alcalóides isoquinolínicos, como cherianoine, o salsolinol e glaucina isolados de *A. cherimola*, *A. reticulata* e *A. hypoglauca*, respectivamente. Esses alcalóides têm atividades antibacteriana, ansiolítica, antifúngica e são tóxicos para diversas linhagens celulares como linhagem de câncer de pulmão, cólon e leucemia (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1988; CHEN et al., 2001; RINALDI, 2007).

No gênero *Annona*, as principais espécies cultivadas nas regiões tropicais são: a *Annona squamosa* L., conhecida no Brasil como fruta-do-conde, ata ou pinha, *Annona muricata* L., popularmente chamada de graviola e a *Annona reticulata* L., denominada de fruta-da-condessa, todas exóticas (MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006). Essas espécies de interesse comercial são consideradas importantes, principalmente, devido às propriedades nutricionais dos frutos, que são usados *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (LORENZI; MATOS, 2002).

1.4.2 *Annona muricata* L.

A espécie *A. muricata*, cujo nome popular no Brasil é Gravioleira, tem hábito de crescimento ereto, pode alcançar 4 a 8 m de altura quando adulta, possui abundante sistema radicular, caule único com ramificação assimétrica (Figura 5A). As folhas possuem pecíolo curto, são do tipo oblongo-lanceoladas ou elípticas (Figura 5B) (SANTOS, 2010; ANTOUN; GERENA; MILHOUS, 1993). A inflorescência é cauliflora. Os pedúnculos são robustos e as flores são axilares, solitárias, subglobosas, amareladas, com seis pétalas grossas e carnosas, côncavas (Figura 5C). O fruto é uma baga de forma irregular, com epiderme verde-escura, espessa e areolada (Figura 5D). As sementes são castanhas ou pretas (SULIKERI; NALAWADI; SING, 1975).

Figura 5. Fotos de *Annona muricata*.



Planta inteira (A), folhas (B), flor (C) e fruto (D).

Fontes: (A) www.rarexoticseeds.com, (B) www.ocruzetense.com, (C) www.flickr.com e (D) www.cantinhodacher.blogspot.com.br. Acesso em 03/11/2013.

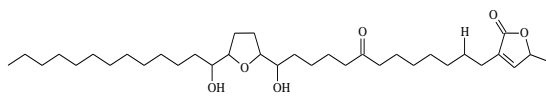
A. muricata apresenta uma ampla distribuição, principalmente em regiões tropicais, sendo a Venezuela e o Brasil os maiores produtores desta espécie. No Brasil, a região Nordeste é a maior produtora devido às condições climáticas (SOUZA, 2006). Praticamente todas as partes da planta são utilizadas para o tratamento de vários tipos de doenças, em diversas partes do mundo, principalmente em países tropicais. No Brasil, a espécie é amplamente utilizada como analgésico, anti-helmíntico, antiespasmódico, adstringente, broncodilatador, calmante, antitussígeno, hipoglicemiante, antidiarreico, anti-inflamatório, emético, antitérmico, hepatoprotetor, antinevrálgico, antiparasitário e antirreumático (LORENZI; MATOS, 2002; MORSA et al., 2000).

1.4.3 Acetogeninas

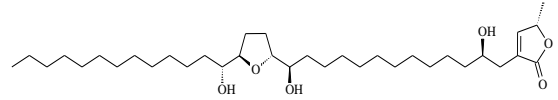
O metabolismo secundário da graviola produz uma classe de fitoquímicos bioativos, conhecidos como acetogeninas que estão presentes nas folhas, casca do caule, frutos e sementes (ZENG et al., 1996). Acetogeninas são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa, sendo caracterizadas por possuírem uma cadeia alifática longa, geralmente C-35 ou C-37, com a presença de hidroxilas, carbonila, acetila e um anel γ -lactona terminal, que são extremamente importantes para a eficácia dessas moléculas (Figura 6). São originadas pela condensação de unidades do acetilCoA através da rota biossintética do acilpolimalonato (SIMÕES et al., 2010).

Em 1982 foi publicado o isolamento da primeira acetogenina, a uvaricina, obtida da espécie *Uvária acuminata* (JOLAD et al., 1982). Desde então, o interesse por essa classe de substâncias vem crescendo em virtude das propriedades biológicas descritas (TORRES et al., 2012).

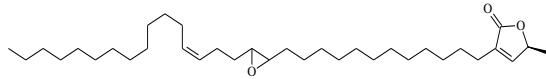
Figura 6. Estruturas químicas de acetogeninas citotóxicas isoladas de *Annona muricata* L.



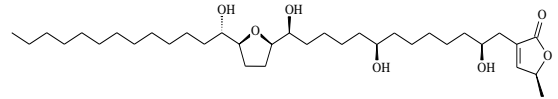
Corossolona, sementes
(VILA-NOVA et al., 2011)



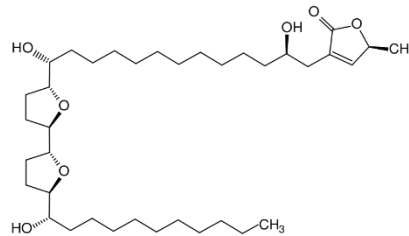
Murisolina, sementes
(LI et al., 2008)



Epoximurina A, fruta
(MELOT et al., 2009)



Annonacina, folhas
(LUNA et al., 2006)



Bulatacina, folhas
(CHIH et al., 2001)

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

Diversas atividades biológicas foram descritas na literatura para essa classe de metabólitos secundários, onde podemos citar propriedades leishmanicida, tripanocida, larvicida (VILA-NOVA et al., 2011; SANTOS; PIMENTA; BOAVENTURA, 2007), imunossupressora e citotóxica, sendo esta última relatada para diversas linhagens de células tumorais como leucemia prémielocítica (HL-60), células tumorais de pulmão (A-549), adenocarcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231), câncer cervical (HeLa) e de estômago (NUGC-3) (MATSUI et al., 2010; BARRACHINA et al., 2007); além de células cancerígenas de cólon (HCT-116, HCT-8 e HT-29) ovário (SKOV-3) e melanoma (SK-MEL-28) (LIAW et al., 2002; PEYRAT et al., 1997).

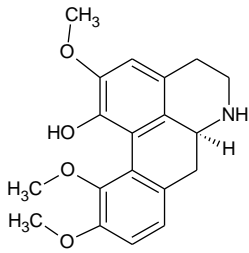
O mecanismo de ação da atividade citotóxica das acetogeninas está relacionado com a inibição da NADH oxidase da membrana plasmática da célula tumoral e da membrana interna mitocondrial. Esse mecanismo ocorre através da inibição do complexo I (NADH: ubiquinona oxidoredutase) no sistema de transporte eletrônico mitocondrial, inibindo a fosforilação oxidativa, resultando na diminuição dos níveis de ATP celular e inibindo a proliferação das células tumorais. (TORMO et al., 2003).

1.4.4 Alcaloides

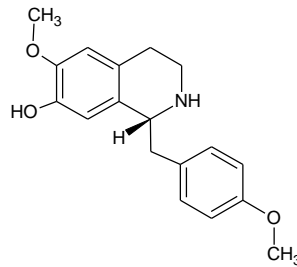
Alcaloides são substâncias orgânicas, de origem natural, cíclicas, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos (SIMÕES et al., 2010). Leboeuf et al. (1982) publicaram uma revisão sobre a fitoquímica da família Annonaceae, onde é relatada a predominância de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos dentre os metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes à família.

Vários alcaloides foram identificados em *Annona muricata* L., entre os quais podemos citar: (S)-norcoridina, (R)-4'-O-metilcoclorina, (R)-O, O-dimetilcoclorina, annonamina, (R)-anonaina, N-metilcoclorina, asimilobina, anonaína, conforme mostrado na figura 7 (MATSUSHIGE et al., 2012; KOTAKE et al., 2004; HARAST et al., 1997). Os alcaloides extraídos do gênero *Annona* possuem diversas atividades biológicas descritas, onde se pode enfatizar o efeito citotóxico observado para HeLa (câncer cervical), NCIH-460 (câncer de pulmão), RPMI-8226 (leucemia) e PC-3 (câncer de próstata). Hoet e colaboradores (2004) mostraram que a atividade citotóxica está relacionada à capacidade dos alcalóides se ligarem à dupla fita do DNA e as enzimas topoisomerasas I e II, que resulta em quebra do DNA bifilamentar (RINALDI, 2007; HOET et al., 2004).

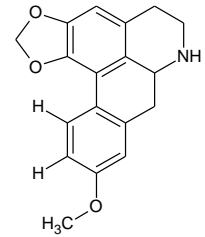
Figura 7. Alcaloides isoquinolínicos citotóxicos isolados de *Annona muricata* L.



(S)-Norcorridina, folhas
MATSUSHIGE et al., 2012



(R)-4'-O-Metilcoclaurina, folhas
MATSUSHIGE et al., 2012



Xilopina, folhas
FOFANA et al., 2011

Com a rica biodiversidade do Brasil, diversos recursos naturais encontram-se disponíveis para a prospecção de moléculas com atividade biológica. Muitos desses produtos naturais vêm sendo alvo de estudo para o tratamento de diversas doenças, como o câncer. As plantas têm uma longa história de uso no tratamento do câncer, no entanto, poucas espécies foram analisadas no intuito de detectar o potencial antitumoral até hoje (HARTWELL, 1982). Uma grande quantidade de moléculas com atividade antitumoral derivadas de produtos naturais como organismos marinhos, microorganismos e de plantas ainda podem ser descobertos.

Desde 1989, o Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (labNOE) vem realizando vários estudos a fim de comprovar o potencial antitumoral de substâncias extraídas de produtos naturais (FÁVARO et al., 1990; MORAES; FONTELES; MORAES, 1997; BOLZANI et al., 1999; LEYVA et al., 2000; VERAS et al., 2004; PESSOA et al., 2006; COSTA-LOTUFO et al., 2010; OLIVEIRA, 2012). Trabalhos preliminares realizados no LabNOE com o extrato das folhas e das sementes da espécie *Annona muricata* evidenciaram potente ação antitumoral. Logo, o estudo das propriedades antitumorais de substâncias isoladas da espécie é de fundamental importância. Dessa forma, o presente trabalho visa prosseguir os estudos através de prospecção e caracterização de substâncias citotóxicas das folhas de *A. muricata*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o fracionamento bioguiado do extrato de *A. muricata* para prospecção de moléculas com potencial citotóxico em linhagens celulares tumorais humanas.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o fracionamento do extrato acetônico das folhas de *A. muricata* guiado pela atividade citotóxica;
- Avaliar o potencial citotóxico de compostos isolados em cultura de células tumorais e não tumorais;
- Avaliar se o efeito citotóxico dos compostos extraídos de *A. muricata* é dose e/ou tempo dependente em cultura de células cancerígenas;
- Estudar o possível mecanismo de ação responsável pelo efeito citotóxico das substâncias de *A. muricata* em cultura de células cancerígenas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

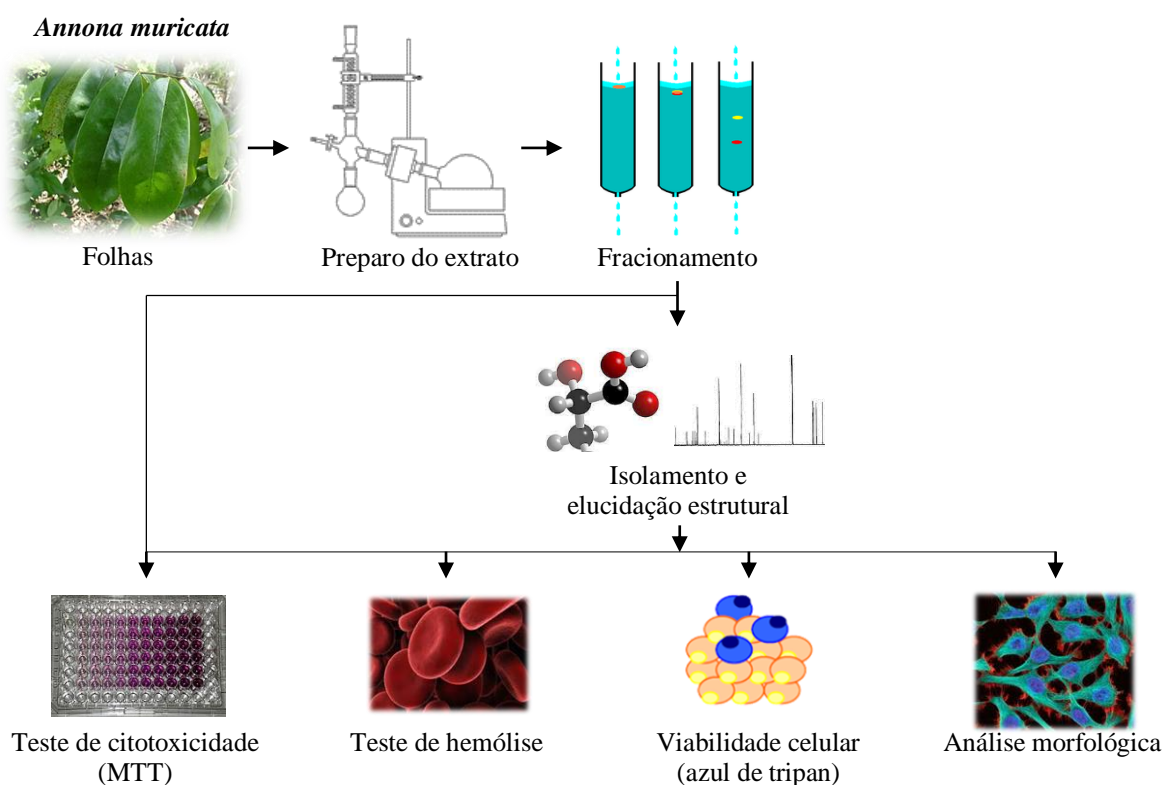
3.1 Materiais utilizados

A especificação dos equipamentos, dos softwares de aquisição e análise de dados, bem como a descrição do fabricante dos reagentes utilizados está detalhada junto à descrição dos métodos ou no Apêndice A.

3.2 Desenho experimental

A figura 08 apresenta o desenho experimental adotado no presente trabalho, com as metodologias envolvidas para isolamento dos compostos e avaliação de suas propriedades citotóxicas.

Figura 8. Desenho experimental do trabalho, com as etapas e metodologias adotadas.



3.3 Coleta e identificação do material

As folhas de *Annona muricata* L. foram coletadas no município de Trairi – Ceará (S 3°22'15,98"; W 39°17'34,46") em abril de 2011. O material botânico foi identificado no herbário Prisco Bezerra, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, local onde se encontra depositado uma exsicata da espécie com registro EAC 49002.

3.4 Obtenção do extrato bruto

Foram coletados 3 kg de folhas de *A. muricata*, que foram limpas e postas para secagem ao sol; em seguida, o material foi triturado e submetido à extração exaustiva a frio por percolação com 10 litros de acetona (grau CLAE) durante 72 horas. Posteriormente, a solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C, obtendo-se 280 g de extrato acetônico bruto, denominado AMFA.

O Extrato foi submetido, após destilação do solvente, à cromatografia líquida de alta eficiência e ao fracionamento químico.

3.5 Métodos cromatográficos

O fracionamento químico do extrato acetônico de *A. muricata* foi realizado no laboratório de cromatografia da Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC, do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob supervisão do Dr. Cláudio Costa dos Santos. Nos processos cromatográficos foram utilizados os solventes orgânicos hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol (todos com grau CLAE), puros ou em misturas binárias obedecendo sempre uma ordem crescente de polaridade.

Para a realização do fracionamento químico do extrato orgânico bruto empregou-se a técnica de adsorção em coluna aberta, utilizando como fase estacionária géis de sílica comum (0,2 – 0,5 mm) da marca Vetec. Para a cromatografia flash, utilizou-se como fase estacionária géis de sílica com granulometria de 0,04 – 0,063 mm.

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatoplasmas revestidas de géis de sílica (Macherey-Nagel) e com suporte de alumínio, 20 x 20 cm e espessura de 0,20 mm, contendo indicador de fluorescência F254. A revelação das substâncias analisadas nas cromatoplasmas foi obtida através da exposição destas à radiação ultravioleta (UV)

nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm pela utilização de câmera de luz ultravioleta (Biothec) e/ou pela pulverização da cromatoplaça com solução de vanilina e ácido perclórico a 0,75 M em etanol, seguido de aquecimento em estufa à temperatura de 100 °C por aproximadamente 5 minutos.

As cromatografias de exclusão molecular foram realizadas em colunas de diferentes tamanhos e diâmetros, de acordo com as alíquotas de amostras e as quantidades de gel dextrana Sephadex LH-20 (GE Healthcare) utilizadas. O eluente utilizado foi o metanol.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em aparelho Shimadzu, Japão. As separações foram efetuadas em sistema analítico com coluna C18, 150 × 2,0 nm. Os solventes empregados foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm.

3.6 Fracionamento guiado pela citotoxicidade do extrato acetônico de *A. muricata*.

O fracionamento fitoquímico das frações obtidas do extrato orgânico bruto foi bioguiado pela verificação da atividade citotóxica (por meio do método do MTT) em cultura das células tumorais HCT-116 (carcinoma de cólon), HL-60 (leucemia promielocítica), SF-295 (glioblastoma) e OVCAR-8 (carcinoma de mama) obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD). As frações foram testadas em concentração única de 25 µg/ml ou em concentrações seriadas que variaram de 0,04 a 25 µg/mL. Todas as amostras resultantes do fracionamento químico foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) para as análises biológicas das mesmas.

As frações selecionadas tanto para a determinação das respectivas concentrações de inibição média do crescimento celular (CI₅₀) como para continuarem nas etapas subsequentes do estudo fitoquímico, apresentaram atividade antiproliferativa variando de 75 a 100% frente a todas as linhagens tumorais testadas.

De acordo com o potencial antiproliferativo, as frações foram selecionadas para prosseguir o fracionamento bioguiado. Paralelamente, também foi realizado o teste de hemólise para avaliar o potencial do extrato e das frações em causar danos de forma direta na membrana plasmática de eritrócitos (WILKE, 2009).

A fração enriquecida com a anonacina teve sua concentração inibitória média (CI₅₀) determinada frente a 7 linhagens tumorais de origem humana, que foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-EUA) e 1 cultura primária não-tumoral, as células CMSP (células mononucleares do sangue periférico) como modelo para verificar a

citotoxicidade da substância frente a células do sistema imunológico humano, que são células não-mutantes e com taxa de divisão menor quando comparadas às células tumorais (Tabela 1).

3.6.1 Elucidação estrutural da acetogenina presente na fração AMFA 4

O tratamento cromatográfico do extrato acetônico de *A. muricata* L. forneceu uma substância com aparência de sólido branco. O composto denominado de anonacina, possui solubilidade em clorofórmio e acetona.

A determinação estrutural foi realizada pelo Dr. Cláudio Costa dos Santos juntamente com os profs. Drs. Otilia D. Loiola Pessoa, Edilberto Rocha Silveira do Laboratório de fitoquímica de plantas medicinais I do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará e da prof.^a Dra. Selene Maia de Moraes, da Universidade Estadual do Ceará. Para a determinação estrutural foi utilizada Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C usando clorofórmio deuterado como solvente. Os espectros de massa foram obtidos em Espectrômetro de massa de alta resolução (UltrOTOFF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, MA). Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrômetro da Perkin-Elmer, Spectrum 100 FTIR, equipado com acessório UATR.

3.7 Manutenção das linhagens tumorais

As linhagens foram cultivadas em garrafas para cultura de células (25 cm³, volume de 50 ml ou 75 cm³, volume de 250 mL). O meio utilizado foi o RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio de cultura era trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária. Para as linhagens aderidas utilizava-se tripsina + EDTA (0,25%) para que as células se desprendessem do plástico da garrafa.

Tabela 1. Linhagens tumorais usadas nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade.

Linhagem	Tipo histológico da linhagem (Origem)	Concentração de plaqueamento (Células/mL)
HCT-116	Carcinoma colorretal	7×10^4
HL-60	Leucemia prómielocítica	3×10^5
K-562	Leucemia mielóide	3×10^5
OVCAR-8	Carcinoma ovariano	1×10^5
PC-3	Adenocarcinoma de próstata	1×10^5
PC-3M	Adenocarcinoma de próstata metastático	1×10^5
SF-295	Glioblastoma	1×10^5
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico	1×10^6

3.7.1 Teste de citotoxicidade *in vitro* – Ensaio do MTT

A avaliação do efeito citotóxico das frações obtidas foi realizada pelo método colorimétrico do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio – MTT após 72 horas de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* usado para estimar a proliferação e sobrevivência celular. Baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio, que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Neste trabalho, o ensaio do MTT foi utilizado para biomonitorar o efeito citotóxico das frações obtidas com o objetivo de selecioná-las para prosseguimento do fracionamento (BERRIDGE; TAN, 1993; MOSMANN et al., 1983).

Procedimento experimental

As células em suspensão ou em monocamadas foram plaqueadas em placas de microdiluição de 96 poços. A densidade das linhagens no plaqueamento encontra-se descrito na tabela 1. Após 24 horas de incubação, 100 μ L das substâncias testes foram incubadas com a suspensão de células. Após 69 horas de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 minutos) e o sobrenadante, descartado. Cada poço, recebeu 150 μ L da solução de MTT a 0,5

mg/mL, tendo sido incubadas por 3 horas, em estufa incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas à 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspensionado em 150 µL de DMSO. Para quantificação do formazan obtido pela redução do MTT nas células viáveis, as absorbâncias foram lidas com auxílio de espectrofotômetro de placa empregando o software Multimode Detection, onde o comprimento de onda foi ajustado para 595 nm (MOSMANN et al., 1983). A doxorubicina e/ou rotenona foram utilizadas como controle positivo dos experimentos.

Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O valor das absorbâncias encontrado para as frações analisadas em dose única de 25 µg/mL foi transformado em porcentagem de inibição, relativo ao controle negativo. Para as frações testadas em diluição seriada, foi determinado a concentração inibitória média (CI₅₀) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) obtidos a partir de regressão não-linear usando o programa GraphPad Prism (Versão 5.0).

3.7.2 Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleares do sangue humano periférico – Ensaio do alamar blue

O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN et al., 2000), é um indicador fluorescente e colorimétrico, com propriedades redox. Assim como os sais de tetrazólio, o alamar Blue será reduzido à resorufina em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). Este método foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED; GOGAL JR; WALSH, 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

Procedimento experimental

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir do sangue periférico de voluntários clinicamente saudáveis. A coleta de sangue foi realizada em frascos heparinizados (vacuntainer) por profissionais da Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) da Universidade Federal do Ceará. O isolamento foi feito através de um gradiente

de densidade utilizando Histopaque™-1077, em temperatura ambiente. Uma amostra de 3 ml de sangue periférico foi diluída em 5 ml de tampão PBS. Essa solução foi adicionada a um tubo Falcon contendo 2 mL de Histopaque™-1077 e, posteriormente, centrifugada por 30 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, a solução foi separada, em virtude da densidade do Histopaque™-1077, em três camadas visíveis. Uma superior (soro), uma intermediária (células e Histopaque™-1077) e uma inferior (hemácias). Em seguida, a região intermediária foi cuidadosamente removida e adicionada a um terceiro tubo contendo 10 mL de PBS, o qual foi centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspensionado em 2 mL de PBS. As células foram utilizadas imediatamente após o processo de isolamento, sendo cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e 2 a 4% do mitógeno para linfócitos, fitohemaglutinina.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades. Após 24 horas de incubação, as amostras dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço utilizando o HTS e incubadas por 72 horas. Rotenona (0,1 µM) foi utilizada como controle positivo. O controle negativo receberá a mesma quantidade de DMSO. Vinte e quatro horas antes do final do período de incubação, 10 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue foram adicionadas a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando um leitor de placa.

Análise dos dados

A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação = $ALW - (AHW \times R0) \times 100$, onde, ALW e AHW são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R0 será calculado utilizando a seguinte fórmula: $R0 = AOLW/AOHW$, onde, AOLW e AOHW são as absorbâncias do meio isolado subtraído das absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente.

3.7.3 Verificação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos swiss

Obtenção dos eritrócitos

Os eritrócitos utilizados foram obtidos do sangue de camundongos *Mus musculus* Swiss coletados com um capilar do plexo retro-orbital.

Princípio do teste

Este ensaio permite avaliar o potencial da substância teste em causar danos na membrana celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total através da quantificação espectrofotométrica da hemoglobina liberada em solução salina (JIMENEZ et al., 2004).

Procedimento experimental

O sangue coletado foi diluído em 150 mL de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução salina contendo cloreto de cálcio e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos para redução da contaminação plasmática. Após a terceira centrifugação, os eritrócitos foram ressuspensos em solução salina para obtenção de uma solução de eritrócitos a 2%. Os ensaios foram realizados em placas de microdiluição contendo 96 poços. Cada poço da primeira coluna recebeu 100 µL de solução salina. Os poços da segunda fileira receberam 80 µL de solução salina e 20 µL do veículo de diluição das amostras teste (DMSO 50%). Os poços da 12ª coluna receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 a 1% (controle positivo). Os poços da 11ª coluna receberam 190 µL de solução salina e 10 µL de amostra teste na concentração de 5 mg/mL. Os poços da 10ª coluna até a 3ª coluna receberam, cada um, 100 µL de solução salina.

As diluições foram feitas da 11ª até a 3ª coluna, retirando-se 100 µL da solução do poço anterior e transferindo para o poço seguinte, de modo que as concentrações eram diluídas pela metade, variando de 250 até 0,97 µg/mL. Em seguida, 100 µL da solução de eritrócitos a 2% foram adicionados em todos os poços. A placa foi incubada sob agitação constante a temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C), por 1 h. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outra placa para realização da leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 450 nm. A atividade hemolítica foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo.

Análise dos resultados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. As amostras foram testadas em diluição do tipo seriada. Foi plotado o gráfico absorbância x concentração e determinada a concentração efetiva média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CE_{50}) e seu respectivo intervalo de confiança ($IC_{95\%}$) para cada amostra a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism, versão 5.0.

3.7.4 Avaliação da atividade antiproliferativa em linhagem de câncer colorretal através do método de exclusão do corante azul de Trypan.

Princípio do teste

Este ensaio permite avaliar a cinética de crescimento das células de câncer colorretal HCT-116 tratadas com a anonacina e assim poder avaliar o efeito antiproliferativo desta substância após 48 e 72 h de incubação.

O corante azul de Trypan permite fazer a distinção entre as células viáveis e as não-viáveis, onde o corante penetra em todas as células, porém, somente as células viáveis conseguem bombear o corante para fora, fazendo com que as células mortas apresentem uma coloração azulada (STROBER, 2001).

Procedimento experimental

As células de câncer colorretal HCT-116 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 7×10^4 células/mL de meio de cultura RPMI 1640, e incubadas com a anonacina por 48 e 72 horas nas concentrações de 8, 80 e 800 nM. O controle negativo foi tratado apenas com DMSO e a rotenona, na concentração de 100 nM, foi utilizada como controle positivo do experimento.

Após o período de incubação, faz-se a transferência do meio de cultura para tubo plástico de 1,5 mL, lava os poços com tampão PBS e adiciona tripsina. Devolve o meio do tubo para os poços e homogeneiza bem, em seguida transfere todo o meio novamente para o tubo eppendorf. Posteriormente, centrifuga a 1500 rpm/5 minutos e descarta o sobrenadante. Ressuspende o *pellet* em 1 mL de tampão PBS e retira uma alíquota de 90 μ L da suspensão de células e adiciona a 10 μ L de azul de Trypan. Em seguida uma alíquota de 10 μ L será colocado em câmara de Neubauer e as células diferenciadas e contadas em viáveis e não-viáveis.

Análise dos dados

O valor obtido para cada contagem foi plotado em um gráfico e construído uma curva com as variáveis: porcentagem de células viáveis x log da concentração, para cada tempo analisado, para a observação da cinética de crescimento das células tratadas. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste Newman Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.7.5 Análise morfológica em células de câncer colorretal – Coloração diferencial com panótico rápido

Princípio do teste

As células são submetidas a ação de um fixador e duas soluções corantes, por meio de imersões de 5 segundos em cada, e ao final da última imersão encontram-se prontas para análise. A coloração pelo kit Panótico Rápido (Laborclin[®]) permite analisar as características morfológicas como alterações no citoplasma, no núcleo e na membrana celular, sendo útil para sugerir o mecanismo de ação da droga, seja por apoptose ou por necrose (GURR, 1971).

Procedimento experimental

As células de câncer colorretal HCT-116 foram plaqueadas em placas de 24 poços com lamínulas na concentração de $7,0 \times 10^4$ células/ml em meio de cultura RPMI 1640, e incubadas com a anonacina por 48 e 72 horas nas concentrações de 8, 80 e 800 nM. O controle negativo foi tratado apenas com DMSO e a rotenona, na concentração de 100 nM, foi utilizada como controle positivo do experimento.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi aspirado e as lamínulas foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1% por 5 segundos, onde, posteriormente foram imersas em solução a 0,1% de xatenos durante 5 segundos ou mais e imersas em solução a 0,1% de tiazinas também por 5 segundos (Laborclin[®]).

Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada corrente para remoção do excesso de corante. Após a lavagem, as lamínulas foram montadas em lâminas com bálsamo do Canadá e visualizadas em microscópio óptico.

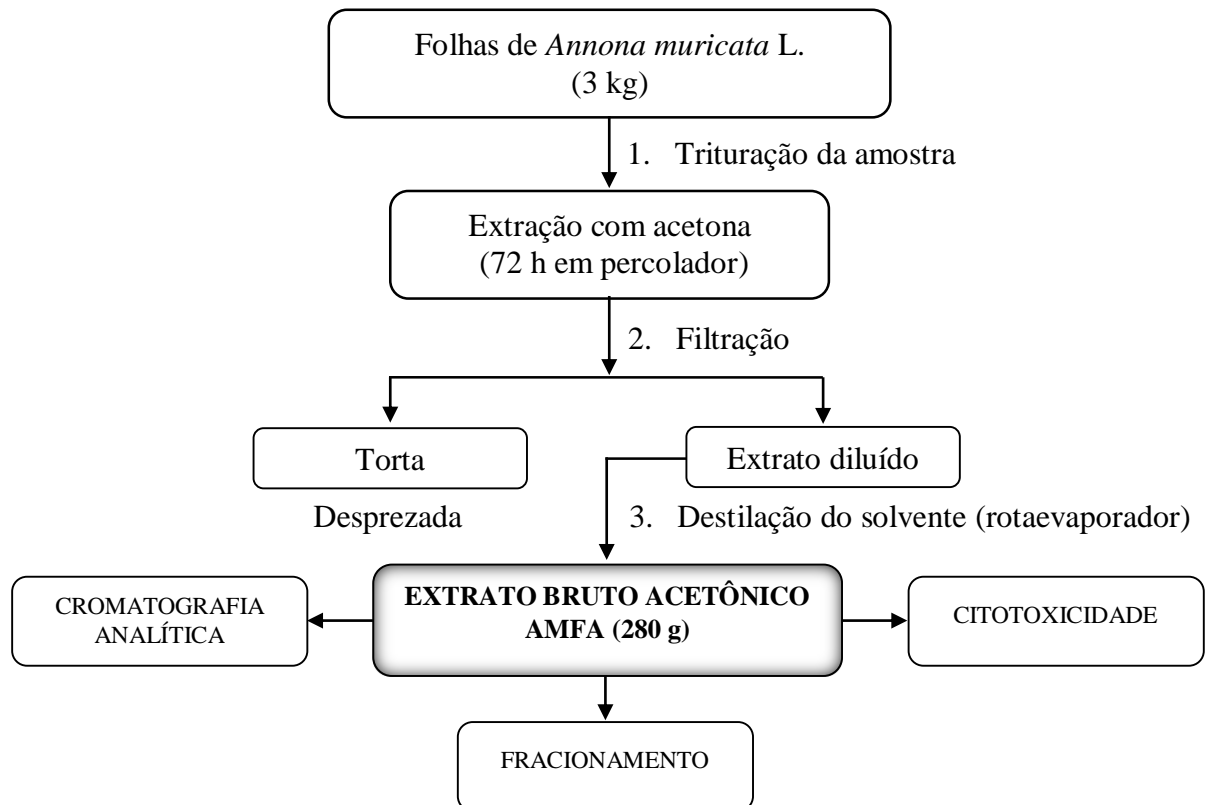
Análise dos dados

Os efeitos da acetogenina nas células HCT-116 foi investigado pela análise morfológica do citoplasma e do núcleo usando microscópio óptico com aumento de 400x (Olympus, Tokyo, Japan) comparando com o controle negativo e positivo.

4 RESULTADOS

A figura abaixo representa a preparação do extrato bruto acetônico das folhas de *Annona muricata* L. mostrando o que foi realizado após a obtenção do mesmo.

Figura 9. Preparação do extrato bruto acetônico das folhas de *Annona muricata* L.



4.1 Fracionamento bioguiado de AMFA

Para o fracionamento do extrato acetônico das folhas de *A. muricata* foram utilizadas 100 g do mesmo, equivalente a 35,71% do extrato total. Após, o extrato foi submetido a uma cromatografia filtrante em coluna aberta utilizando géis de sílica como fase estacionária e hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puros como fase móvel do ensaio cromatográfico seguindo ordem crescente de polaridade, obtendo-se quatro frações, hexano (23,65 g), clorofórmio (23,10 g), acetato de etila (32,93 g) e metanol (19,94 g), respectivamente.

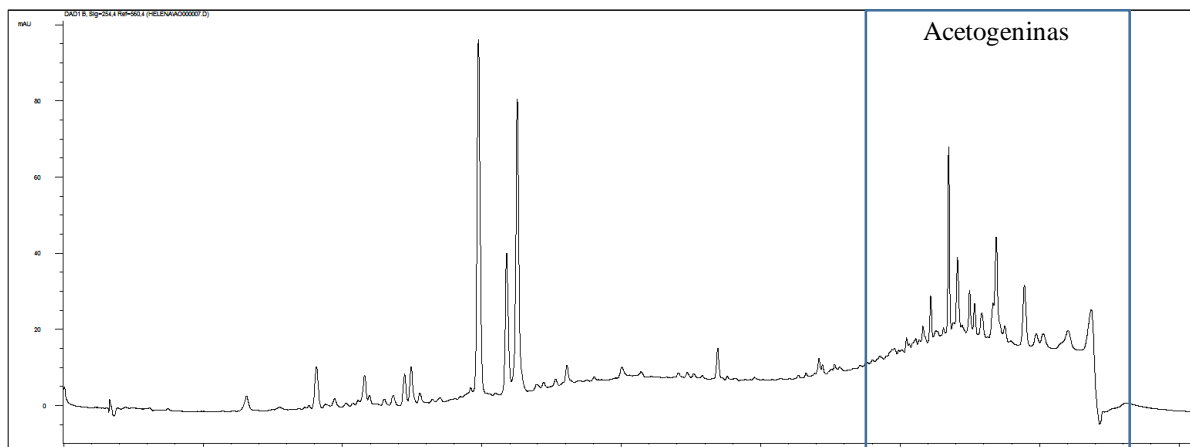
O fracionamento guiado pelo ensaio de citotoxicidade (MTT) do extrato acetônico das folhas de *A. muricata* L. encontra-se simplificado na figura 1. Abaixo, encontra-se descrito as

etapas principais do fracionamento, que resultou no isolamento de uma acetogenina denominada de anonacina.

A escolha da fração a ser cromatografada no passo seguinte do fracionamento foi obtido com base no perfil fitoquímico das frações analisadas por CCDA, na citotoxicidade e na capacidade de causar hemólise. Para a atividade citotóxica, amostras que causaram inibição >75% do crescimento das células tumorais foram selecionadas para prosseguir o fracionamento.

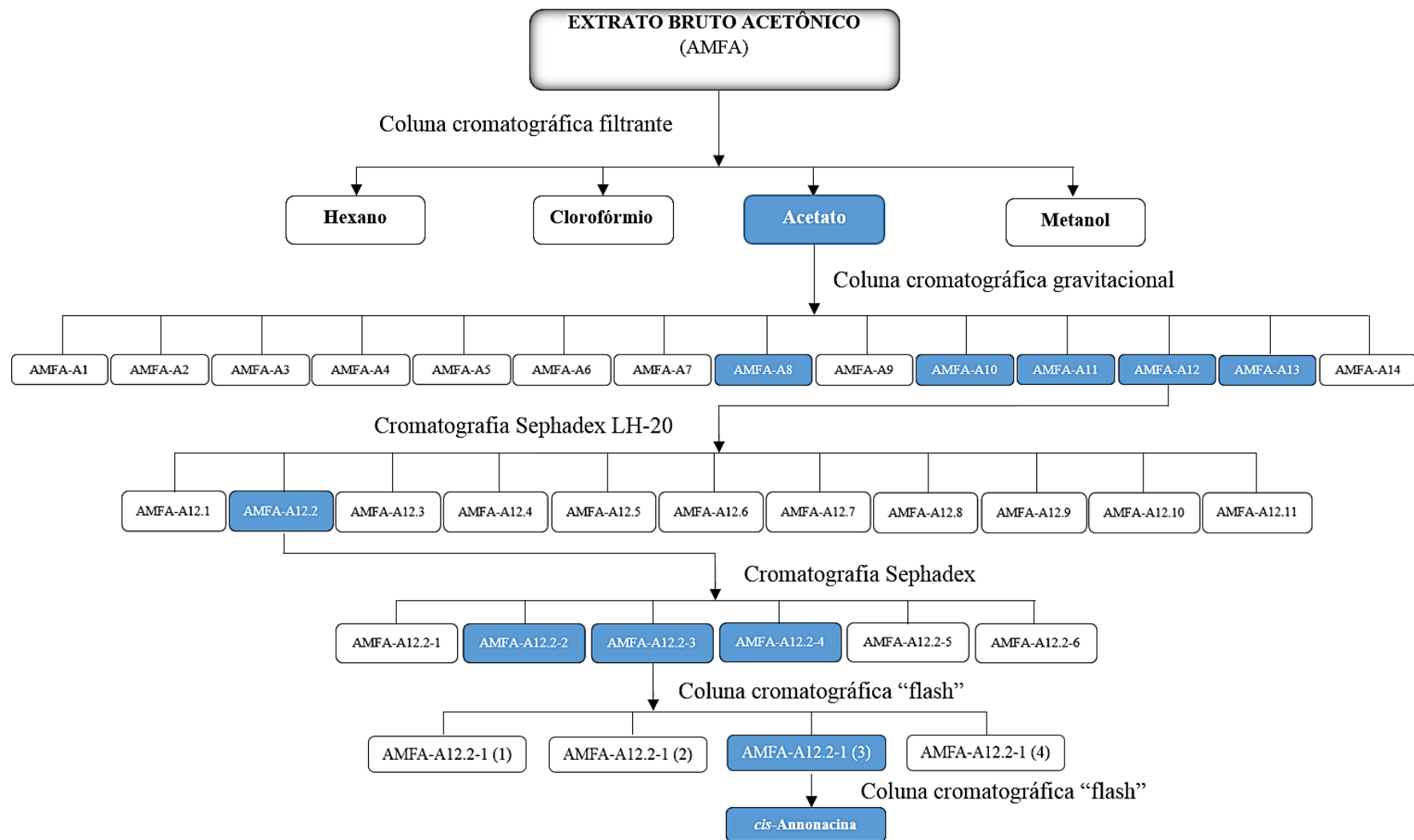
O extrato acetônico bruto obtido das folhas de *A. muricata* foi submetido à uma cromatografia líquida de alta eficiência para análise do perfil químico do mesmo, conforme Figura 10. O cromatograma evidencia dois campos distintos com picos definidos e que, devido as condições de análise da amostra, foi possível inferir a presença de acetogeninas no extrato no final da corrida cromatográfica.

Figura 10. Cromatograma analítico do extrato acetônico de *A. muricata*.



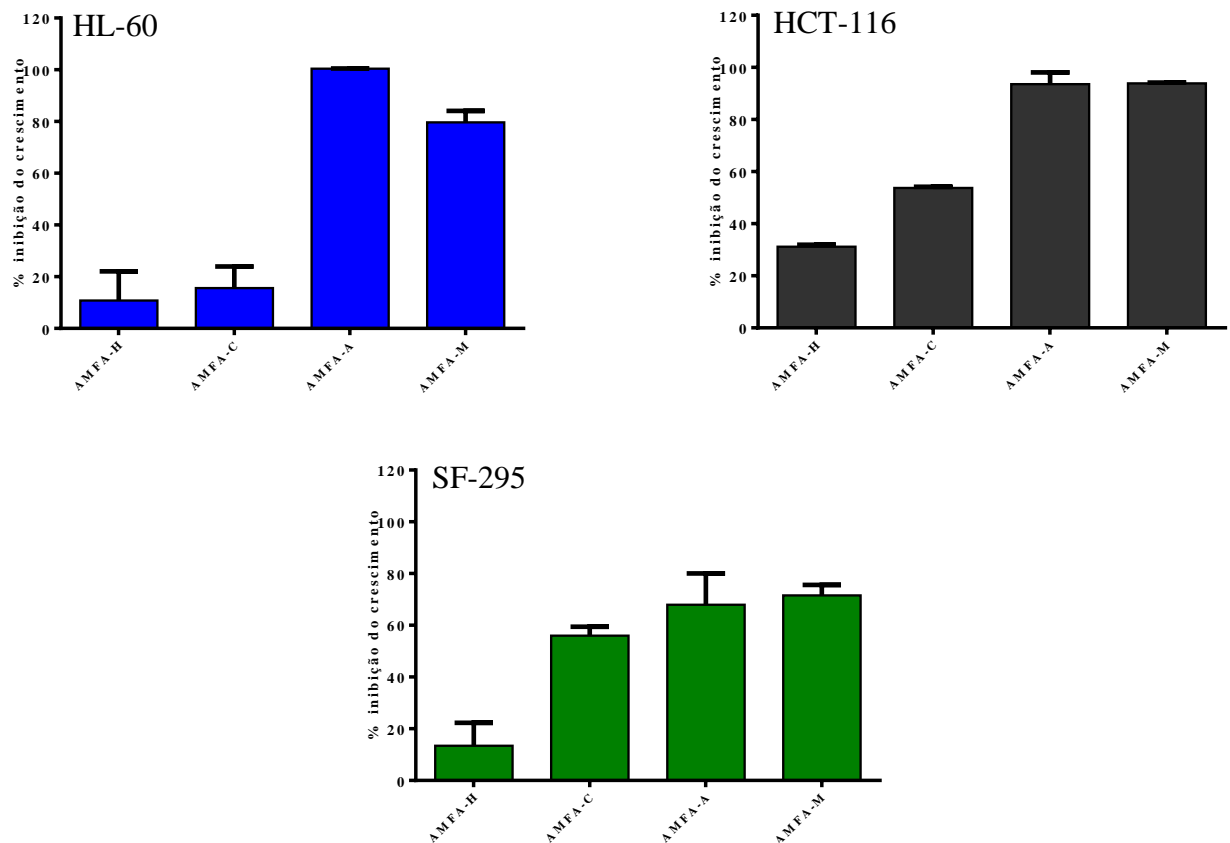
Condições de análise: coluna 250 x 4.6 mm, 5 μ m, fase móvel: MeOH + H₂O (Acido fórmico 0,1%) com gradiente de 5% de MeOH > 100% MeOH em 60 min. Vazão de 2ml/min e detecção em 254 nm.

Figura 11. Etapas do fracionamento bioguiado pelo ensaio de citotoxicidade (MTT) do extrato acetônico de *A. muricata*. As frações em destaque apresentaram maior atividade antiproliferativa.



O extrato acetônico bruto, denominado AMFA, com citotoxicidade previamente estabelecida, foi submetido a uma coluna cromatográfica filtrante que resultou em quatro frações com polaridades distintas: fração hexânica (AMFA-H), fração clorofórmio (AMFA-C), fração acetato de etila (AMFA-A) e fração metanólica (AMFA-M). A figura 12 mostra os resultados do ensaio de citotoxicidade destas frações. As frações supracitadas também foram submetidas ao teste de atividade hemolítica.

Figura 12. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* em dose única de 25 µg/mL das frações oriundas do extrato acetônico de *A. muricata* através do método do MTT após 72 horas de incubação em 3 linhagens de células tumorais.



Observa-se que as frações AMFA-A e AMFA-M mostraram-se mais efetivas na atividade antiproliferativa frente às linhagens tumorais em relação às frações AMFA-H e AMFA-C, que apresentaram pouca atividade citotóxica. Na análise da atividade hemolítica, nenhuma das frações supracitadas apresentaram capacidade de hemolisar eritrócitos coletados de camundongos *Mus musculus* nas concentrações testadas.

As frações acetato de etila e metanólica foram escolhidas para a determinação da CI_{50} com o objetivo de continuar o fracionamento bioguiado, conforme tabela 2.

Tabela 2. Concentração inibitória média (CI_{50}) e avaliação do potencial hemolítico *in vitro* das frações AMFA-A e AMFA-M através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 4 linhagens de células tumorais.

FRAÇÕES	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				HEMÓLISE 1 h
	SF-295	HL-60	HCT-116	OVCAR-8	
AMFA-A	1,61 (1,46 – 1,78)	< 25	1,3 (0,85 – 2,00)	0,60 (0,54 – 0,66)	> 250 $\mu\text{g/ml}$
AMFA-M	4,57 (4,01 – 5,22)	< 25	6,8 (5,50 – 8,40)	3,32 (2,90 – 3,79)	> 250 $\mu\text{g/ml}$
DOXORRUBICINA	0,24 (0,2 – 0,27)	0,02 (0,01 – 0,02)	0,12 (0,09 – 0,17)	0,26 (0,17 – 0,30)	NT

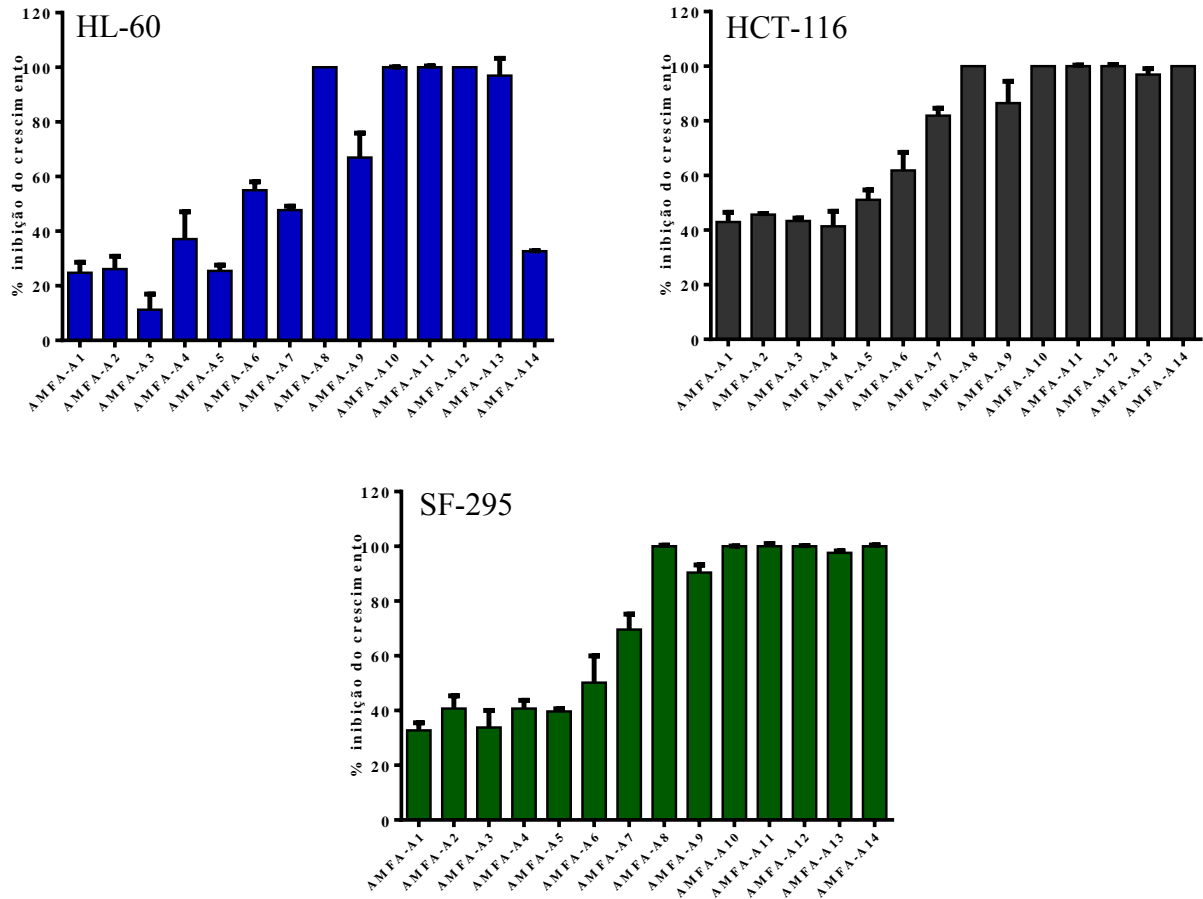
NT: Não testado.

Analisando a tabela 2, observa-se que a fração acetato de etila (AMFA-A) apresentou melhor efeito antiproliferativo, com CI_{50} menor quando comparado com a fração metanólica frente a todas as linhagens tumorais testadas. Esta amostra apresentou também maior quantidade de massa (32,93 g) e em virtude desses fatores, foi escolhida para dar continuidade ao fracionamento fitoquímico.

4.2 Fracionamento bioguiado da fração acetato de etila

A fração AMFA-A, foi fracionada em coluna empacotada com sílica gel e eluída com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, seguindo a ordem crescente de polaridade. As 65 frações obtidas foram analisadas e comparadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e reunidas em 14 sub-frações denominadas de **AMFA-A1** à **AMFA-A14**. Após a reunião das frações, as mesmas foram submetidas ao ensaio do MTT em concentração única de 25 $\mu\text{g/mL}$, conforme figura 13.

Figura 13. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* em dose única de 25 µg/mL das frações oriundas da partição de AMFA-A através do método do MTT após 72 horas de incubação em 3 linhagens de células tumorais.



As frações AMFA-A8, A10, A11, A12, A13 apresentaram percentual de inibição superior a 80% frente a todas as linhagens tumorais testadas, sendo, portanto, submetidas novamente ao ensaio do MTT (utilizando diluições seriadas) para a determinação da CI_{50} , conforme tabela 3.

Tabela 3. Concentração inibitória média (CI₅₀) das frações AMFA-A através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 4 linhagens de células tumorais.

FRAÇÕES	CI ₅₀ (µg/mL)			
	Intervalo de confiança de 95%			
	SF-295	HL-60	HCT-116	OVCAR-8
AMFA-A8	1,36 (0,69 – 2,68)	1,15 (0,717 – 1,867)	0,31 (0,056 – 1,728)	4,27 (2,50 – 7,30)
AMFA-A10	1,59 (0,99 – 2,57)	0,58 (0,366 – 0,921)	0,51 (0,224 – 1,160)	0,40 (0,141 – 1,173)
AMFA-A11	1,24 (0,82 – 1,88)	0,56 (0,285 – 1,113)	0,92 (0,452 – 1,879)	0,63 (0,191 – 2,121)
AMFA-A12	0,80 (0,44 – 1,82)	0,72 (0,421 – 1,251)	0,99 (0,433 – 2,299)	1,99 (1,39 – 2,86)
AMFA-A13	< 25	3,89 (2,48 – 6,10)	0,42 (0,16 – 1,10)	< 25
Doxorrubicina	0,24 (0,2 – 0,27)	0,02 (0,01 – 0,02)	0,12 (0,09 – 0,17)	0,26 (0,17 – 0,30)

Analisando a tabela acima, observa-se que as frações não apresentaram diferenças significativas entre as CI₅₀. Dessa forma, optou-se por escolher a fração com maior quantidade de massa para dar prosseguimento ao fracionamento químico.

A fração AMFA-A12, com massa de 7,26 g, foi solubilizada em metanol P.A. e submetida à cromatografia por exclusão molecular em Sephadex LH-20, utilizando metanol de forma isocrática. Foram obtidas 38 frações, que após análise por CCDA, foram reunidas em 11 frações, sendo posteriormente submetidas ao ensaio do MTT em concentração única de 25 µg/ml, onde apenas a amostra denominada de A12.2 apresentou potencial citotóxico acima de 80%.

Com base nisso e com o intuito de verificar a dose eficaz que causaria 50% do efeito máximo, determinou-se os valores de CI₅₀. A tabela 4 mostra que a fração conservou sua atividade antiproliferativa, apresentando excelente eficácia quando comparado ao controle positivo, doxorrubicina.

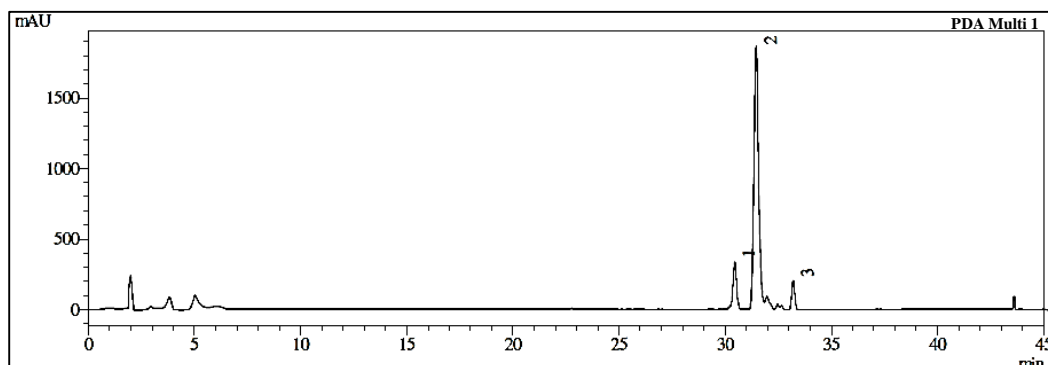
Tabela 4. Concentração inibitória média (CI₅₀) da fração A12.2 através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 4 linhagens de células tumorais.

FRAÇÕES	CI ₅₀ (µg/mL)			
	Intervalo de confiança de 95%			
	HCT-116	HL-60	SF-295	OVCAR-8
A12.2	<0,04	0,20	0,85	3,28
	(-)	(0,15 – 0,28)	(0,12 – 0,85)	(1,74 – 6,20)
DOXORRUBICINA	0,12	0,02	0,24	0,26
	(0,09 – 0,17)	(0,01 – 0,02)	(0,2 – 0,27)	(0,17 – 0,30)

Esta fração foi submetida a uma coluna cromatográfica por exclusão molecular usando gel Sephadex LH-20, da qual foi extraído 6 sub-frações (após análise por CCD). As sub-frações 2, 3 e 4 foram as mais ativas pelo ensaio de citotoxicidade. Após análise por CCDA, observou-se que a sub-fração 3 (575,1 mg) apresentava-se mais purificada, com menos concentração de clorofila e com aspecto diferente das demais, sendo escolhida para dar continuidade ao fracionamento fitoquímico.

Realizou-se cromatografia “flash” desta e das amostras seguintes (para purificação dos compostos presentes) usando hexano, acetato e metanol, isolados ou em misturas binárias, seguindo a ordem de polaridade até a obtenção de 32,8 mg de um composto sólido branco solúvel em diclorometano e acetona. Esta substância, na cromatografia em camada delgada, mostrou-se como ponto marrom escuro, que corre até o meio da placa analítica quando a corrida cromatográfica é feita usando hexano/acetona 40% (para mais detalhes, ver anexo). A figura 14 apresenta o cromatograma analítico da fração enriquecida com a anonacina.

Figura 14. Cromatograma analítico da fração enriquecida com a anonacina.



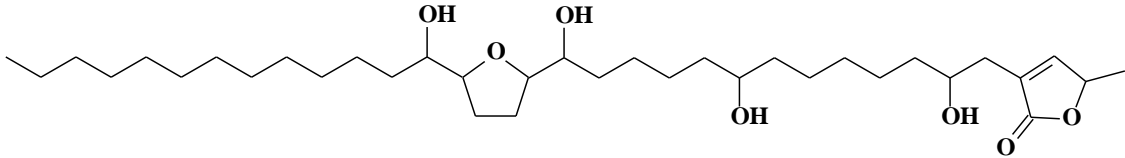
Condições de análise: coluna C18, 150 x 2.0 mm, 5 μ m, fase móvel: CH₃CN + H₂O com gradiente de 10 de CH₃CN > 100% MeOH em 45 min. Vazão de 0,2mL/min e detecção em 254 nm.

A fração contendo a anonacina apresentou no cromatograma analítico da figura 14 um pico de um composto majoritário (pico 2), representando 82,5% do total da fração. O composto corresponde a um sólido amorfo de cor parda com as seguintes características químicas: EM m/z 597,4791 [M + H]⁺, correspondente a C₃₅H₆₅O₇, 597,4791) EM/EM m/z [M+H -H₂O]⁺ (m/z 579), [M+H -2H₂O]⁺ (m/z 561), [M+H -3H₂O]⁺ (m/z 543), [M+H -4H₂O]⁺ (m/z 525). RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,20 (H-33,s), δ 5,04(H-34,s), δ 3,80 (H-21,s), δ 3,59 (H-12,s), δ 3,41 (H-22,s), δ 2,53 (H-3a,s), δ 2,40 (H-3b,s), δ 1,97 (H-19b, H-20b,s), δ 0,87 (H-32,s); RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) δ 174,9 (C-1), δ 131,3 (C-2), δ 152,2 (C-33), δ 78,2 (C-34), δ 19,3 (C-35) e 70,0 (C-4). No composto, a presença de quatro hidroxilas foi confirmada pela proeminente absorção em 3385 cm⁻¹ na região do infravermelho e a porção lactona (C=O) com absorção em 1750 cm⁻¹ (ver anexo).

Os dados de RMN ¹³C corroboram com a estrutura de uma acetogenina com anel monotetrahydrofurano com 4 sinais característicos de hidroxilas confirmadas pelo RMN ¹H. Os sinais das hidroxilas também foram confirmados, além dos sinais de infravermelho, pela perda de sucessivas moléculas de H₂O no espectro de massa de alta resolução (Ver anexo).

Com base nesses achados e com dados publicados na literatura, sugerimos que a acetogenina isolada trata-se da anonacina. A tabela 5 mostra as características químicas da molécula em questão.

Tabela 5. Estrutura e características químicas da anonacina.

<u>ANONACINA</u>	
	
Aspecto	Sólido amorfo branco
Fórmula estrutural	$C_{35}H_{64}O_7$
Massa molecular	596 u.m.a
Pureza	82,5%
Solubilidade	Diclorometano e Acetona

4.3 Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica da anonacina

Inicialmente foi verificado o efeito citotóxico do composto teste em algumas linhagens tumorais e uma cultura primária de células mononucleares do sangue periférico (CMSP). O teste de citotoxicidade realizado com anonacina pelo método do MTT (usando concentrações que variaram de 0,0001 a 8.380 nM) mostrou que essa acetogenina apresenta atividade antiproliferativa frente à todas as linhagens tumorais testadas, com CI_{50} variando de 1,56 a 3.280 nM em HCT-116 e HL-60, respectivamente após 72 horas de incubação, conforme tabela 6.

Para analisar a seletividade do composto, um ensaio antiproliferativo pelo método do alamar blue com CMSP foi realizado. A acetogenina obtida das folhas de *A. muricata* apresentou $CI_{50} > 8380$ nM. A rotenona, usada como controle positivo do experimento, teve CI_{50} calculada em 11,56 nM para as CMSP e para as linhagens tumorais, os valores variaram de 154 nM para a linhagem leucêmica K-562 à 0,58 nM para a linhagem de câncer colorretal HCT-116. Conforme evidenciado na tabela 5, a anonacina manifestou maior atividade citotóxica para as linhagens SF-295, OVCAR-8, PC-3M e HCT-116, respectivamente, conforme tabela 6.

Tabela 6. Concentração inibitória média da anonacina em linhagens celulares tumorais e não-tumorais (CMSP) através do método do MTT após 72 horas de incubação.

LINHAGEM	CI ₅₀ 72 h (nM)	
	Intervalo de confiança de 95%	
	anonacina	ROTENONA
HCT-116	1,70 (0,93 – 3,12)	0,58 (0,21 – 1,62)
HL-60	3.280 (2.969 – 10.151)	NT
K-562	1.277 (967,3 – 1.685)	2.326 (1.067 – 5.075)
OVCAR-8	0,45 (0,21 – 0,97)	6,36 (4,28 – 9,43)
PC-3	4,17 (1,61 – 10,83)	2,26 (0,89 – 5,76)
PC-3M	0,88 (0,32 – 2,39)	1,15 (0,40 – 3,27)
SF-295	0,01 (0,006 - 0,032)	14,15 (5,72 – 34,96)
CMSP	> 8.380 (-)	11,554 (7598 - 17570)

NT: Não-testado.

Para verificar uma possível seletividade da anonacina sobre a proliferação de células não-tumorais, o teste de citotoxicidade pelo método do alamar blue com células mononucleares do sangue periférico foi realizado. Neste ensaio, observamos que o composto não apresentou, entre as concentrações testadas, que variaram de 0,06 até 8,38 μ M, efeito citotóxico, sendo, portanto, >8,38 μ M.

Em seguida, realizou-se o ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT após 24 e 48 h de incubação com a acetogenina na linhagem HCT-116, que foi escolhida para dar prosseguimento aos estudos de mecanismo de ação com base no ensaio do MTT após 72 horas de exposição. Em 24 horas de tratamento, esse composto não apresentou efeito citotóxico, sendo > 8,38 μ M (dados não mostrados). No entanto, em 48 h, observa-se, como em 72 h, efeito

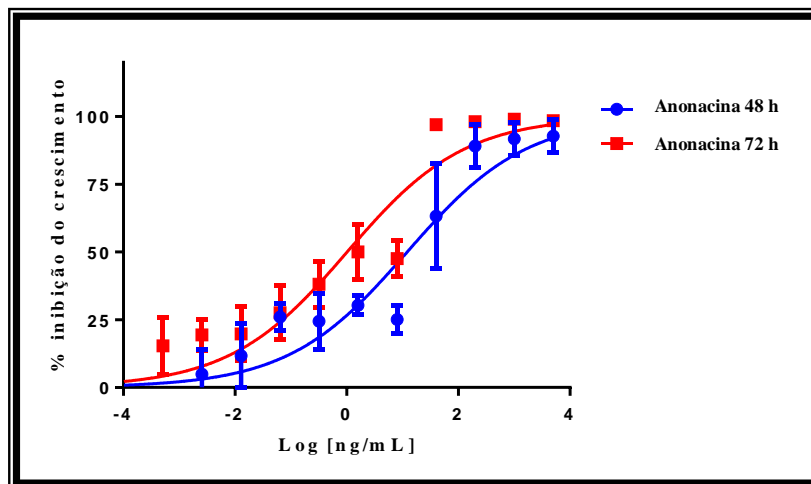
citotóxico na ordem de nanomolar, conforme apontado na tabela 6. A rotenona, usada como controle positivo, mostrou citotoxicidade no mesmo tempo de exposição, no entanto, apresentou CI_{50} maior quando comparado com o composto-teste.

Tabela 7. Concentração inibitória média da anonacina determinado pelo método do MTT na linhagem tumoral HCT-116 após 48 h de incubação.

LINHAGEM	CI_{50} 48 h (nM)	
	Intervalo de confiança de 95%	
	ANONACINA	ROTENONA
HCT-116	20,30 (11,38 – 36,20)	405,91 (263,67 – 624,40)

A figura 15, apresenta o perfil de inibição da acetogenina nas concentrações testadas nos tempos de 48 e 72 h de incubação, evidenciando perfil citotóxico dose e tempo dependente através do método do MTT e determinado através de regressão não-linear no programa GraphPad Prism, versão 5.0. A análise de variância mostra que os valores de CI_{50} da anonacina calculados nos tempos de 48 e 72 h para HCT-116, são estatisticamente significantes.

Figura 15. Citotoxicidade dose-tempo dependente da anonacina na linhagem tumoral de cólon HCT-116 avaliado pelo método do MTT após 48 e 72 h de incubação.



4.4 Atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos *Mus musculus*

No ensaio de atividade hemolítica, consideram-se ativas, substâncias que apresentem concentração eficaz capaz de causar 50% de hemólise (CE_{50}) em eritrócitos de camundongos *Mus musculus* < 250 $\mu\text{g/mL}$.

A anonacina foi testada em concentrações que variaram de 0,97 até 250 $\mu\text{g/mL}$. O composto, após 1 hora de incubação em temperatura ambiente e constante agitação, apresentou efeito hemolítico nas maiores doses, com CE_{50} calculada em 71,62 $\mu\text{g/mL}$, o que equivale a 120,2 μM .

4.5 Atividade antiproliferativa em HCT-116 através do método de exclusão do corante azul de Trypan

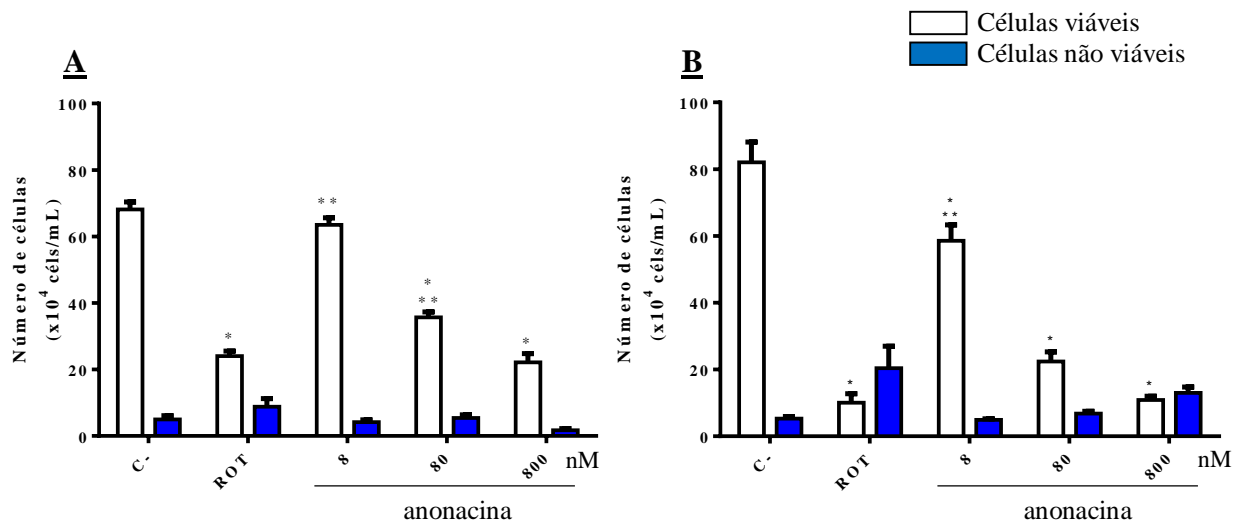
As concentrações (8, 80 e 800 nM) testadas no ensaio do Trypan e nos demais experimentos foram baseadas nos valores de CI_{50} da anonacina obtidos após 48 e 72 h de incubação com HCT-116. Para esse e para os demais experimentos, rotenona, na concentração de 100 nM, foi utilizada como controle positivo.

A avaliação da viabilidade celular usando o azul de Trypan na linhagem HCT-116 após 48 h de incubação, evidenciou que a acetogenina em estudo reduziu significativamente o número de células viáveis nas maiores concentrações testadas (80 e 800 nM) quando comparadas ao controle negativo, sem haver aumento no número de células não-viáveis.

Em 72 h de incubação, as três doses usadas foram efetivas na diminuição das células viáveis, com uma inibição da proliferação superior ao tempo de 48 h de incubação e uma diferença expressiva na porcentagem de inibição das doses nos dois tempos analisados. A dose 80 nM apresentou, no tempo de 48 h, uma inibição de 50% da proliferação celular, no entanto, em 72 h, essa inibição foi de 70%. No tempo de 72 h de incubação, apenas a dose de 800 nM foi capaz de causar um discreto aumento nas células não-viáveis.

Rotenona, usada como controle positivo, diminuiu consideravelmente o número de células viáveis nos dois tempos, com um aumento estatisticamente significativo no número de células não viáveis no tempo de 72 h de incubação, conforme mostrado na figura 16.

Figura 16. Efeito da anonacina na viabilidade de HCT-116 determinado pelo método de exclusão do corante azul de Trypan após 48 (A) e 72 h (B) de incubação.



O controle negativo recebeu apenas DMSO. A rotenona (100 nM) foi utilizada como controle positivo (ROT). Os dados correspondem a média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,05$ comparado ao controle negativo e ao positivo, respectivamente, por ANOVA, seguido do teste de Newman Keuls.

4.6 Análise morfológica das células HCT-116 tratadas com anonacina.

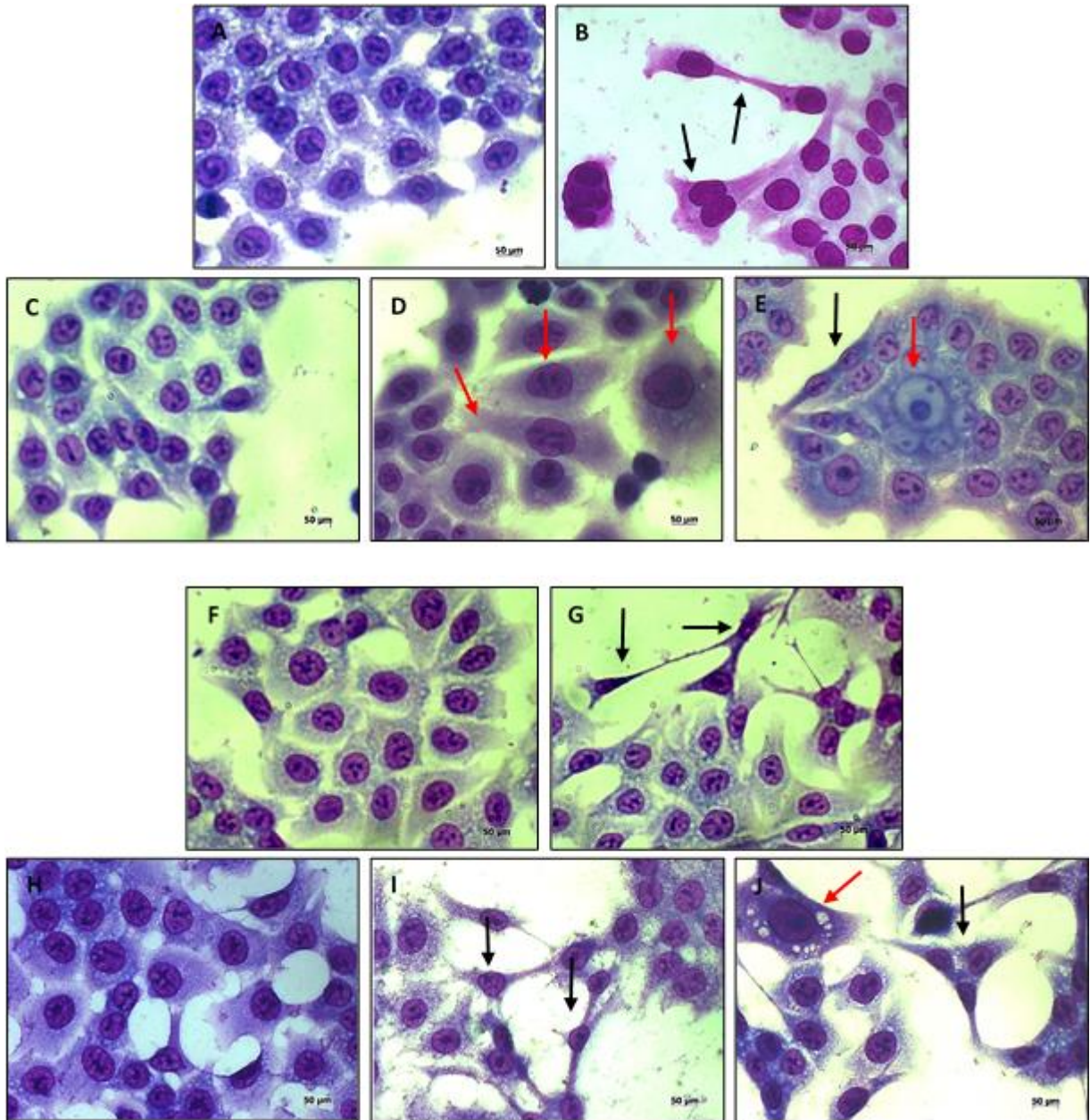
As células da linhagem de câncer colorretal HCT-116 são caracterizadas morfológicamente por serem poligonais, com citoplasma visível e de forma irregular e núcleo bem definido e com muitos nucléolos (Figura 17). A análise morfológica das células tratadas com a anonacina evidenciou algumas alterações nas células, quando comparado com o controle negativo. Essas alterações são condizentes com o padrão de morte celular por necrose e/ou apoptose (picnose, oncoses, fragmentação do DNA, condensação de cromatina ou formação de “blebs”). Algumas células apresentam vacúolos citoplasmáticos característicos, sugerindo uma possível autofagia.

Após 48 e 72 h de incubação, as células tratadas com 8 nM, não apresentaram alterações significativas no citoplasma e/ou no núcleo, no entanto, para as concentrações de 80 e 800 nM, as células evidenciaram alterações aparentes na relação núcleo-citoplasma. Anonacina na concentração de 80 nM, após 48 e 72 h de incubação, alterou o formato de HCT-116, em que as células adquiriram um aspecto fusiforme, com alteração na morfologia do núcleo (núcleo fusiforme). As alterações observadas sugerem células sofrendo morte tanto por necrose como por apoptose; a maioria das células apresenta-se como o controle negativo, no entanto houve rarefação celular.

Na concentração de 800 nM houve aumento substancial do núcleo (ovoide) e citoplasma volumoso na maior dose nos dois tempos analisados, células gigantes multinucleadas e células com características fusiformes e citoplasma escasso e vacuolizado. Há, nessa dose, uma diminuição relevante no número de células quando comparado com o controle positivo e negativo (Figura 15). As mudanças sugerem células em necrose, apoptose e autofagia.

A rotenona, usada como controle positivo do experimento, também alterou a forma do núcleo e do citoplasma, com células adquiriram formato totalmente irregular, filamentoso, além de diminuir expressivamente o número total de células.

Figura 17 - Análise morfológica de células HCT-116 após 48 e 72 h de incubação com anonacina e coradas pelo kit panótico rápido.



Células visualizadas por microscopia óptica. (A e F) controle negativo de 48 e 72 h, respectivamente, tratado apenas com DMSO. (B e G) controle positivo tratado com rotenona. (C e H) células tratadas com a acetogenina na concentração de 8 nM. (D e I) células tratadas com o composto na concentração de 80 nM. (E e J) células tratadas com a anonacina na concentração de 800 nM. Células com núcleo e citoplasma fusiformes indicadas pelas setas pretas. Células com inchaço do núcleo e aumento de volume indicadas pelas setas vermelhas.

5 DISCUSSÃO

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade em virtude dos altos índices de mortalidade, além do sofrimento advindo das formas de tratamento da doença. É uma doença que é alvo de pesquisas para o desenvolvimento ou descoberta de novos fármacos, sendo caracterizada pelo crescimento descontrolado de um tecido com capacidade de difundir-se para outros órgãos. É responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito do mundo, representando, assim, um problema de saúde pública mundial (CALIXTO, 2003; ALMEIDA et al., 2005; FONTES; CESAR; BERALDO, 2005; BARBOSA, 2009).

O câncer é tratado basicamente por procedimentos cirúrgicos, pelo uso de radiações ionizantes em doses elevadas e pela quimioterapia (INCA, 2002). Dentre os candidatos a medicamentos antineoplásicos, estão os que podem ser utilizados tanto para o tratamento como para a prevenção do câncer. Nesta classe incluem-se as drogas derivadas de produtos naturais.

A família Annonaceae tem sido alvo de intensas pesquisas tanto no enfoque químico como farmacológico, e muitas outras espécies pertencentes a esta família ainda são inéditas sob esses aspectos. Na fase inicial de estudos com plantas desta família, vários autores e seus grupos, destacando-se MacLaughlin (Purdue, EUA), Cave (CNRS, França), Fugimoto (Tokio, Japão), Pettit (Arizona, EUA) e Sneden (Virgínia, EUA) emvidaram esforços para o isolamento, elucidação estrutural e caracterização biológica de diversas acetogeninas (LIAW et al., 2010). A espécie *A. muricata* já tem relatado na literatura o isolamento de vários alcaloides isoquinolínicos (com atividades antibacteriana, ansiolítica, antifúngica e citotóxicos para linhagens celulares de câncer de pulmão, cólon e leucemia) e acetogeninas, bem como suas ações farmacológicas. No entanto, sabe-se que o ambiente no qual o vegetal se desenvolve e os tipos de cultivo influem sobre a composição química do mesmo por variação de seu metabolismo (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1988; CHEN et al., 2001; RINALDI, 2007).

No presente trabalho, as folhas de *A. muricata* foram secas (o processo de secagem interrompe a etapa de degradação por inibir enzimas, processos fermentativos e impedir o desenvolvimento de microrganismos e as reações de oxidação e hidrólise) e colocadas em contato com acetona em percolador, por 72 h ao abrigo de luz, para extração dos metabólitos secundários (SHARAPIN et al., 2000). A utilização de álcoois (etanol, metanol ou misturas hidroalcoólicas) e solventes orgânicos em geral, tais como a acetona na obtenção de extratos orgânicos vegetais apresentam como vantagem a impossibilidade de ocorrer hidrólise durante

o processo extrativo, ou hidrotermólise no caso de uma extração a quente, bem como sua alta estabilidade em condições ambientais (LÜCKEMEYER, 2009).

Após o processo de extração, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador para eliminação do solvente e a investigação fitoquímica foi bioguiada pela verificação do potencial citotóxico (através do método do MTT) do extrato, das frações e do composto isolado, demonstrando a eficácia destes em inibir a proliferação de células cancerosas e legitimando as evidências empiricamente demonstradas em diversos estudos etnofarmacológicos.

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que provoca uma série de modificações, que interfere na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas.

A lesão das células tumorais e a intensidade com que esse processo ocorre em virtude do tratamento com substâncias bioativas depende de diversos fatores, dos quais pode-se citar a lipofilicidade (habilidade de um composto químico dissolver-se em compostos lipídicos em geral) do composto em questão, assim como a concentração utilizada e o tempo de incubação com o mesmo; a linhagem celular adotada nos experimentos também influenciará nos efeitos observados para as substâncias em estudo. Além disso, a citotoxicidade pode ser também evidenciada por alterações em funções celulares, tais como síntese de proteínas, atividade lisossomal e atividade mitocondrial (NARDONE, 1977).

O sal de tetrazólio (MTT) é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que o reduzem em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido no composto formazan de coloração azul-escuro, não solúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico com MTT é um método sensível e quantitativo, pois mede a quantidade de formazan formado através de espectrofotometria, onde o valor da absorbância obtido é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Este ensaio possui como vantagens a possibilidade de testar rapidamente um grande número de amostras, sua facilidade de execução e a objetividade com a qual os resultados são obtidos (SIEUWERTS et al., 1995).

Para a obtenção de frações de menor complexidade química, prosseguiu-se com o tratamento cromatográfico do extrato acetônico e das frações, utilizando solventes de polaridades crescentes. O extrato acetônico obtido das folhas de *A. muricata* foi selecionado para os estudos fitoquímicos com base em pesquisas realizadas anteriormente no LabNOE,

onde evidenciaram o potencial antiproliferativo do extrato em células tumorais de origem humana (OLIVEIRA, 2012).

Oliveira (2012) mostrou o potencial citotóxico do referido extrato frente à um painel de 10 linhagens celulares tumorais e 1 cultura de células normais (CMSP), demonstrando que esse extrato apresenta excelente potencial citotóxico nas linhagens K-562, HCT-8, HCT-116 e SF-295, além de ter apresentado efeito citotóxico frente às células mononucleares do sangue periférico. Para as linhagens MALME-3M (melanoma), MCF-7 (mama) e PC-3M (próstata), o extrato não apresentou efeito antiproliferativo e para as demais linhagens (MDA-MB-435, SNB-19) o extrato evidenciou efeito citotóxico, porém com menor eficácia.

De acordo com os critérios do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, para considerar um extrato bruto promissor para posterior isolamento, purificação e elucidação estrutural de seus princípios ativos, sua CI_{50} deve ser menor que 30 $\mu\text{g/mL}$, o que classifica o extrato do presente estudo como sendo bastante ativo para as linhagens tumorais investigadas (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

Após o processo de obtenção do extrato, prosseguiu-se com análise do mesmo usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para verificação do perfil químico do mesmo, onde pode-se evidenciar a presença de acetogeninas, flavonoides e outros compostos de classe não-definida. A presença de acetogeninas era esperado em virtude dos trabalhos publicados na literatura, onde mais de 500 acetogeninas foram isoladas de várias espécies de plantas pertencentes à família Annonaceae, incluindo *A. muricata* (LIAW et al., 2010; ZAFRA-POLO; GONZALES; ESTORNELL, 1996; ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999). Os compostos dessa classe de metabólitos secundários são considerados atualmente potenciais candidatos para a futura geração de drogas anticâncer, sendo portanto, uma classe de grande interesse atualmente por pesquisadores no mundo inteiro.

Posteriormente, foi realizado o fracionamento do extrato usando ensaios cromatográficos, como cromatografia em coluna e cromatografia analítica em camada delgada. Cromatografia (*chrom* = cor e *graphie* = escrita) é um processo físico-químico de separação de componentes de uma mistura, no qual fundamenta-se na migração diferencial desses componentes através de duas fases imiscíveis, a fase estacionária e a fase móvel (LIMA, 2007; DEGANI et al., 1998). Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento mais amplamente utilizados atualmente. Servindo, também, para fins de identificação e análise de misturas e de substâncias isoladas (SIMÕES et al., 2010).

O extrato foi submetido a coluna cromatográfica filtrante para obtenção de frações com menor complexidade química e com classes químicas definidas de acordo com a polaridade do

solvente usado para a extração. Desse modo, o extrato foi particionado nas frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

Segundo Simões et al. (2010), o uso de hexano em extratos orgânicos vegetais permite a separação de compostos lipídicos em geral; o clorofórmio extrai preferencialmente bases livres de alcaloides; o acetato de etila, a obtenção de fração rica em compostos de polaridade intermediária, como flavonoides e acetogeninas e com o uso do metanol podemos ter frações ricas em compostos polares ligados ou não aos açúcares (heterosídeos). Assim, podemos ter em mente o grau de polaridade das substâncias bioativas no ensaio de citotoxicidade.

Após o fracionamento inicial do extrato, as frações acetato de etila e metanólica mostraram-se ser mais citotóxicas nas linhagens testadas OVCAR-8, HCT-116 e SF-295, tanto na citotoxicidade em concentração única como no ensaio em concentrações seriadas, em relação às frações hexano e clorofórmio. O extrato e as frações foram submetidos, além do teste de citotoxicidade, ao ensaio de hemólise em eritrócitos de camundongos. O extrato e as frações não apresentaram potencial em causar dano direto na membrana celular de eritrócitos, como observado para a anonacina.

A membrana dos eritrócitos é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada através de interações com drogas, sugerindo um possível mecanismo de ação na membrana e/ou um efeito tóxico indesejável para o paciente (DINIZ, 2006).

Devido aos resultados encontrados, a fração acetato de etila foi escolhida para a continuação dos estudos fitoquímicos. Esta fração apresentou rendimento de 32,93% em relação ao somatório das quatro frações obtidas na coluna cromatográfica filtrante. A fração acetato foi particionada várias vezes em solventes de polaridades crescentes, isolados ou em misturas binárias, conduzindo a obtenção de uma acetogenina.

A bioprospeção molecular do extrato acetônico de *A. muricata* permitiu obter um composto branco de natureza sólida, que foi submetida à Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H e, com a finalidade de analisar a massa do composto, submetemos o mesmo à técnica de espectrometria de massa de alta resolução acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE. De acordo com os dados espectroscópicos de RMN e EM/CLAE e por comparação com dados da literatura podemos afirmar que a substância em questão trata-se uma acetogenina apresentando fórmula molecular $\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_7$ e massa molecular de 596 u.m.a. Conforme comparação com dados da literatura, a acetogenina obtida apresenta apenas um anel THF distribuído ao longo da cadeia lateral de CH_2 (LIU et al., 1998). A acetogenina em questão trata-se da anonacina, que já havia sido previamente isolada da casca do caule de *Annona densicoma* em 1987 por McCloud e colaboradores.

A fração contendo a anonacina foi submetida ao ensaio de citotoxicidade frente a um pequeno painel de células tumorais apresentando atividade citotóxica concentração e tempo dependente, conforme evidenciado na Figura 14. Segundo Geran et al. (1997), uma substância promissora para ser antitumoral deve apresentar concentração inibitória média de no mínimo 4 µg/mL. Em virtude do grau de pureza da fração, consideramos que o potencial antiproliferativo da mesma é devido à anonacina presente.

Os resultados com a acetogenina isolada são semelhantes aos resultados encontrados por Oliveira (2012) na análise citotóxica do extrato orgânico de *A. muricata*. A acetogenina apresentou atividade antiproliferativa frente à todas as linhagens tumorais testadas, com CI_{50} variando de 3.280 nM a 1,56 nM em HL-60 e HCT-116, respectivamente após 72 horas de incubação, conforme Tabela 6. Quando comparada com o controle positivo dos experimentos (rotenona), anonacina apresentou maior potencial antiproliferativo frente às linhagens celulares SF-295, OVCAR-8, PC-3M e K-562. Rotenona pertence a uma classe de inseticidas conhecidos como rotenóides. Tais compostos são encontrados em raízes de espécies vegetais pertencentes ao gênero *Derris* e *Lonchocarpus* (LIMA, 2007). O mecanismo de ação relatado para a atividade citotóxica da rotenona em células tumorais é a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial interna.

A atividade citotóxica da anonacina já era esperada em virtude de diversos trabalhos publicados na literatura evidenciarem o potencial citotóxico dessa classe de substâncias oriundas do metabolismo secundário de espécies vegetais pertencentes à família Annonaceae. Shimada, Kozlowski e McLaughlin (1998), compararam o potencial citotóxico dessa acetogenina com a doxorrubicina nas linhagens A-549 (pulmão), MCF-7 (mama) e HT-29 (cólon). A acetogenina apresentou valores de CI_{50} na ordem de nanomolar, com maior potencial antiproliferativo quando comparado com a doxorrubicina. Yuan et al. (2003), mostrou, através do método do XTT, que essa acetogenina apresenta atividade citotóxica nas linhagens PA-1 e SKOV3 (ovário), HeLa e HeLa S3 (câncer cervical), T24 (bexiga) e BCC-1 (pele).

Assim como a rotenona, é amplamente descrito que as acetogeninas causam efeito citotóxico em linhagens celulares de tumores em virtude da inibição da enzima mitocondrial NADH-ubiquinona oxidoredutase, que compõe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (TORMO et al., 1999; BARRACHINA et al., 2007; SCHLIE-GUZMÁN et al., 2009; LIANG et al., 2009; LIU et al., 2012).

O complexo I da CTE tem como função catalisar a transferência de um íon hidreto do NADH para a ubiquinona (complexo II) e transferir um próton da matriz para o espaço entre as membranas mitocondriais. Como o processo é interrompido, não haverá a transferência de

elétrons do ubiquinol (forma reduzida da ubiquinona) para o citocromo c (complexo III) com concomitante transporte de prótons para o espaço intermembranoso; dessa forma, o oxigênio molecular não será reduzido à água pela citocromo oxidase (complexo IV) (FATO et al., 2009; NELSON; LEHNINGER, 2002).

É descrito na literatura que a inibição do complexo I é responsável por gerar Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) através de redução do oxigênio molecular, gerando principalmente o ânion superóxido, o que causaria morte celular por estresse oxidativo, ativando a via mitocondrial da apoptose ou causando necrose (FATO et al., 2009; GREEN; REED, 2013). Sendo assim, a geração de EROS pode ser o passo inicial de ativação das vias intracelulares de morte após a inibição do complexo I.

Degli et al. (1994) usa pela primeira vez mitocôndria de mamíferos para estudar se e como as acetogeninas atuam no complexo I da cadeia transportadora de elétrons (CTE). Neste trabalho, é relatado que a Bulatacina inibe a função do complexo I com eficácia similar à rotenona e à piericidina (inibidores de classe A do complexo I). Em virtude dessa habilidade de bloquear a CTE, as acetogeninas são consideradas candidatas para a geração futura de drogas antitumorais (LIAW et al., 2010; FATO et al., 2009).

O fluxo de elétrons ao longo dos complexos estar acoplado ao movimento vetorial de prótons, gerando uma energia eletroquímica (força próton motriz) que dirige a síntese de ATP à medida que os prótons fluem de volta para a matriz mitocondrial através de um poro associado à enzima ATP sintase. Assim, as células tumorais entram nos processos de morte através da inibição da síntese de ATP nas mitocôndrias (FATO et al., 2009; NELSON; LEHNINGER, 2002). A mitocôndria participa ativamente dos processos de morte das células. Uma variedade de eventos-chaves que ocorre na apoptose e também na necrose e autofagia, tem como foco a mitocôndria (GREEN; REED, 2013).

As acetogeninas podem diminuir e/ou suprimir o mecanismo de resistência de células neoplásicas a múltiplas drogas. O mecanismo dessa resistência ocorre em função da P-Glicoproteína 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 diminuir e/ou suprimir essa resistência (OBERLIES; CHANG; MCLAUGHLIN, 1997; OBERLIES et al., 1997).

Trabalhos evidenciam que a doxorrubicina (uma antraciclina citotóxica derivada do gênero *streptomyces*) pode apresentar efeito citotóxico sob condições nas quais a síntese de DNA não é afetada. Estudos mostram uma interação direta da doxorrubicina com enzimas redox

da membrana plasmática, como a NADH oxidase, cuja ativação leva a proliferação das células e sua inibição, a morte celular por apoptose (MORRÉ et al., 1996).

É largamente descrito na literatura que acetogeninas tem como alvo a NADH oxidase mitocondrial, no entanto, estudos prévios mostram que as acetogeninas bullatacina, anonacina A, asimicina e a bullatacinona inibem a atividade da enzima NADH oxidase presente na membrana plasmática de células HeLa (linhagem de câncer cervical) (MORRÉ et al., 1995). A anonacina pode estar inibindo a função desta enzima na membrana plasmática da célula tumoral. Trabalhos mostram que essa inibição pode desencadear a ativação dos processos de morte celular (MORRÉ et al., 1996; WOLVETANG et al., 1996; LÖW; CRANE; MORRÉ, 2012).

As acetogeninas apresentam diferenças estruturais que potencializam ou não a atividade citotóxica destes compostos. Em estudos de relação estrutura-atividade, observa-se que as unidades hidroxilas são extremamente importantes para a bioatividade dessas moléculas. A acetilação ou a preparação de outros derivados dos grupos hidroxilas reduzem a atividade citotóxica. A subunidade γ -lactona α , β -insaturadas é essencial para a atividade citotóxica. Redução da ligação dupla do anel γ -lactona diminui a atividade citotóxica (RUPPRECHT et al., 1990; FANG et al., 1993).

O potencial citotóxico das acetogeninas dependerá, além dos grupos funcionais presentes, da presença, do número e da disposição dos anéis tetrahydrofuranos – THF. O anel THF é importante também para a classificação destas substâncias, que podem ser mono-THF, como a anonacina, isolada de *A. densicoma*; bis-THF, como a esquamocina e a bullatacina, obtidas de *A. squamosa* e *A. bullata*, respectivamente; Os anéis THF podem ser não-adjacentes, a exemplo da bullatalicina, também obtida de *A. bullata* e, algumas acetogeninas apresentam, em vez de anel THF, um anel tetrahidropirano – THP, como a mucocina. Relatou-se o isolamento de algumas moléculas sem a presença de anéis THF ou THP, classificadas como acetogeninas não clássicas, representada pela diepomuricanina (LIANG et al., 2009; LIAW et al., 2008; YUAN et al., 2003; FUGIMOTO et al., 1988; LIAW et al., 2010).

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 presença de dióis vicinais e dupla ligação ao longo da cadeia também aumentam a atividade citotóxica (LIMA, 2007).

As diferenças encontradas nas CI_{50} para as linhagens celulares testadas pode ter relação com a estrutura química de anonacina, uma vez que, conforme descrito na literatura, acetogeninas com apenas um anel THF possuem atividade citotóxica menor em relação às que

são bis-THF adjacentes ou não (DE PEDRO et al., 2013). As diferenças nas linhagens celulares utilizadas neste trabalho também contribuem para as diferenças significativas observadas na tabela 5 dos resultados para HL-60 e k-562 em relação às linhagens HCT-116, PC-3M, SF-295 e OVCAR-8. Vale ressaltar que os resultados obtidos, por si, já são relevantes, pois os valores encontrados das CI_{50} encontram-se na ordem de nano molar. Para a continuação dos estudos de mecanismo de ação, a linhagem celular HCT-116 (carcinoma colorretal) foi escolhida com base nos resultados do MTT com 72 h de incubação.

Embora o câncer de próstata configure-se como o mais incidente no sexo masculino conforme evidenciado na Figura 2, o câncer de cólon se manifesta tanto em homens como em mulheres. Segundo o INCA (2012), o câncer do cólon e reto configura-se como o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens. Já para o sexo feminino, essa neoplasia é a segunda, com 570 mil casos novos no mundo. Além disso, os cânceres de cólon apresentam a superexpressão do oncogene Ras, o que confere um certo grau de resistência ao tratamento. Este oncogene possui função de GTPase e estar intimamente relacionado na sinalização de diversas vias transdutoras de sinal. Nos tumores, esse oncogene pode sofrer mutação, amplificação ou alterações na regulação da transcrição (ADJEI, 2001).

Verificou-se que anonacina apresentou um efeito citotóxico dose e tempo dependente para HCT-116. Após o ensaio do MTT com 24 h de exposição com a amostra, não evidenciamos nenhum efeito antiproliferativo evidente; no entanto, após 48 h de incubação, nota-se que a substância apresenta capacidade de inibir a proliferação celular na ordem de nanomolar, sendo a CI_{50} doze vezes maior que a concentração calculada para 72 h de tratamento, conforme observamos nas Tabela 6, dos resultados. Quando a anonacina é comparada com o controle positivo, a rotenona, essa inibição da proliferação celular é cerca de 20 vezes maior no tempo de 48 h. Sugerimos que essa atividade antiproliferativa, como descrito previamente, possui como mecanismo inicial de ação, a inibição do complexo I da CTE na linhagem HCT-116.

Em relação ao efeito antiproliferativo dose e tempo dependente da anonacina, DePedro et al. (2013) verificaram o potencial citotóxico de acetogeninas estruturalmente distintas (mono e bis-THF adjacente e não adjacente, mono e bis-THF com lactona insaturada e saturada) em linhagens celulares tumorais de pulmão (A-549), fígado (HepG2), cólon (HT-29), mama (MCF-7) e duas linhagens de útero, a última apresentando perfil de resistência à múltiplas drogas (MES-SA e MÊS-SA/Dx5), em diferentes tempos de incubação. Além das células tumorais, foram testadas duas linhagens celulares não tumorais, uma de mama e a outra de pulmão (184A1 e CCD16, respectivamente), para verificar a seletividade destes compostos.

No trabalho de Pedro et al. (2013) é relatado que as diferenças encontradas na citotoxicidade das acetogeninas testadas nos diferentes tempos de incubação, pode ter relação direta com a forma como esses compostos atingem ou ligam-se aos seus alvos, com diferenças na capacidade de atravessar a membrana da célula e/ou a membrana mitocondrial, bem como a estabilidade metabólica da molécula no interior da célula. Trabalhos prévios com anonacina mostram que, devido à alta lipofilicidade da molécula, a mesma tem a capacidade de permeiar livremente a bicamada lipídica da membrana plasmática da célula tumoral.

A citotoxicidade de anonacina também foi avaliada usando o método de exclusão do corante azul de Trypan. Este método baseia-se na incorporação do corante por células viáveis e não viáveis; no entanto, as células viáveis conseguem bombear o azul de Trypan para fora, enquanto as células mortas não o fazem, adquirindo coloração azul. Para tal ensaio, foi utilizado as concentrações de 8, 80 e 800 nM nos tempos de 48 e 72 h, que foram escolhidas de acordo com os resultados do MTT. Os resultados mostrados na figura 14 mostram que, conforme evidenciado no ensaio do MTT, a anonacina é dose e tempo dependente, onde podemos verificar que após 72 h de tratamento o efeito antiproliferativo do composto potencializa quando comparado com 48 h de incubação. O número de células viáveis diminui de acordo com a dose e o tempo e o número de células não viáveis permanece inalterado em relação ao controle negativo que recebeu apenas o veículo de diluição; faz-se exceção o controle positivo, rotenona, e a dose de 800 nM após 72 h de exposição com a substância.

Observa-se que no ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT, a IC_{50} para HCT-116 (1,70 nM) obtida com 72 h de tratamento é inferior a menor concentração (8 nM) utilizada no ensaio de citotoxicidade utilizando o método de exclusão do corante azul de Trypan. Nesse último método, verifica-se que apenas a dose de 800 nM e a rotenona apresentaram efeito citotóxico evidente no tempo de 72 h, observado através da acentuada diminuição no número de células viáveis concomitante com aumento no número de células não viáveis. Essa diferença entre os resultados tem relação com a sensibilidade dos métodos e, pode estar relacionado com o mecanismo de ação da anonacina sobre a mitocôndria, local onde as redutases reduzem o MTT à formazan (MOSMANN, 1983; BERRIDGE & TAN, 1993).

Na análise morfológica, as alterações observadas nas células tratadas com anonacina permitem inferir células sofrendo apoptose e/ou necrose. As células que estão sofrendo apoptose podem apresentar características evidentes, como diminuição do volume celular, condensação de cromatina, fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos ou surgimento de *blebs*. As células necróticas podem ser identificadas por esta técnica através de aumento, na fase inicial, do volume celular e perda de integridade da membrana plasmática,

com extravasamento do conteúdo citoplasmático (STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000). O aumento celular é uma das características da célula necrótica, o que foi evidenciado nesse trabalho em todas as concentrações testadas.

Bacallao et al. (1994) mostraram que a lesão celular causada pela depleção das reservas intracelulares de ATP pode estar relacionada com o rearranjo do citoesqueleto, notadamente, da actina cortical; além disso, é descrito na literatura que várias acetogeninas, incluindo a anonacina, podem estar inibindo a progressão do ciclo da célula em G1 ou na fase S, o que contribui para que a mesma ative os processos de morte (YUAN et al., 2003; YUAN et al., 2006; TORRES et al., 2013; KO et al., 2011). Com base nas alterações observadas na figura 15, poderíamos sugerir um efeito do composto sobre o citoesqueleto da célula e/ou sobre o ciclo celular, no entanto, para validação de tais suposições, faz-se necessário experimentos usando microscopia confocal e citometria de fluxo.

Uma droga ideal para o combate ao câncer é aquela que seja tóxica para células cancerosas, mas pouco prejudicial às células normais. Na realidade, a grande maioria das drogas antineoplásicas é bastante lesiva para o organismo que a recebe, daí a validade dos ensaios de citotoxicidade como triagem preliminar (FÁVARO et al., 1990).

Para verificar se a acetogenina estaria causando efeito citotóxico em células normais, testamos a mesma em células mononucleares do sangue periférico – CMSP, cuja proliferação foi estimulada por fitohemaglutinina. As concentrações de anonacina para esse ensaio variaram de 8,38 até 0,06 μM e o composto não inibiu a proliferação dos linfócitos em nenhuma concentração testada. No entanto, não podemos falar em seletividade de anonacina para células tumorais, uma vez que, para isso, seria necessário aumentar o painel de células de tecidos normais a serem analisadas e conduzir a realização de estudos *in vivo* afim de avaliar a citotoxicidade da droga em tecidos.

Com o intuito de verificar um possível efeito direto da anonacina sobre a membrana celular e evidenciar um possível efeito tóxico potencialmente indesejado, testamos a capacidade da mesma em induzir hemólise em eritrócitos. Essa atividade foi dependente da concentração de anonacina utilizada, não chegando a ser 100%. Na maior dose testada, houve hemólise em torno de 80% e na dose de 31,3 $\mu\text{g/ml}$ já não evidenciou-se hemólise significativa. A concentração eficaz capaz de causar 50% de desestabilização da membrana plasmática foi calculada em 71,62 $\mu\text{g/ml}$ (120,2 μM). No entanto, as doses que foram escolhidas com base nos resultados do MTT (8, 80 e 800 nM) para o prosseguimento dos estudos, não apresentam a capacidade de causar hemólise.

Os resultados do presente trabalho abrem perspectivas para a elucidação do possível mecanismo de ação da atividade citotóxica da anonacina em linhagem de células de câncer colorretal de origem humana. Assim como abre perspectiva para o uso dessa molécula como uma ferramenta farmacológica na associação com drogas antitumorais já estabelecidas clinicamente.

A determinação dos níveis de ATP intracelulares, a produção e o papel de espécies reativas de oxigênio (principalmente do ânion superóxido) na morte celular induzida por essa acetogenina, bem como o potencial da mesma em inibir a atividade da enzima da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial NADH-oxidoreductase, são de fundamental importância para a determinação do mecanismo de ação.

Além disso, é oportuno realizar estudos de relação estrutura-atividade para entender o efeito citotóxico dose e tempo dependente relatado neste trabalho para a linhagem HCT-116, assim como estudar o papel das caspases, de proteínas dos pontos de checagem do ciclo celular, e o efeito dessa molécula sobre as proteínas do citoesqueleto, como actina e tubulina.

É extremamente necessário estudar os possíveis efeitos tóxicos dessa acetogenina em modelos tumorais *in vivo* e *in vitro* (através de linhagens humanas não-tumorais), assim como o seu potencial antitumoral.

6 CONCLUSÃO

O fracionamento bioguiado do extrato acetônico foi eficaz na obtenção de uma fração contendo a acetogenina anonacina, com fórmula molecular $C_{35}H_{64}O_7$ e massa de 596 u.m.a. Essa acetogenina possuiu relevante atividade citotóxica frente às linhagens tumorais testadas, onde evidenciou-se maior efeito em HCT-116, PC-3M, SF-295 e OVCAR-8.

A acetogenina anonacina apresentou efeito inibitório sobre a proliferação celular de HCT-116 dose e tempo dependente, de acordo com os resultados obtidos no ensaio do MTT e do azul de Trypan; Essa substância apresentou potencial hemolítico dose dependente e não inibiu a proliferação de células mononucleares do sangue periférico.

O extrato acetônico obtido das folhas de *A. muricata* L. tem atividade citotóxica frente a linhagens celulares tumorais, sendo uma fonte promissora para a obtenção, por meio de métodos cromatográficos, de compostos pertencentes à classe das acetogeninas, com atividade citotóxica proeminente.

REFERÊNCIAS

- ADJEI, A A. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 14, p. 1062–74, July 2001.
- AHMED, S. A.; GOGAL JR, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, n.2. p. 211-224, 1994.
- AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis: flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology Journal**, v.1, n. 41, p. 133-138, Jan. 1991.
- ALALI, F. Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products**, v.3, n.62, p. 504-540, Mar. 1999.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANTOUN, M. D.; GERENA, L.; MILHOUS, W. K. Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactive. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 4, n. 31, p. 255-258, 1993.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, Oct. 2009.
- ARAÚJO, E. C.; OLIVEIRA, R. A. G.; CORIOLANO, A. T.; ARAÚJO, E. C. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública de saúde em João Pessoa (PB) use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v.8, n.2, p.44-52, jun. 2007.
- BACALLAO, R.; GARFINKEL, A.; MONKE, S.; ZAMPIGHI, G.; MANDEL, L. J. ATP depletion: a novel method to study junctional properties in epithelial tissues. I. Rearrangement of the actin cytoskeleton. **Journal of cell science**, v. 107, pt 1, p. 3301–3313, Dec. 1994.
- BARBOSA, C. V. **Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL**. 2009. 112 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.
- BARRACHINA, I.; ROYO, I.; BALDONI, H.A.; CHAHBOUNE, N.; SUVIRE, F.; DEPEDRO, N.; ZAFRA-POLO, M.C.; BERMEJO, A.; EL AOUAD, N.; CABEDO, N.; SAEZ, J.; TORMO, J.R.; ENRIZ, R.D.; CORTES, D. New antitumoral acetogenin “Guanacone type” derivatives: isolation and bioactivity: molecular dynamics simulation of diacetyl-guanacone. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 13, p. 4369-4381, July 2007.
- BERRIDGE M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. **Nature**, v. 361, p. 315-325, 1993.

BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S. Characterisation of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives Biochem Biophys**, v. 303, p. 474-482, 1993.

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.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. Determinação de atividades antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl. 1, p. 132-135, 2002.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciências e Cultura**, v.55, n. 3, 2003.

CHANG, F.R.; WU, Y.C. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 7, n. 64, p. 925-931, July 2001.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. Annonaceae (SOURSOP FAMILY). In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. Flowering Plants of the Neotropics. **The New York Botanical Garden**, New York: [s.n.], 2004. p. 18-20.

CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; PAN, W. B.; WU, Y. C. Four alkaloids from *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 7, p. 753-757, Apr. 2001.

CHENG, K.F.; LEUNG, K.S.; LEUNG, P.C. Interactions between modern and Chinese medicinal drugs: a general review. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 2, n. 31, p. 163-169, 2003.

CHIU, H. F.; CHIH, T. T.; HSIAN, Y. M.; TSENG, C. H.; WU, M. J. Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 319-327, Feb. 2003.

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, 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1/2, p. 72-79, 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 1, n. 60, p. 52-60, 1997.

DINIZ, L. R. L. **Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* ducke sobre a função renal.** 2006. 116 p. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

ERKENS, R.H.J.; MAAS, P.J.M.; CHATROU, L.W.; SCHATZ, G. E.; ZAMORA, N. Seven taxonomic discoveries in Annonaceae from southeastern Central America. **Blumea**, v. 51, p. 199-220, 2006.

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

FATO, R.; BERGAMINI, C.; BORTOLUS, M.; MANIERO, A. L.; LEONI, S.; OHNISHI, T.; LENAZ, G. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, n. 5, p. 384–392, 2009.

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 Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 62, n. 3, p. 217-224, 1990.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FOFANA, S.; ZIYAEV, R.; ABDUSAMATOV, A.; ZAKIROV, S. K.H. Alkaloids from *Annona muricata* leaves. **Chemistry of natural compounds**, v.47, n. 2, May 2011.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Química Nova na Escola**, 2005.

FUJIMOTO, Y.; EGUCHI, T.; KAKINUMA, K.; IKEKAWA, N.; SAHAI, M.; GUPTA, Y.K. Squamocin, a new cytotoxic bis-tetrahydrofuran containing acetogenina from *Annona squamosa*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 12, n. 36, p. 4802–4806, Dec. 1988.

GERAN, R.I.; GREENBERG, N.H.; MACDONALD, M.M.; ABBOTT, B.J. Modified protocol for the testing of new synthetics in the L1210 lymphoid leukemia murine model in the DR&D program, DCT, NCI. **National Cancer Institute Monographs**, n. 45, p. 151–153, 1997.

GERLINGER, M.; ROWAN, A. J.; HORSWELL, S.; LARKIN, J.; ENDESFELDER, D. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 883-892, 2012.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and Apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p.1309-1312, 2013.

GROTHEY A. Use of alternative medicine in oncology patients. **The Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 123, n. 31/32, p. 923-929, 1998.

GRUENWALD, J. O crescente papel das plantas medicinais nos cuidados de saúde da Europa. **Revista Racine**, São Paulo, n. 32, p. 151-153, 1998.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids IV. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 3, p. 389-474, 1988.

GURR, E. **Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry**. London: Academic Press, 1971.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARTWELL, J. L. **Plants used against cancer: a survey**. Lawrence, MA: Quarterman Publications, 1982.

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-HT_{1A} receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 49, n.11, p.1145-1149,1997.

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

HSIEH, W.T.; HUANG, K.Y.; LIN, H.Y.; CHUNG, J. G. *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 974-983, 2006.

HUI, Y. H.; RUPPRECHT, J. K.; ANDERSON, J. E.; LIU, Y. M.; SMITH, D. L.; CHANG, C. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Bullatalicin, a novel bioactive acetogenin from *Annona bullata* (Annonaceae). **Tetrahedron**, v. 45, n. 22, p. 6941–6948, 1989.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (Brasil). **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. 2. ed. Rio de Janeiro, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. (Brasil). **Estimativas de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em:< www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014>. Acesso em: 28 nov. 2013.

JAIN, M. V.; PACZULLA, A. M.; KLONISCH, T.; DIMGBA, F. N.; RAO, S. B.; ROBERG, K.; ŁOS, M. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 1, n. 17, p. 12–29, 2013.

JIMENEZ, P. C. **Bioprospeção de substâncias com potencial antitumoral em acídias do litoral cearense: estudos com *Eudistoma vannahmei* Millar, 1977 (Urochordata, Ascidiaceae)**. 2004. 111 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

JOLAD, S. D.; HOFFMAN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. L.; Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvária accuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 47, p. 3151-3153, 1982.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução a taxonomia vegetal. São Paulo: Nacional, 1979.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução a taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

KO, Y-M.; WU, T-Y.; WU, Y-C.; CHANG, F-R.; GUH, J-Y.; CHUANG, L-Y. Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor- α -related pathways in MCF-7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1283– 1290, 2011.

KOTAKE, Y.; OKUDA, K.; KAMIZONO, M.; MATSUMOTO, N.; TANAHASHI, T.; HARA, H.; CAPARROS-LEFEBVRE, D.; OHTA, S. Detection and determination of reticuline and N-methylcoculaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 806, n. 1, p. 75-78, 2004.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H. et al. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee in cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 3-11, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran**: Patologia -Bases Patológicas das Doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

LANDAU, D. A.; CARTER, S. L.; STOJANOV, P.; MCKENNA, A.; STEVENSON, K. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. **Cell**, v. 152, n. 4, p. 714-726, fev. 2013.

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

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. 1029-1031, 2000.

LI, N.; SHI, Z. TANG, Y.; CHEN, J.; LI, X. Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 4, n. 48, 2008.

LIANG, Y. J.; ZHANG, X.; DAI, C. L.; ZHANG, J. Y.; YAN, Y. Y.; ZENG, M. S.; CHEN, L. M.; FU, L. W. Bullatacin Triggered ABCB1-Overexpressing Cell Apoptosis via the Mitochondrial-Dependent Pathway. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

LIAW, C.C.; CHANG, F.R.; LIN, C.Y.; CHOU, C.J.; CHIU, H.F.; WU, M.J.; WU, Y.E. New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 4, n. 65, p. 470-475. Abr. 2002.

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

LIAW, C.C.; YANG, Y.L.; CHEN, M.; CHANG, F.R.; CHEN, S.L.; WU, S.H.; WU, Y.C. Mono-tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa* as Cytotoxic Agents and Calcium Ion Chelators. **Journal of Natural Products**, v. 5, n. 71, p. 764-771, May 2008.

LIMA, M. D. **Perfil cromatográfico dos extratos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através de cromatografia líquida de alta eficiência.** 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

LIU, X.; ALALI, F.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. Glacins A and B: Two Novel Bioactive Mono-tetrahydrofuran Acetogenins from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 5, n. 61, p. 620-624, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LÖW, H.; CRANE, F. L.; MORRÉ, D. J. Putting together a plasma membrane NADH oxidase: a tale of three laboratories. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 11, p. 1834–1838, Nov. 2012.

LÜCKEMEYER, D. D. **Avaliação da ação anti-herpética de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae (erva-mate).** 2009. 133 p. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

LUNA, J. S.; DE CARVALHO, J. M.; DE LIMA, M. R. F.; BIEBER, L. W.; BENTO, E. S.; FRANCH, X.; SANT'ANA, A. E. G. Acetogenins in *Annona muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides. **Natural Product Research**, v. 3, n. 20, p. 253-257, Mar. 2006.

MABBERLEY, D. J. **The Plant-Book.** New York: Cambridge University Press, 1997.

MAHUTEAU, J.; FIGADE, B. NMR Studies of Ca²⁺ Complexes of Annonaceous Acetogenins. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 3263, n. 10, p. 4811–4815, 1997.

MANICA, I. Taxonomia, morfologia e anatomia. In: SÃO JOSE, A.R. et al. **Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia).** Vitória da Conquista: UESB, 1997. p. 20-33.

MANS, D. R.; 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. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, Belo Horizonte, v. 2, n. 2, p.118-125, 2004.

MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999.

MATSUI, Y.; TAKEUCHI, T.; KUMAMOTO-YONEZAWA, Y.; TAKEMURA, M.; SUGAWARA, F.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. The relationship between the molecular structure of natural acetogenins and their inhibitory activities which affect DNA polymerase, DNA topoisomerase and human cancer cell growth. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, n. 1, p. 19-26, Jan. 2010.

MATSUSHIGE, A.; KOTAKE, Y.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; OHTA, S.; TAKEDA, Y. Annonamine, a New Aporphine Alkaloid from the Leaves of *Annona muricata*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 60, n. 2, p. 257—259, 2012.

MELOT, A.; FALL, D.; GLEYE, C.; CHAMPY, P. Apolar Annonaceous Acetogenins from the Fruit Pulp of *Annona muricata*. **Molecules**, v. 14, p. 4387-4395, 2009.

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

MORENO-SÁNCHEZ, R.; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S.; MARÍN-HERNÁNDEZ, E. Energy metabolism in tumor cells. **FEBS Journal**, p. 1393–1418, 2007.

MORRÉ, D. J.; DE CABO, R.; FARLEY, C.; OBERLIES, N. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HeLa and HL-60, but not liver, plasma membranes. **Life Science**, v. 56, n. 5, p. 343–348, 1995.

MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. **Características Botânicas das Principais Anonáceas e Aspectos Fisiológicos de Maturação**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. (EMBRAPA - Documentos, n. 106).

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

NARDONE, R.M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Ed.). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977. p.471-495.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/researchandfunding/priorities/global-research-activities>>. Acesso em: 30 Oct. 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

OBERLIES, N. H.; CROY, V. L.; HARRISON, M. L.; MCLAUGHLIN, J. L. The Annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 115, n. 1, p. 73–79, May 1997.

OBERLIES, N. H.; 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.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.5421 - 5426, 2000.

OLIVEIRA, C. C. **Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata***. 2012. 174 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Traditional medicine**. Geneva, 2003. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>. Acesso em: 05 nov. 2011.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F-T.; ZHOU, T.-T.; LIU, B.; BAO, J.-K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, dez. 2012.

De PEDRO, N.; CAUTAIN, B.; MELGUIZO, A.; CORTES, D.; VICENTE, F.; GENILLOUD, O.; TORMO, J. R.; PELÁEZ, F. Analysis of cytotoxic activity at short incubation times reveals profound differences among Annonaceous acetogenins, inhibitors of mitochondrial Complex I. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 45, n. ½, p. 145-152, 2013.

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.

PEYRAT, J.-F.; MAHUTEAU, J.; FIGADE, B.; CAVÉ, A. NMR Studies of Ca²⁺ Complexes of Annonaceous Acetogenins. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 14, p. 4811-4815, 1997.

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.

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

RIETHDORF, S.; FRITSCHKE, H.; MÜLLER, V.; RAU, T.; SCHINDLBECK, C.; RACK, B.; JANNI, W.; COITH, C.; BECK, K.; JÄNICKE, F.; JACKSON, S.; GORNET, T.; CRISTOFANILLI, M.; PANTEL, K. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 3, p. 920–928, fev. 2007.

RINALDI, M. V. N. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.** 2007. 125 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

SANTOS, M. Q. C. **Enraizamento de estacas de gravioleira (*Annona muricata* L.) CV. “Gigante das Alagoas”.** 2010. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2010.

SEGRETO, H. R.; SEGRETO, R. A. **Efeitos biológicos das radiações ionizantes.** São Paulo: Atheneu, 2006.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos.** Bogotá: Convenio Andrés Bello, 2000.

SHIMADA, H.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L. The localisations in liposomal membranes of the Tetrahydrofuran ring moieties of the annonaceous Acetogenins, annonacin and sylvaticin, as determined by 1h nmr spectroscopy. **Pharmacological Research**, v. 37, n. 5, 1998.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC₅₀-Values and Cell Survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Ed-UFSC, 2010.

SOUZA, I. V. B. **Produção comercial de pinheira (*A. squamosa* L.) em relação ao número de frutos por planta.** 2006. 81 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2006.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; CAMILO, H. DA C. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. **Revista Fitos**, v. 3, p. 25-42, 2007.

STRASSER, A.; O’CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, v.69, p. 217–245, 2000.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, May 2001.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.) **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity.** London: Academic Press, 1990. v. 6, p. 71-133.

SULIKERI, G.S.; NALAWADI, U.G.; SING, C.D. Pollen viability studies in *Annona squamosa* L. **Current Research**, v.4, n.2, p.31-32, 1975.

TORMO, J. R.; GALLARDO, T.; ARAGÓN, R.; CORTES, D.; ESTORNELL, E. Specific interactions of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. **Chemico-Biological Interactions**, v. 122, n. 3, p. 171–183, Nov. 1999.

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 I. **Oncology Research**, v.14, n.3, p.147-154, 2003.

TORRES, M. P.; RACHAGANI, S.; PUROHIT, V.; PANDEY, P.; JOSHI, S.; MOORE, E. D.; JOHANSSON, S. L.; SINGH, P. K.; GANTI, A. K.; BATRA, S. K. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* through altering cell metabolism. **Cancer Letters**, v. 323, p. 29–40, 2012.

VERAS, M. L.; BEZERRA, M. Z. B.; BRAZ FILHO, R.; PESSOA, O. D. L.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic Epimeric Withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens* (Solanaceae). **Planta Medica** (Stuttgart), v. 70, n. 6, p. 551-555, 2004.

VERAS, M. L.; BEZERRA, M. Z.; LEMOS, T. L.; UCHOA, D. E.; BRAZ-FILHO, R.; CHAI, H. B.; CORDELL, G. A.; PESSOA, O. D. Cytotoxic withaphysalins from the leaves of *Acnistus arborescens*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 710-713, 2004.

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.; ANDRADE JÚNIOR, H. F. 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, 2011.

WOLVETANG, E. J.; LARM, J. A.; MOUTSOULAS, P.; LAWEN, A. Apoptosis Induced by Inhibitors of the Plasma Involves Bcl-2 and Calcineurin Membrane. **Cell Growth and Differentiation**, v. 7, n. 10, p. 1315–1325, 1996.

XIANG, J.; CHAO, D. T.; KORSMEYER, S. J. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 25, p. 14559-14563, 1996.

YANG, Y. L.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Annosqualine: a novel alkaloid from the stems of *Annona squamosa*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, p. 1392-1399, 2004.

YUAN, S. F.; CHANG, H. L.; CHEN, H. W.; KUO, F. C.; LIAW, C. C.; SU, J. H.; WU, Y. C. Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways. **Life Sciences**, v. 78, p. 869–874, 2006.

YUAN, S. S. F.; CHANG, H. L.; CHEN, H. W.; YEH, Y. T.; KAO, Y. H.; LIN, K. H.; WU, Y. C.; SU, J. H. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Sciences**, v. 72, n. 25, p. 2853-2861, May 2003.

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

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

APÊNDICE A - EQUIPAMENTOS

- ✓ Agitador de placa shaker PSU[®] - 2T plus
- ✓ Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2[®].
- ✓ Agitador de tubo, Donner AD 8850[®].
- ✓ Banho-maria, DELTA Modelo 105Di[®]
- ✓ Câmera de luz ultravioleta, Biothec[®]
- ✓ Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403[®].
- ✓ Coluna cromatográfica
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência
- ✓ Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter[®].
- ✓ Espectrômetro de massa
- ✓ Fluxo laminar, VECO[®].
- ✓ High Throughput Screening (HTS)/ Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter[®].
- ✓ Incubadora de células, (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRETS Autoflow[®].
- ✓ Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070[®].
- ✓ Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot[®].
- ✓ Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/ PZO-Labimex Modelo Studar lab[®].
- ✓ PHmetro, Micronal B474[®].
- ✓ Pipetas automáticas, Gilson[®]
- ✓ Ressonância Magnética Nuclear
- ✓ Sonicador, unique – ultra cleaner 1600^a

APÊNDICE B - SOLUÇÕES E REAGENTES

- ✓ Acetato de etila
- ✓ Acetona
- ✓ Azul de tripan 10% (Vetec[®]): 10 mg de azul de tripan + PBS q.s.p. 100 mL de solução.
- ✓ Clorofórmio
- ✓ Dimetilsulfóxido
- ✓ Doxorrubicina, Sigma[®]
- ✓ Fitohemaglutinina
- ✓ Hexano
- ✓ Histopaque
- ✓ Metanol
- ✓ MTT (Sigma[®]): 20 mg de MTT + PBS q.s.p. 100 mL solução.
- ✓ Rotenona, Sigma[®]
- ✓ Sephadex LH-20
- ✓ Sílica gel
- ✓ Solução salina para hemólise: 8,5 g Cloreto de sódio 0,85% (Labsynth[®]) + 1,11 g Cloreto de Cálcio- 10 mM (Reagen[®]) + água destilada q.s.p. 1L solução.
- ✓ Soro Fetal Bovino [SFB] (Cultilab[®])
- ✓ Tampão fosfato de sódio (PBS): 8,766 g cloreto de sódio (Labsynth[®]) + 2,14 g + NaHPO₄.7H₂O (Labsynth[®]) + 0,276 g NaHPO₄.H₂O (Labsynth[®]) + água destilada q.s.p. 1L solução-pH 7,2.
- ✓ Tripsina 0,25%: 50 mL de tripsina 2,5% (Cultilab[®]) + 0,125 g EDTA (Proquímios[®]) + 450 mL PBS.
- ✓ Vanilina: 5 g de vanilina + 100 mL de Álcool Etilico + 100 mL sol. 0,75 M Ácido Perclórico. Vanilina dissolvida em álcool e armazenada em frasco âmbar.

APÊNDICE C – CITOTOXICIDADE DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE AMFA-A12.2

Avaliação da citotoxicidade *in vitro* em dose única de 25 µg/mL das frações oriundas da fração AMFA-A12.2 através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 3 linhagens de células tumorais.

FRAÇÕES	HCT-116		OVCAR-8		SF-295	
	Inibição média (%)	DP	Inibição média (%)	DP	Inibição média (%)	DP
A12.2-1	100	0,47	98,59	2,31	66,85	0,76
A12.2-2	100	0,23	100	0,23	100	0,11
A12.2-3	100	0,10	100	-	100	0,11
A12.2-4	100	0,28	100	0,08	100	-
A12.2-5	53,00	0,25	64,00	0,80	61,00	0,55
A12.2-6	70,02	-	84,69	-	60,24	0,92

Concentração inibitória média (CI₅₀) das frações de 2-4 obtidas de A12.2 através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 4 linhagens de células tumorais.

FRAÇÕES	Intervalo de confiança de 95%			
	CI ₅₀ (µg/mL)			
	HCT-116	HL-60	SF-295	OVCAR-8
A12.2	0,04	0,41	0,06	0,06
(Fração 2)	(0,00 – 0,23)	(0,24 – 0,69)	(0,04 – 0,07)	(0,05 – 0,07)
AMFA-A12.2	0,2	0,45	<5	<5
(Fração 3)	(0,06 – 1,08)	(0,25 – 0,80)		
AMFA-A12.2	1,18	1,15	0,06	0,05
(Fração 4)	(0,82 – 1,71)	(0,78 – 1,69)	(0,04 – 0,08)	(0,04 – 0,06)
DOXORRUBICINA	0,12	0,02	0,24	0,26
	(0,09 – 0,17)	(0,01 – 0,02)	(0,2 – 0,27)	(0,17 – 0,30)

ANEXO A – ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Figura 1. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do ^1H (300 MHz, CDCl_3) da anonacina.

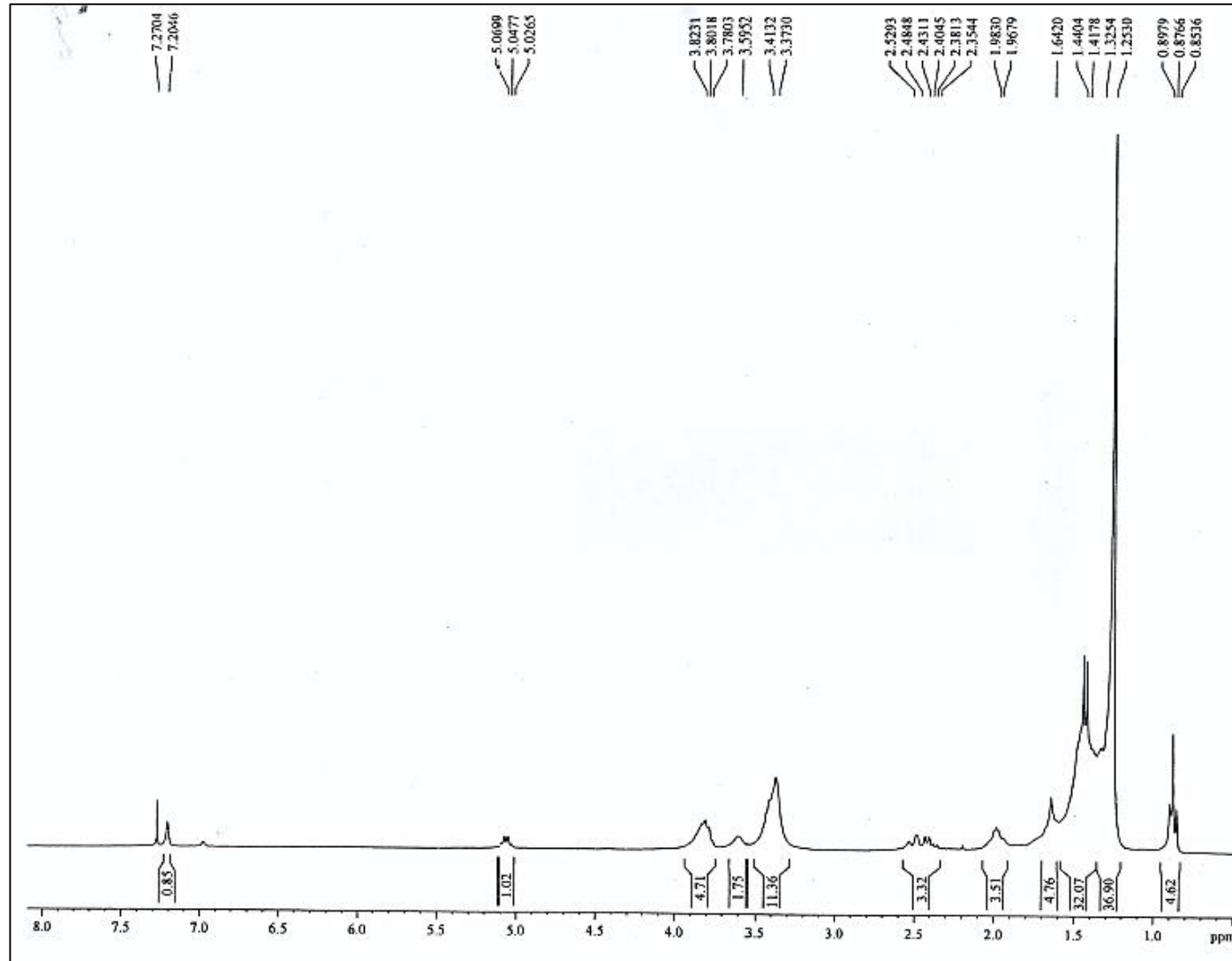


Figura 2. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da anonacina.

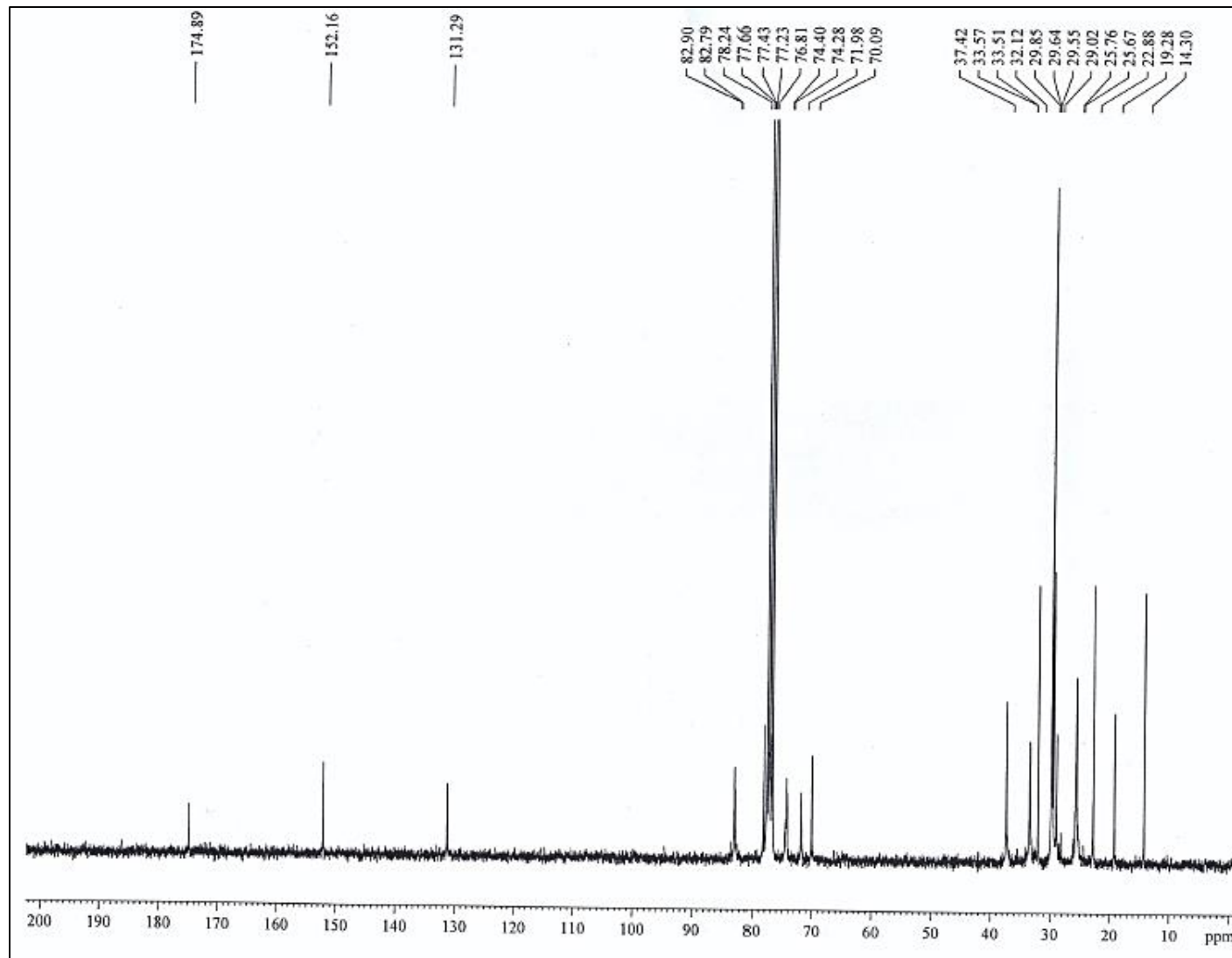


Figura 3. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) da anonacina.

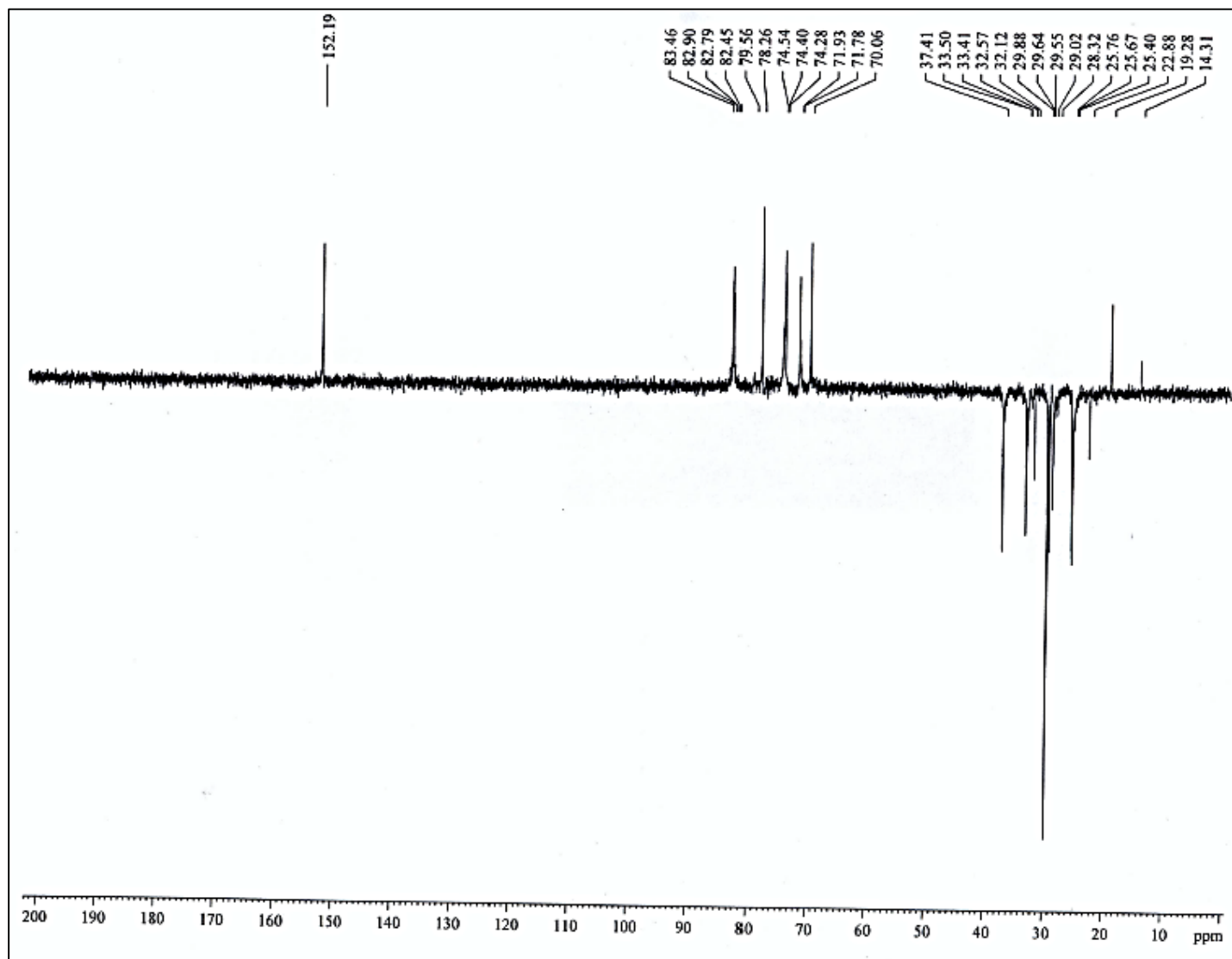


Figura 4. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional de ^1H , ^1H COSY (300 MHz, CDCl_3) da anonacina.

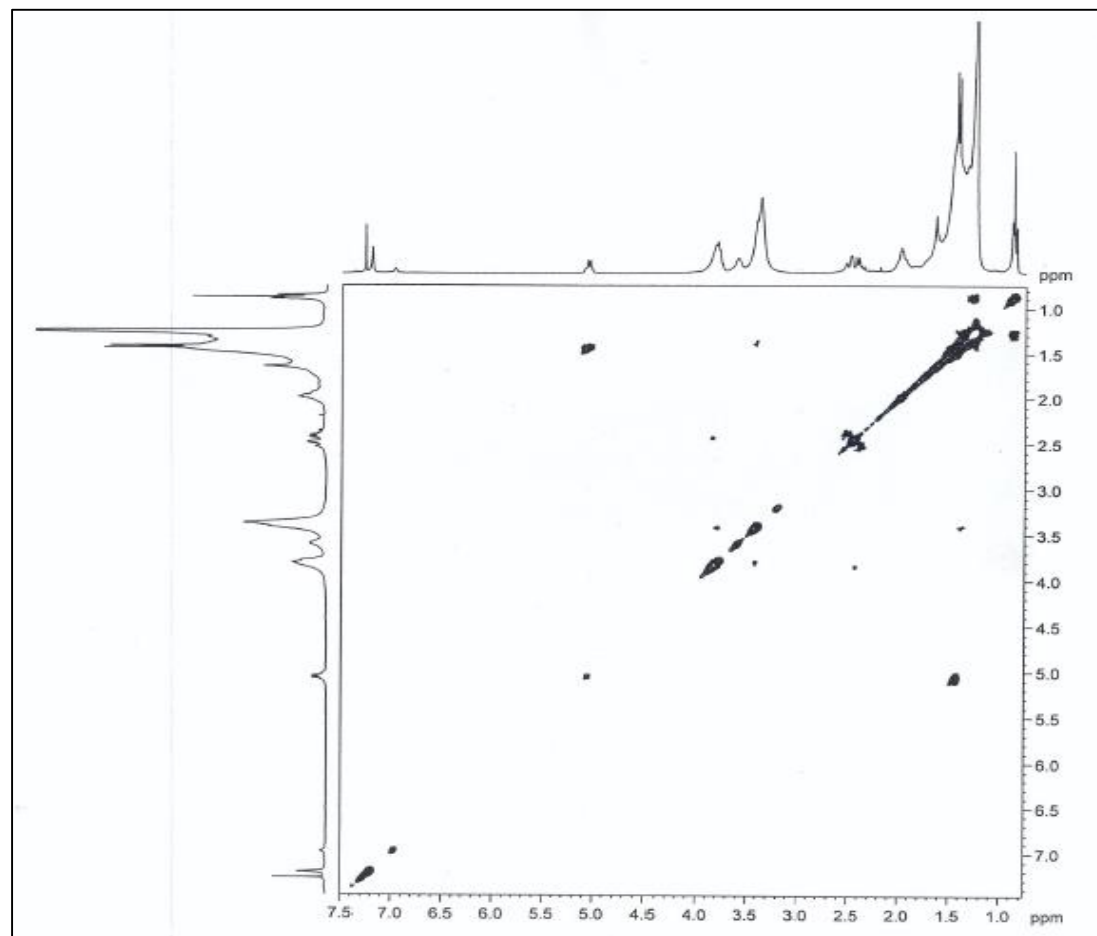


Figura 5. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional de ^1H , ^{13}C HMQC (300 MHz, CDCl_3) de anonacina.

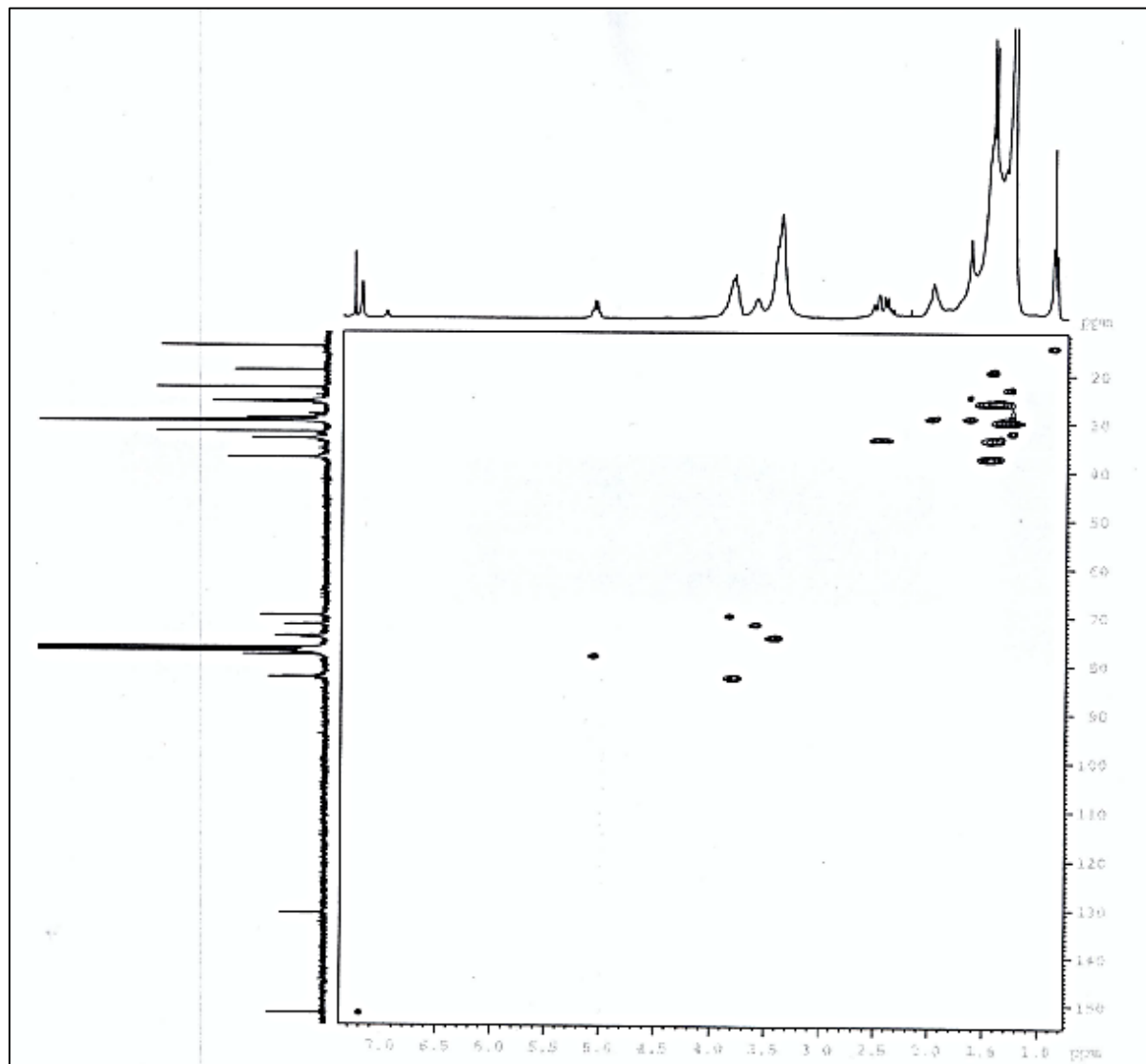


Figura 6. Espectro de massa da anonacina (A) e espectro com fragmentação do composto (B).

EM/EM. m/z no modo +. Pico base 619,4587

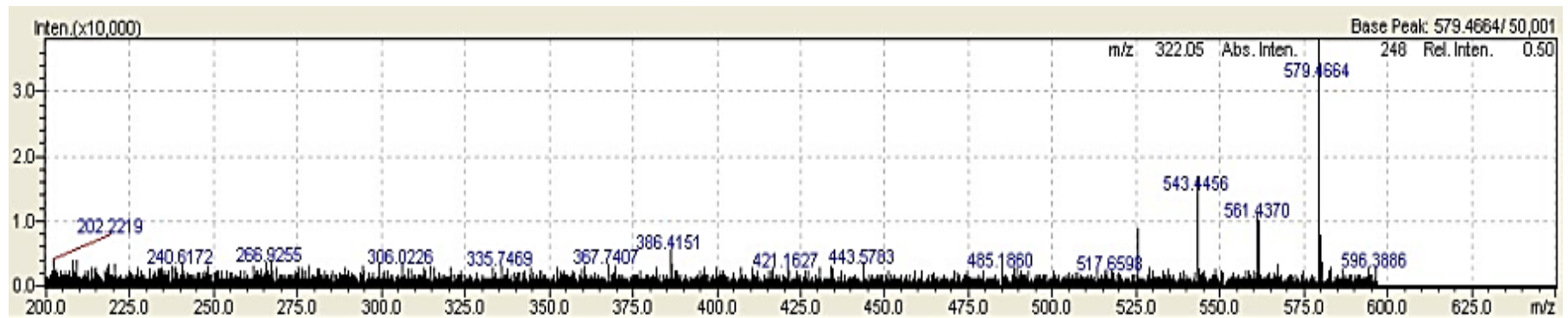
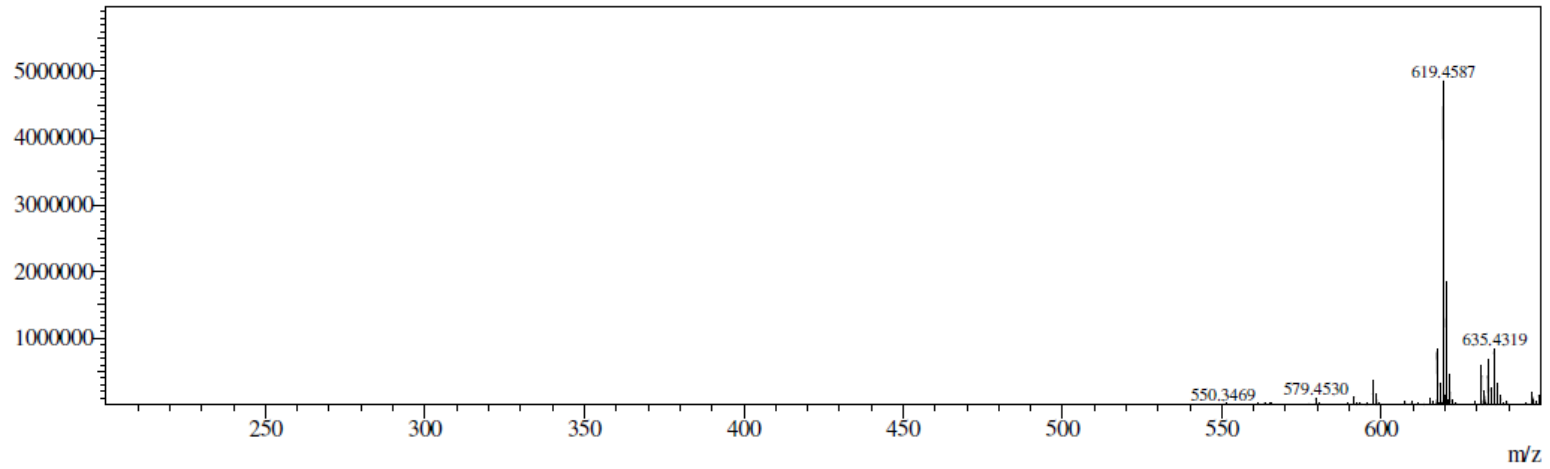


Figura 7. Espectro de infravermelho da anonacina.

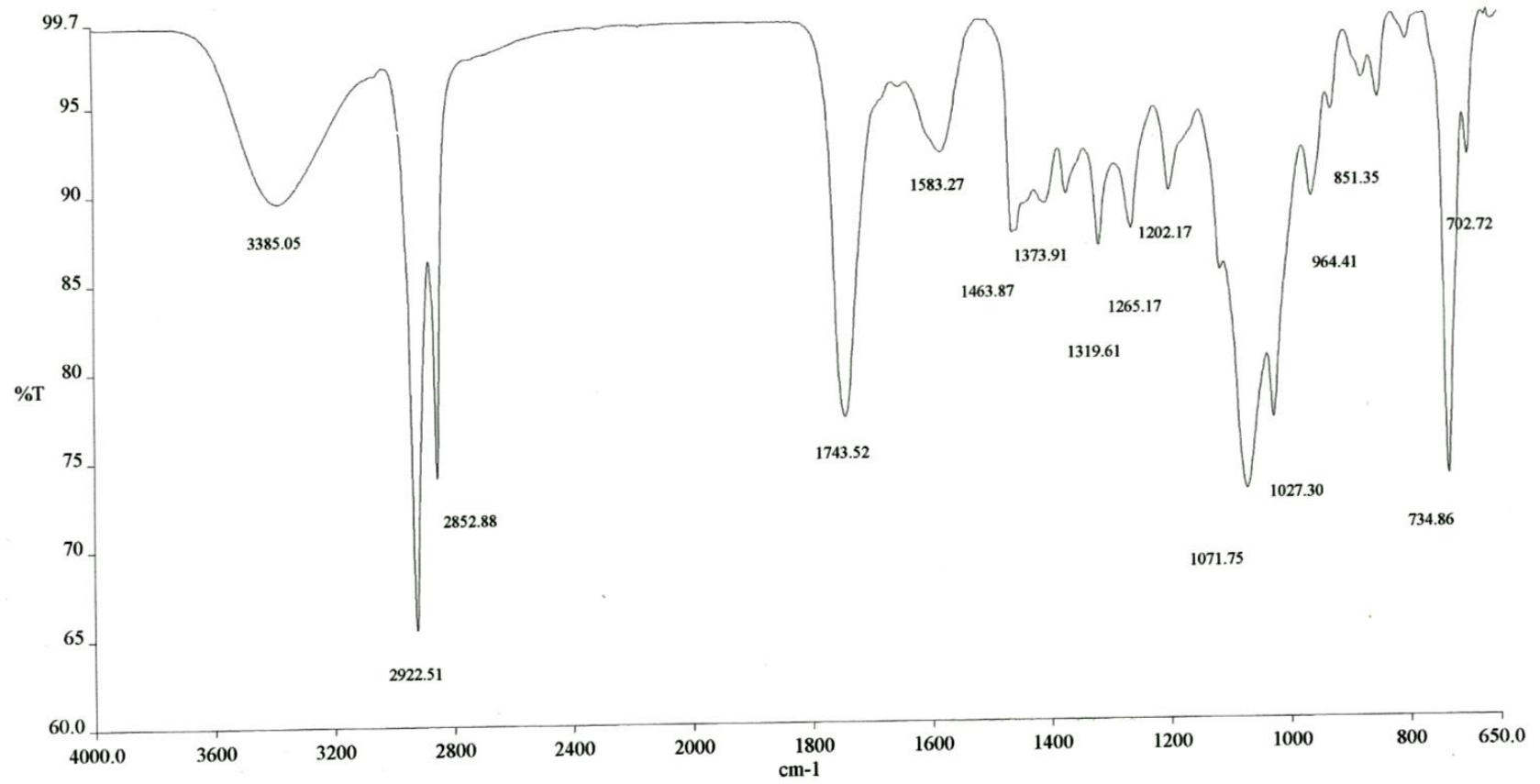


Tabela 1: Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C da acetogenina isolada no presente estudo com os da anonacina.

<i>cis</i> -Anonacina		Acetogenina isolada		
Posição	δ ^1H (J em Hertz)	δ ^{13}C	δ ^1H (J em Hertz)	δ ^{13}C
1		174,6		174,8
2		131		131,2
3a	2,38; 1H (ddt, 15,1; 8; 1,4)	33,4	2,38; 1H; m	33,5
3b	2,51; 1H (dddd, 15,1; 4; 1,4)		2,51; 1H; m	
4	3,82; 1H; m	69,8	3,8; 1H	70
5-8	1,1-1,6; m	22-38	1,2-1,7	22-38
9	1,1-1,6; m	22-38	1,2-1,7	22-38
10	3,59; 1H; m	71,6	3,59; 1H	71,9
11	1,1-1,6; 2H; m	22-38	1,2-1,7	22-38
12-14	1,1-1,6; 6H m	22-38	1,2-1,7	22-38
15	3,42; 1H m	74,3	3,45; 1H	74,4 ^a
16	3,82; 1H m	82,7	3,8; 1H	82,7*
17 a,b	1,94; 1H m	28,2	1,97; 1H	29
	1,76; 1H m		1,64; 1H	29
18 a,b	1,94; 1H m	28,2	1,97; 1H	29
	1,76; 1H m		1,64; 1H	29
19	3,82; 1H m	82,7	3,8; 1H	82,9*
20	3,42; 1H m	74,3	3,45; 1H	74,3 ^a ; 1H
21-31	1,1-1,6, 22H m	22-38	1,2-1,7; 22H	22-38; 22H
32	0,88, 3H (q, J=6,7)	14,1	0,87; 3H (q, J=6,7)	14,3
33	7,18; 1H (q, J=1,4)	151,8	7,2; 1H (s)	152,1
34	5,01; 1H (q, J=6,4)	78	5,04; 1H (q, J=6,6)	78,2
35	1,38; 3H (d, J=6,8)	19,2	1,4; 3H (d, J=6,8)	19,2

Fonte: GU et al., 1996.