



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Efeitos citoprotetor e citotóxico de *Annona glabra*
(Annonaceae)**

ROSANA MOURA SARMENTO

BELÉM / PA
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Efeitos citoprotetor e citotóxico de *Annona glabra*
(Annonaceae)**

Autor: Rosana Moura Sarmento

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fani Dolabela

Co-orientadora: Jaqueline Rodrigues da Silva

Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM / PA
2016

ROSANA MOURA SARMENTO

**Efeitos citoprotetor e citotóxico de *Annona glabra*
(Annonaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Trabalho defendido e aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Fani Dolabela
Instituição: Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Sandro Percário
Instituição: Universidade Federal do Pará

Profa. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia
Instituição: Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Hamilton Sarmiento e Rosângela Sarmiento e à meu noivo Luann Sena pelo carinho, amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos por Deus, pois sem ele nada seria possível. À Ele, também agradeço por ter me guiado e protegido durante toda a minha vida.

À minha família são infinitos os agradecimentos, pois sempre me apoiaram e entenderam os dias de ausência. Especialmente aos meus pais Hamilton e Rosângela, que se esforçaram para que eu alcançasse meus objetivos e sempre me incentivaram a querer sempre o melhor. Ao meu irmão, Fábio, por tornar meus dias leves com o seu bom humor.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fani Dolabela, por todo apoio durante minha caminhada desde a vida acadêmica. Seu empenho e dedicação na minha orientação foi primordial nessa etapa de minha vida.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Jaqueline da Silva Rodrigues pelas orientações e amizade durante minha estada em Brasília. Agradeço, também aos membros do Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB pela boa vontade e ajuda nesta etapa do trabalho, em especial ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo por me receber no laboratório.

Agradeço ao meu noivo, Luann, que acima de tudo sempre foi companheiro e amigo. Sempre esteve ao meu lado, incentivando e apoiando com carinho, paciência, compreensão e amor. Obrigada por aguentar meus dias de estresse. Agradeço por Deus tê-lo colocado em meu caminho.

Agradeço aos meus amigos Mirian, James e Ivaldo, os quais tornaram essa caminhada mais agradável pelos momentos de amizade. É muito bom saber que estamos juntos nessa caminhada. Obrigada por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Sou grato a todos os membros do laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas, em especial, Valdicley, Erica Vanessa, Alexandre, Heliton, Lara, Analu, Milena e aos participaram direta ou indiretamente dessa pesquisa. Obrigado por serem pessoas tão prestativas e dispostas e a orientar e trocar conhecimentos. Agradeço por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

Minha gratidão aos membros do Laboratório de Citogenética Humana do Instituto de Ciências Biológicas pela disponibilidade e colaboração.

Agradeço ao Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas, na pessoa do seu Jorge. Parte dessa pesquisa só pôde ser realizada através dessa parceria. Obrigada por estar sempre disposto a me ajudar com dedicação e boa vontade, principalmente nos momentos difíceis.

Agradeço aos membros do Laboratório de Pesquisa em Estresse Oxidativo do Instituto de Ciências Biológicas pela gentileza de me receber e pelas orientações. E ainda, aos amigos Rafael Quadros e Thuanny pela ajuda nos experimentos.

Às secretárias do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPA, Brasília e Cliciane, pelo apoio e paciência durante o mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, minha sincera gratidão.

EPÍGRAFE

“Acreditar em si mesmo leva a um destino infinito.
Acreditar que falhou é o fim da sua jornada.”

Sarah Meredith

RESUMO

SARMENTO, R. M. **Efeitos citoprotetor e citotóxico de *Annona glabra* (Annonaceae)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 98 p. Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

O presente estudo avaliou a o potencial citotóxico e citoprotetor de extrato etanólico obtido de cascas de *Annona glabra*, suas frações e substâncias isoladas. O pó obtido das cascas de *A.glabra* foi submetido a maceração com etanol por 7 dias, sendo a solução concentrada em rotaevaporador até resíduo. Com o extrato etanólico de *A.glabra* foi realizado a partição entre hexano:metanol aquoso (9:1). A Fração metanólica foi fracionada em coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária Sephadex e fase móvel o metanol. A citotoxicidade do extrato etanólico e frações foi avaliada através do ensaio de viabilidade celular com o MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]). A concentração citotóxica 50% (CI₅₀) foi determinada por regressão linear. O extrato, frações e subfrações foram submetidas a análise em cromatografia em camada delgada (CCD), e reunidas de acordo com características semelhantes. Frações do extrato com CI₅₀ ≤ 30 µg/mL e substância isolada com CI₅₀ ≤ 4 µg/mL são considerados citotóxicos. As frações que apresentaram citotoxicidade moderada a baixa foram submetidas aos ensaios de indução de apoptose e fragmentação de DNA por citometria de fluxo. Também, estas amostras foram submetidas a avaliação de estresse oxidativo pelo método TEAC e DPPH. O extrato de *A. glabra* (rendimento de 8,39%) foi particionado obtendo-se a fração metanólica (rendimento de 88,14%) e fração hexânica (rendimento de 8,08%). O extrato etanólico, sua fração metanólica e rutina apresentaram baixa citotoxicidade (CI₅₀=137,7; 139,4; > 200 µg/mL, respectivamente). Fração hexânica e subfrações 17 e 19 apresentaram citotoxicidade moderada não significativa (CI₅₀= 45,07; 53,45; 80,65 µg/mL, respectivamente). Todas as amostras avaliadas não induziram células a apoptose, entretanto, extrato etanólico, fração hexânica e rutina promoveram alterações na morfologia das células. Entretanto, fração hexânica, subfrações 6 e 7 apresentaram capacidade de fragmentar DNA das células. O fracionamento do extrato etanólico favoreceu o potencial citotóxico, tendo a fração hexânica como a mais promissora, e a capacidade antioxidantes também foi favorecida tendo o grupo 5 como o mais promissor. Estes resultados sugerem que as amostras de *A. glabra* apresentam baixo potencial citotóxico, e o mecanismo envolvido não está relacionado a indução de apoptose, e o extrato etanólico contém substâncias com capacidade antioxidante.

Palavras-chave: *Annona glabra*, Citotoxicidade, Atividade antioxidante, Apoptose, Fragmentação de DNA.

ABSTRACT

SARMENTO, R. M. **Cytotoxic and cytoprotective effects of *Annona glabra* (Annonaceae)**. Dissertation (Master's degree) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 98 p. Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

The present study evaluated the cytotoxic and cytoprotective potential of ethanolic extract obtained from the shells of *Annona glabra*, its fractions and isolated substances. The powder obtained from *A. glabra* husks was subjected to maceration with ethanol for 7 days, and the solution was concentrated in a rotavaporator to residue. The ethanolic extract from *A. glabra* was partitioned between aqueous hexane: methanol (9: 1). The methanolic fraction was fractionated in chromatographic column using as Sephadex stationary phase and mobile phase the methanol. The cytotoxicity of the ethanolic extract and fractions was evaluated by the MTT cell viability assay ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide]). The extract, fractions and subfractions were submitted to thin layer chromatography (CCD) analysis, and pooled according to similar characteristics. The 50% cytotoxic concentration (IC₅₀) was determined by linear regression. Fractions of the extract with IC₅₀ ≤ 30 µg / mL and isolated substance with IC₅₀ ≤ 4 µg / mL are considered cytotoxic. Fractions with moderate to low cytotoxicity were submitted to the induction of apoptosis and DNA fragmentation by flow cytometry. Also, these samples were submitted to evaluation of oxidative stress by the TEAC and DPPH method. The extract of *A. glabra* (8.39% yield) was partitioned to give the methanolic fraction (yield 88.14%) and hexane fraction (yield 8.08%). Ethanolic extract, methanolic fraction and rutin showed low cytotoxicity (IC₅₀ = 137.7, 139.4, > 200 µg / mL, respectively). Hexanic fraction and subfractions 17 and 19 showed moderate non-significant cytotoxicity (IC₅₀ = 45.07, 53.45, 80.65 µg / mL, respectively). All the evaluated samples did not induce apoptosis cells, however, ethanolic extract, hexane fraction and rutin promoted changes in the cell morphology. However, hexanic fraction, subfractions 6 and 7 showed the ability to fragment DNA from cells. The fractionation of the ethanolic extract favored the cytotoxic potential, with the hexane fraction being the most promising, and the antioxidant capacity was also favored, with group 5 being the most promising. These results suggest that *A. glabra* samples have low cytotoxic potential, and the mechanism involved is not related to the induction of apoptosis, and the ethanolic extract contains substances with antioxidant capacity.

Keywords: *Annona glabra*, Cytotoxicity, Antitumoral Activity, Apoptosis, DNA Fragmentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Equilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante.	20
Figura 2	Metabólitos secundários encontrados na família Annonaceae.	28
Figura 3	Monoterpenos isolados de <i>Annona squamosa</i>	29
Figura 4	Acetogeninas obtidas de <i>Annona cornifolia</i>	30
Figura 5	Flavonoides e acetogeninas com atividade antioxidantes encontrados na família Annonaceae.	32
Figura 6	Hábitat em que pode ser encontrada a espécie <i>A. glabra</i>	33
Figura 7	Estrutura química do ácido caurenóico.	35
Figura 8	Acetoneginas isoladas de <i>Annona glabra</i>	36
Figura 9	Redução do MTT por enzimas mitocondriais.	37
Figura 10	Ligação da anexina V aos resíduos de fosfatidilserina.	39
Figura 11	Estabilização do radical ABTS.+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	42
Figura 12	Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.	43
Figura 13	Esquema utilizado para o fracionamento do extrato etanólico obtido das cascas de <i>Annona glabra</i>	50
Figura 14	Sequência cronológica dos experimentos.....	52
Figura 15	Células 4T1.	53
Figura 16	Curva padrão do Trolox para a determinação do TEAC.	57
Figura 17	Curva padrão do Trolox para a determinação do DPPH	59
Figura 18	Perfis cromatográficos e espectros de UV do extrato e frações obtidos das cascas de <i>A. glabra</i> . $\lambda = 280$ a 400 nm.	61
Figura 19	Estrutura química geral de um flavonoide.	62
Figura 20	Viabilidade Celular de <i>A. glabra</i> sobre as células 4T1 (Carcinoma mamário murino).	64
Figura 21	DotPlot comparando a marcação das células 4T1 por Anexina V e Iodeto de propídeo (IP) após tratamento de 24h com extrato etanólico, fração metanólica e rutina.	65
Figura 22	DotPlot comparando as alterações na morfologia (tamanho e granulosidade) das células 4T1 após tratamento de 24h com extrato	

	etanólico, fração metanólica e rutina.	66
Figura 23	DotPlot comparando a marcação das células 4T1 por Anexina V e Iodeto de propídeo (IP) após tratamento de 24h com a fração hexânica, fração 17 e fração 19.	67
Figura 24	DotPlot comparando as alterações na morfologia (tamanho e granulosidade) das células 4T1 após tratamento de 24h com fração hexânica, fração 17 e fração 19.	67
Figura 25	Histograma da quantificação de fragmentação de DNA das células 4T1 após tratamento de 24h com a fração e subfrações de <i>A. glabra</i>	68
Figura 26	Resultados da ação antioxidante do extrato etanólico da <i>Annona glabra</i> subfração grupo 5 e rutina sobre a inibição da solução de radical ABTS •+.	69
Figura 27	Fluxograma das etapas de desenvolvimento dos experimentos.	78

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Esquemas quimioterápicos sugeridos de tratamento de acordo com risco.	25
Tabela 1	Subfrações resultantes da cromatografia em coluna de Sephadex da fração metanólica (FM) obtido do extrato etanólico da casca da <i>A. glabra</i>	51
Tabela 2	CI50 do extrato etanólico obtido das cascas de <i>A. glabra</i> e suas frações testadas em células 4T1 (Carcinoma mamário murino).	63
Tabela 3	Concentração Inibitória 50% do extrato, frações, subfrações e rutina de <i>Annona glabra</i> a base do teste TEAC.	70
Tabela 4	Média e desvios padrões do percentual de inibição do extrato etanólico, frações, subfrações e substância isolada rutina de <i>Annona glabra</i> pelo teste TEAC.	72
Tabela 5	Múltiplas comparações entre as amostra de extrato, frações, subfrações e rutina obtidas de <i>Annona glabra</i> usadas no teste TEAC	73
Tabela 6	Média e desvios padrões do percentual de inibição do extrato etanólico, frações, subfrações e substância isolada rutina de <i>Annona glabra</i> pelo teste DPPH.	74
Tabela 7	Múltiplas comparações entre as amostra de extrato, frações, subfrações e rutina obtidas de <i>Annona glabra</i> usadas no teste DPPH.	75
Tabela 8	Resultados de Indução de apoptose e Fragmentação de DNA por citometria de fluxo.	84
Tabela 9	Teste ANOVA para o ensaio TEAC.	103
Tabela 10	Teste ANOVA para o ensaio DPPH.	103

LISTA DE EQUAÇÃO

Equação 1	Percentual de células viáveis.	54
Equação 2	Percentual de células mortas.	54
Equação 3	Percentual de capacidade antioxidante.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4T1	Linhagem de carcinoma mamário murinho
A-498	Linhagem tumoral de rim humano
A-549	Linhagem carcinoma de pulmão humano
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico)
AC	Doxorrubicina + Ciclofosfamida
CI ₅₀	Concentração citotóxica 50%
CID	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Arranjos de Diíodos
CMF	Ciclofosfamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio-padrão
DPPH	(1,1-difenil-2-picrilhidrazila)
CO ₂	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE	Extrato Etanólico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FAC	5-fluorouracila + doxorrubicina + ciclofosfamida
FEC	5-fluorouracila + epirrubicina + ciclofosfamida
FH	Fração Hexânica
FITC	Isotiocionato de Fluoresceína
FM	Fração Metanólica
FS	Fosfatidilserina
FSC	<i>Foward scatter</i>
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
HT-29	Linhagem de Adenocarcinoma de cólon
IP	Iodeto de propídeo

K ₂ S ₂ O ₈	Fosfato de Potássio
K-562	Linhagem tumoral de leucemia
M17/Adr	Linhagem adenocarcinoma mamário resistente a adriamicina
MSF-7	Linhagem de carcinoma de mama humano
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NCI	<i>American Cancer Institute</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACA-	Linhagem tumoral de pâncreas humano
PBS	Phosphate buffered saline
PC-3	Linhagem tumoral de próstata humana
pH	Potencial Hidrogeniônico
qsp	Quantidade suficiente para
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
SFB	Soro Fetal Bovino
SMMC-7721	Linhagem tumoral humana de fígado
SSC	<i>Side Scatter</i>
TC	Docetaxel + Ciclofosfamida
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxylic acid
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultra violeta

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

>	Maior
<	Menor
%	Porcentagem
° C	Graus Celsius
° GL	Grau Gay Lussac
células/mL	Células por mililitro
cm	Centímetro
G	Gramma
H	Hora
Kg	Quilograma
L	Litro
mM	miliMolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	Nânometro
rpm	Rotação Por Minuto
µg/mL	Micrograma/mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Câncer	23
2.2	Família Annonaceae e gênero Annona	27
2.2.1	<i>Annona glabra L.</i>	33
2.3	Teste de Viabilidade Celular	37
2.4	Métodos de Avaliação e Quantificação de populações celulares por citometria de fluxo	37
2.4.1	INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA (DETECÇÃO DE APOPTOSE)	39
2.5	Determinação da Fragmentação de DNA	40
2.6	Avaliação da atividade antioxidante	40
2.6.1	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AO TROLOX (TEAC)	41
2.6.2	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ACORDO COM A REDUÇÃO DO RADICAL DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo Geral	44
3.2	Objetivos Específicos	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Material	45
4.1.1	EQUIPAMENTOS.....	45
4.1.2	MATERIAL DE CONSUMO.....	46
4.1.2.1	Solventes e Reagentes.....	46
4.1.2.2	Meio de Cultura e outros.....	46
4.1.2.3	Materiais plásticos, de metal e de vidro.....	47
4.1.2.4	Vidrarias.....	48
4.1.3	MATERIAL BIOLÓGICO.....	48
4.1.3.1	Linhagem celular.....	48
4.1.4	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	48
4.2	MÉTODOS	49
4.2.1	PROCESSAMENTO DOS MATERIAL VEGETAL.....	49
4.2.2	OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO.....	49
4.2.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	53
4.2.3.1	Cultivo e Manutenção da linhagem celular.....	53
4.2.3.2	Teste de Viabilidade Celular.....	54
4.2.3.3	Integridade da Membrana Plasmática (Detecção de Apoptose).....	55
4.2.3.4	Determinação da Fragmentação de DNA.....	56
4.2.4	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AO TROLOX (TEAC).....	56

4.2.5	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ACORDO COM A REDUÇÃO DO RADICAL DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).....	58
4.2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
5	RESULTADOS.....	60
5.1	Obtenção e seleção das amostras submetidas ao estudo.....	60
5.2	Avaliação da Citotoxicidade.....	62
5.3	Integridade da Membrana Plasmática (Detecção de Apoptose).....	64
5.4	Determinação da Fragmentação de DNA.....	68
5.5	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC).....	68
5.6	Capacidade antioxidante de acordo com a redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).....	71
5.7	Análise Estatística.....	71
6.	DISCUSSÃO.....	76
6.1	Obtenção e seleção das amostras submetidas ao estudo.....	76
6.2	Avaliação da Citotoxicidade.....	78
6.3	Integridade da Membrana Plasmática (Detecção de Apoptose).....	81
6.4	Determinação da Fragmentação de DNA.....	83
6.5	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC).....	84
6.6	Capacidade antioxidante de acordo com a redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).....	85
7	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
	APÊNDICE A – Preparo de meios de cultura.....	101
	APÊNDICE B – Preparo de outras soluções.....	102
	ANEXO A – Tabelas com resultados do teste ANOVA para os ensaios TEAC e DPPH.....	103

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pela expansão anormal de células e sua origem não é totalmente conhecida devido à complexidade etiológica que o envolve. Fatores externos (tabagismo, infecções, radiação e substâncias químicas), assim como fatores internos (respostas imunológicas, mutações de diversas naturezas e hormônios), podem atuar de forma conjunta ou sequencial para promover a carcinogênese, principalmente através de distúrbios no crescimento e comportamento das células, caracterizado pelo aumento das mitoses (COTRAN et al., 2006; FILARDI, 2010).

Estimativas apontam para a ocorrência de aproximadamente 596.070 novos casos de câncer no Brasil (entre 2016-2017), dos quais os mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, mama, colorretal, colo do útero e de pulmão para o sexo feminino; para o sexo masculino câncer de pele não melanoma, próstata, pulmão, colorretal e estômago serão os mais prevalentes (INCA, 2015A).

As células tumorais estão frequentemente expostas a condições de estresse, como hipóxia e desequilíbrio no metabolismo oxidativo, entre outros (DHILLON et al., 2007; SILVA E JASIULIONIS, 2014). Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio regulam vias de transdução do sinal, podendo participar das etapas da carcinogênese, de transformação e progressão tumoral, bem como da insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão de apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão e metástase, metabolismo e inflamação (HANAHAN E WEINBERG, 2011; SILVA E JASIULIONIS, 2014).

No caso do câncer de mama, o desenvolvimento e a invasão estão associados com o aumento da produção de ERO. O acúmulo de ERO participa ativamente nas transformações malignas, aumentando a instabilidade genômica através de quebra da fita dupla de DNA e modificando significativamente o microambiente tumoral através do aumento da angiogênese (GERALD et al., 2004; TOULLEC et al., 2010; BALLIET et al., 2011; TADDEI et al., 2012; GRUOSSO et al., 2016). Embora o estresse oxidativo promova propagação e crescimento do tumor, também pode melhorar a resposta aos quimioterapêuticos (MATEESCU et al., 2011; GRUOSSO et al., 2016). Portanto, não há evidências convincentes que justifiquem a utilização de

antioxidantes para a prevenção do câncer (GOODMAN et al., 2011; GRUOSSO et al., 2016).

Os radicais livres são naturalmente produzidos em vários sistemas biológicos e organismos humanos, entretanto, podem causar danos oxidativos (COHEN et al., 2002). Estes danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com doenças incluindo câncer, doenças cardíacas, problemas renais, doenças degenerativas, aterosclerose e problemas pulmonares (AMES et al. 1993; WITZUM, 1994; ROY e KULKARNI, 1996; BIANCHI e ANTUNES, 1999). Os radicais livres são conhecidos por ligarem-se covalentemente a macromoléculas teciduais vitais como proteínas e DNA, sendo que os danos provocados ao DNA têm papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (AMES et al., 1993; ROY e KULKARNI, 1996; BIANCHI e ANTUNES, 1999).

O dano ao DNA induzido por espécies reativas de oxigênio (ERO) pode levar a eventos mutacionais significativos como danos na replicação do DNA, aneuploidias, deleções, translocações cromossômicas e ampliações de genes, podendo estes danos causar proliferação descontrolada e transformação maligna (HOEIJMAKERS, 2001; BARTKOVA et al., 2005; GORGOULIS et al., 2005; BONNER et al., 2008; GIUNTA & JACKSON, 2011; GRUOSSO et al., 2016). Entretanto, as células têm sistemas eficientes para manter a sua integridade genômica que respondem a danos no DNA através da detecção e reparação dos mesmos, parada do ciclo celular transitória e morte celular em caso graves, com a finalidade de restabelecer a homeostase celular (KHANNA & JACKSON, 2001; CICIJA & ELLEDGE, 2010; LUKAS et al., 2011; POLO & JACKSON, 2011; GRUOSSO et al., 2016). Sendo assim, problemas relacionados a estes sistemas de respostas a danos no DNA não só comprometem a integridade genômica em células normais, favorecendo tumorigênese, mas também modulam a sensibilidade ao tratamento (BOUWMAN & JONKERS, 2012; CURTIN, 2012; GRUOSSO et al., 2016).

A geração de ERO pode estar relacionada a fatores endógenos (metabolismo mitocondrial, os peroxissomos e as células inflamatórias) ou a fatores ambientais (radiação, ozônio e xenobióticos). Em condições fisiológicas existe um sistema de defesa que conta com antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathionaperoxidase) e não enzimáticos (vitaminas, glutathiona e flavonoides). Em determinadas situações clínicas ocorre um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a defesa (Figura 1; SILVA e JOSIULIONIS, 2014).

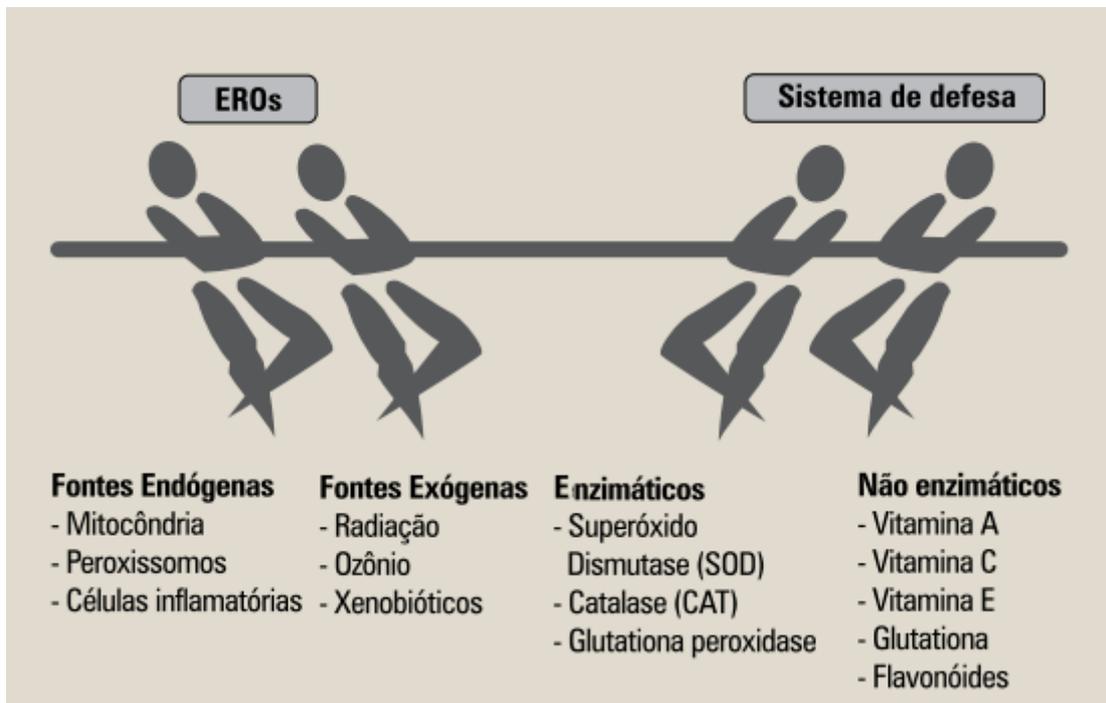


Figura 1: Equilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante. O sistema de defesa conta com antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase) e não enzimáticos (vitaminas, glutatona, flavonoides). Entre as fontes endógenas de espécies reativas estão a mitocôndria, os peroxissomos e as células inflamatórias. Fatores ambientais como radiação, ozônio e xenobióticos também são fonte de espécies reativas (Adaptado de SILVA e JOSIULIONIS, 2014).

Antioxidantes são possíveis agentes protetores ao corpo humano, devido sua capacidade de reduzir o dano oxidativo provocado pelos radicais livres, além de retardar o progresso do câncer (KINSELLA et al., 1993; TADHANI et al., 2007). Antioxidantes naturais podem modificar o comportamento de células cancerígenas pois alteram o ambiente redox tão bem quanto reduzem a instabilidade genética, podendo ser considerados úteis no tratamento (SCHAFER E BUETTNER, 2001).

Os antioxidantes são capazes de atuar através de dois mecanismos, dos quais um impossibilita a iniciação das reações oxidativas, enquanto que o segundo elimina radicais importantes à etapa de propagação destas reações em cadeia (NAMIKI, 1990; SIMIC E JAVANOVIC, 1994; SOARES 2002). Os antioxidantes fenólicos agem tanto na etapa de iniciação quanto de propagação do processo oxidativo, pois funcionam como sequestradores de radicais, sendo os produtos intermediários formados pela reação destes antioxidantes relativamente estáveis devido a ressonância do anel aromático característico destas substâncias (NAWAR, 1985;

SHAHIDI et al., 1992; SOARES 2002). Apesar destes compostos fenólicos e alguns de seus derivados serem eficazes na prevenção de oxidação lipídica o uso em alimentos é pouco permitido devido a sua toxicidade (SHAHIDI ET AL., 1992; SOARES, 2002).

Algumas espécies vegetais com alegação de uso para o tratamento do câncer e de tumores são ricas em flavonoides, dentre estas destacam espécies de *Annona* (BORGES, 2010; CHAVES et al., 2011; MELO et al., 2013). A família *Annonaceae* possui cerca de 130 gêneros e 2.300 espécies (ARAYA, 2004), sendo a maioria, constituída de arbustos e pequenas árvores, das quais, cerca de 119 espécies são descritas para o gênero *Annona* (LEBOEUF et al., 1982). No Brasil, a família *Annonaceae* compreende 26 gêneros e aproximadamente 260 espécies (MAAS et al., 2012).

Alguns flavonoides como kaempferol-3-O-galactosídeo, kaempferol-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-arabinosídeo e quercetina-3-O-arabinosil-galactosídeo, quercetina, isoramnetina, kaempferol e luteolina já foram isolados a partir de extratos de diferentes espécies de *Annona* (SANTOS E SALATINO, 2000). Espécies de *Annona* possuem diferentes tipos de flavonoides, no entanto, estudos que avaliem a capacidade antioxidante, bem como sua relação com a proteção do dano ao DNA e apoptose precisam ser avaliadas.

Extratos obtidos de diferentes espécies de *Annona* apresentaram atividade antitumoral (MESQUITA et al., 2009; ASARE et al., 2015; FORMAGIO et al., 2015).

A atividade antitumoral da *A. asiatica* e de *A. atemoya* foi relacionada às acetogeninas (CHAO-MING et al., 1997; DURET et al., 1998). Várias acetogeninas mostraram-se mais potentes que o taxol, fármaco antineoplásico extraído de *Taxus cuspidata* (CHAO-MING et al. 1997). Gallardo e colaboradores (1998) demonstraram que as acetogeninas possuem potente atividade citotóxica e é um dos mais potentes inibidores do complexo mitocondrial. Outros compostos presentes nos extratos de *A. glabra* apresentam habilidade de inibir a glicoproteína-P e já são utilizadas contra a multirresistência do câncer aos diversos fármacos (LIU et al. 1999).

A avaliação da citotoxicidade e atividade antioxidante em linhagem celular de hepatoma humana do flavonoide quercetina, isoquercetina e rutina mostrou que indução de apoptose pela quercetina está associada ao aumento da produção das proteínas p53 e p21, resultando no acúmulo de células na fase G₂/M do ciclo celular, e ainda o tratamento com estes flavonoides aciona a produção de ERO, sugerindo

que esta produção é um importante mecanismo que pode contribuir com a citotoxicidade dos flavonoides em células tumorais (LI et al., 2014). Outros estudos relatam que a quercetina, rutina e extratos vegetais ricos em polifenóis reduz o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e a morte celular (CARRASCO-POZO et al., 2010).

Nesse sentido, novos estudos que direcionem-se sobre a segurança e eficácia da utilização de espécies vegetais para o tratamento de câncer são imprescindíveis para o favorecimento da formulação de novos produtos que venham contribuir para a promoção da saúde.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

O câncer é caracterizado por um conjunto de mais de 100 doenças diferentes, definido pelo crescimento desordenado de células, pouca diferenciação celular e com potencial invasivo. A origem da doença é multifatorial e estes fatores podem atuar em conjunto ou em sequência para iniciar a carcinogênese (INCA, 2014).

O processo de carcinogênese, em geral, é lento podendo levar vários anos e as células passam por vários estágios antes de chegar ao tumor. Estes estágios são: 1º estágio de iniciação, onde o carcinógeno provoca modificações em alguns genes, entretanto não é possível detectar o tumor clinicamente; 2º estágio de promoção, sendo observada a oncopromoção, isto é, as células são transformadas em células malignas de forma lenta e gradual; 3º estágio de progressão, nesta etapa o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das manifestações clínicas (ALMEIDA et al., 2005). Infelizmente, o diagnóstico é feito no 3º estágio, e algumas vezes em estágio avançado da doença, reduzindo a probabilidade de cura.

Estimativas feitas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostraram que as mortes ocasionadas por câncer tem sido crescentes em todo o mundo (INCA, 2014). Em 2050, são estimados 27 milhões de novos casos e 17,5 milhões de mortes pelo câncer em todo o mundo.

No Brasil estimam-se, em 2016, 57.960 novos casos de câncer de mama no Brasil, sendo este tumor o 2º mais incidente na Região Norte (INCA¹, 2015). Corresponde a 25% dos novos casos a cada ano no Brasil e no mundo entre as mulheres, podendo também acometer homens, no entanto, é mais raro neste grupo, representando apenas 1% do total de casos da doença. A incidência maior deste tipo de carcinoma é em mulheres após os 50 anos e apesar de existirem quadros da doença com rápida evolução, no geral o prognóstico da doença é bem positivo.

A prevenção do câncer de mama não é totalmente possível devido a multiplicidade de fatores envolvidos ao surgimento da doença e ainda ao fato de vários destes fatores não serem modificáveis, como fatores endócrinos devido o estímulo estrogênico devido menarca precoce (anterior aos 12 anos) ou menopausa tardia (após os 55 anos), e ainda fatores genéticos devido a presença de mutações principalmente nos genes BRCA1 e BRCA2 (ADAMI et al., 2008). Estima-se que por

meio de alimentação, nutrição e atividades físicas, seja possível reduzir em até 28% o risco de a mulher desenvolver câncer de mama (INCA², 2015).

As opções terapêuticas do câncer de mama incluem cirurgia do tumor primário, avaliação do acometimento axilar e radioterapia como forma de tratamento local e o tratamento medicamentoso sistêmico (quimioterapia). O tratamento sistêmico pode ser prévio (neoadjuvante) ou adjuvante (após a cirurgia e radioterapia). As modalidades terapêuticas combinadas podem ter intento curativo ou paliativo, sendo que todas elas podem ser usadas isoladamente com o intuito paliativo (BRASIL, 2014).

Os esquemas de quimioterapia variam de acordo com o risco de recidiva do tumor, idade e fatores hormonais do paciente. Pacientes no período pré-menopausa com baixo risco de recidiva dispõem da terapia com tamoxifeno, e em casos individuais ciclos de doxorubicina associada a ciclofosfamida (AC), ou docetaxel mais ciclofosfamida (TC). Nos casos de risco intermediário podem usar tamoxifeno, AC ou 5-fluorouracila associada a doxorubicina e à ciclofosfamida (FAC) ou 5-fluorouracila em conjunto com epirrubina e ciclofosfamida (FEC) ou TC seguindo diferentes ciclos e períodos, podendo associar ainda docetaxel ou paclitaxel. Os casos de alto risco dispõem das terapias com FAC ou FEC, AC associados a docetaxel ou paclitaxel por períodos e ciclos diferenciados; concomitante à quimioterapia com docetaxel ou vinorelbina é utilizado trastuzumabe como profilaxia pós-cirúrgica; terapia estendida com tamoxifeno.

Paciente no período pós-menopausa com baixo risco de recidiva podem fazer uso de tamoxifeno ou inibidor da aromatase, e em casos individuais podem ser selecionados para quimioterapia com AC, TC ou CMF; Nos casos de risco Intermediário são utilizados tamoxifeno ou inibidor da aromatase; AC, FAC, FEC, TC ou AC em diferentes ciclos e períodos, seguido ciclos de docetaxel diariamente ou paclitaxel semanalmente.

A quimioterapia para pacientes com alto risco de recidiva incluem FAC ou FEC por 6 ciclos ou AC por 4 ciclos seguido por 4 ciclos de docetaxel a cada 21 dias ou paclitaxel semanal por 12 ciclos; ou FEC por 3 ciclos seguido por 3 ciclos de 100 mg/m² a cada 21 dias ou paclitaxel semanal por 8 ciclos; trastuzumabe como adjuvante na profilaxia pós cirúrgica; tamoxifeno ou inibidor de aromatase (Quadro 1) (BRASIL, 2014).

Quadro 1. Esquemas quimioterápicos sugeridos de tratamento de acordo com risco.

RISCO/STATUS HORMONAL	PRÉ-MENOPAUSA	PÓS-MENOPAUSA
Baixo Risco	Tamoxifeno - se RH positivo – por 5 anos. Casos individuais podem ser selecionados para quimioterapia: AC por 4 ciclos, TC por 4 ciclos ou CMF por 6 ciclos.	Tamoxifeno ou inibidor da aromatase upfront*, ou switch** - se RH positivo. Casos individuais podem ser selecionados para quimioterapia: AC por 4 ciclos, TC por 4 ciclos ou CMF por 6 ciclos.
Risco Intermediário	Tamoxifeno se RH positivo – por 5 anos. AC ou FAC ou FEC ou TC ou AC por 4 ciclos seguido por 4 ciclos de docetaxel 100mg/m ² a cada 21 dias ou paclitaxel 80mg/m ² semanal por 12 ciclos; ou FEC por 3 ciclos seguido por 3 ciclos de docetaxel 100mg/m ² a cada 21 dias ou paclitaxel 80mg/m ² semanal por 8 ciclos.	Tamoxifeno ou inibidor da aromatase upfront* ou switch** - se RH positivo. AC ou FAC ou FEC. ou TC ou AC por 4 ciclos seguido por 4 ciclos de docetaxel 100mg/m ² a cada 21 dias ou paclitaxel 80mg/m ² semanal por 12 ciclos; ou FEC por 3 ciclos seguido por 3 ciclos de docetaxel 100mg/m ² a cada 21 dias ou paclitaxel 80mg/m ² semanal por 8 ciclos.
Alto Risco	FAC ou FEC por 6 ciclos ou AC por 4 ciclos seguido por 4 ciclos de docetaxel 100mg/m ² a cada 21 dias ou paclitaxel 80mg/m ² semanal por 12 ciclos; ou FEC por 3 ciclos seguido por 3 ciclos de docetaxel 100mg/m ² a cada 21 dias ou paclitaxel 80mg/m ² semanal por 8 ciclos; Se HER-2 positivo adicionar trastuzumabe. *** Se RH positivo – tamoxifeno por 5 anos, caso paciente em pós-menopausa. Ao fim deste período, considerar 5 anos de inibidor de aromatase como adjuvância estendida. Caso em pré-menopausa, considerar terapia estendida com TMX.	FAC ou FEC por 6 ciclos ou AC por 4 ciclos seguido por 4 ciclos de docetaxel 100mg/m ² a cada 21 dias ou paclitaxel 80mg/m ² semanal por 12 ciclos; ou FEC por 3 ciclos seguido por 3 ciclos de docetaxel 100mg/m ² a cada 21 dias ou paclitaxel 80mg/m ² semanal por 8 ciclos; Se HER-2 positivo adicionar trastuzumabe. *** Se RH positivo – tamoxifeno ou inibidor de aromatase upfront, ou switch.

Esquemas quimioterápicos: AC–doxorubicina 60mg/m² mais ciclofosfamida 600mg/m²; FAC– 5-fluorouracila 500mg/m² mais doxorubicina 50mg/m² mais ciclofosfamida 500mg/m²; FEC – 5-fluorouracila 500mg/m² mais epirrubicina 100 mg/m² mais ciclofosfamida 500mg/m²; TC – docetaxel 75 mg/m² mais ciclofosfamida 600 mg/m²;

* Iniciar hormonioterapia com um inibidor de aromatase por cinco anos.

** Iniciar hormonioterapia com um inibidor de aromatase ou com o tamoxifeno por dois ou três anos e depois trocar pelo tamoxifeno ou por um inibidor de aromatase, respectivamente, até completar cinco anos.

*** ADJUVANTE (profilática, pós-operatória): Esquema abreviado (concomitante à quimioterapia com docetaxel ou vinorelbina): dose inicial de 4 mg/Kg, IV, em 1 hora e doses subsequentes de 2 mg//Kg, IV, em 30 minutos, semanalmente durante 8 semanas, total de 9 semanas de tratamento. Esquema estendido de 26 semanas (início concomitante à quimioterapia com taxano): dose inicial de 8 mg/Kg, IV, em 1 hora e 8 doses subsequentes de 6 mg//Kg, IV, em 30 minutos, a cada 3 semanas. Esquema estendido de 52 semanas (12 meses): dose Inicial de 8 mg/ Kg, IV, em 1 hora e 16 doses subsequentes de 6 mg//Kg, IV, em 30 minutos, a cada 3 semanas. PRÉVIA (neoadjuvante ou citorrredutora, préoperatória - início concomitante à quimioterapia com antraciclina ou taxano): dose Inicial de 4 mg/Kg, IV, em 1 hora e 23 doses subsequentes de 2 mg/Kg, IV, em 30 minutos, semanalmente. Note-se que a quimioterapia adjuvante com trastuzumabe do carcinoma de mama HER-2 positivo pode ser classificada como poliquimioterapia (quimioterapia com trastuzumabe) e monoquimioterapia (uso exclusivo de trastuzumabe após a poliquimioterapia com trastuzumabe).

Estes tratamentos convencionais possuem algumas desvantagens como a alta toxicidade e, em muitos casos, apenas prolonga em alguns anos a expectativa de vida do paciente. A maior falha da quimioterapia antineoplásica é devida à resistência aos fármacos. Esta resistência ocorre porque as populações celulares desenvolvem nova codificação genética (mutação) que lhes permite enveredar por vias metabólicas alternativas, através da síntese de novas enzimas, entre outros. É também observada resistência nos casos em que o tratamento é descontinuado, quando a população tumoral é ainda sensível aos fármacos, em que a quimioterapia é aplicada a intervalos irregulares e em que doses inadequadas são administradas (REDDY et al., 2003). Variados cânceres que apresentam tumores sólidos, incluindo os cânceres de mama, ovário, pulmão e baixo trato gastrintestinal desenvolvem mecanismos de resistência a multidrogas (DISEASES, 2000).

Plantas são consideradas importantes fontes para a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas. A utilização de plantas como o *Catharanthus roseus* e *Taxus brevifolia* para o tratamento do câncer é descrito ao longo da história, e a partir disso, as plantas foram utilizadas como recursos primário para a produção de medicamentos tradicionais eficazes contra o câncer, sendo que mais da metade das drogas usadas para o tratamento do câncer são derivados de produtos naturais como plantas, microrganismos e espécies marinhas (CRAGG et al., 2005; SEWELL et al., 2014). E ainda, muitas plantas medicinais apresentam atividade antioxidante e tem mostrado resultados promissores na prevenção e terapia do câncer, reduzindo o risco de doenças potencialmente fatais, além de inibir complicações induzidas por agentes tóxicos (HEIDARIAN et al., 2013).

Diante disso, a necessidade de estudar novas substâncias com potencial uso para o tratamento do câncer se torna fundamental, visto que além de buscar combater a resistência das células tumorais às quimioterapias já existentes, ainda há necessidade de buscar alternativas terapêuticas menos tóxicas, contribuindo para maior adesão ao tratamento e conforto do paciente. Os flavonoides são metabólitos de origem vegetal com crescente interesse dos pesquisadores, uma vez que apresentam em sua estrutura química um variável número de grupos com capacidade antioxidante com grande importância científica e terapêutica (SCALBERT et al., 2005).

2.2 Família *Annonaceae* e o gênero *Annona*

A família *Annonaceae* possui cerca de 130 gêneros e 2.300 espécies (ARAYA, 2004), sendo a maioria, constituída de arbustos e pequenas árvores, das quais, cerca de 119 espécies são descritas para o gênero *Annona* (LEBOEUF et al., 1982). No Brasil, a família *Annonaceae* compreende 26 gêneros e aproximadamente 260 espécies (MAAS et al., 2012).

As espécies dessa família são utilizadas para diversas finalidades medicinais, tais quais: tratamento dermatológico, como exemplo edema e emoliente (MACEDO E FERREIRA, 2004), gastrite (VASQUEZ et al., 2014), reumatismo, diarreia crônica, anti-inflamatório (RODRIGUES E CARVALHO, 2001), diabetes (BOSCOLO E VALLE, 2008), hiperlipidemia (SILVA et al., 2010), anticancerígeno (COCHRANE et al., 2008), emagrecedor, anti-helmíntico (LIPORACII E SIMÃO, 2013), calmante, problemas renais (SOUZA E FELFILI, 2006) e doenças associadas ao aparelho circulatório (MONTELES E PINHEIRO, 2007).

Quimicamente é uma das famílias de plantas tropicais menos estudadas. Entretanto, investigações fitoquímicas e, em menor extensão, farmacológicas vêm se intensificando nos últimos anos (MAAS et al., 2012). Várias classes de metabólitos secundários já foram isolados da família *Annonaceae*, como: alcaloides (LEBOEUF et al., 1982; TEMPONE et al., 2005; PRADO et al., 2008), acetogeninas (BRINGMANN et al., 1999; BERMEJO et al., 2005; YANG et al., 2009), flavonoides (LEBOEUF et al., 1982; PRADO et al., 2008) e diterpenos (LEBOEUF et al., 1982; FOURNIER et al., 1999).

Na família *Annonaceae* podem ser encontrados entre os alcaloides, os tipos quinolínicos, pirrolizidínicos, piperidínicos, indolizidínicos, piridínicos e isoquinolínico (SIMÕES E SCHENKEL, 2004). O mais encontrado é o alcaloide oxoaporfínico liriodenina (Figura 2-A) (SANTOS et al., 2003), enquanto que os de ocorrência menos comum são os alcaloides β -carbolínicos (Figura 2-B) (WANG et al., 2002).

Os flavonoides são os compostos fenólicos de maior ocorrência na família *Annonaceae* (SIMÕES E SCHENKEL, 2004), tais como: O-glicosídeos de apigenina, kaempferol, quercetina, e luteolina (Figura 2-C, D, E, F, respectivamente) (SANTOS E SALATINO, 2000). Entre os esteroides, os dois de ocorrência muito comum em *Annonaceae* são o β -sitosterol e o estigmasterol (8) (Figura 2-G, H) (LEBOEUF et al., 1982).

Bermejo e colaboradores (2005) descreveram em seu trabalho que já foram isoladas 417 acetogeninas na família *Annonaceae*, sendo que 176 foram relatadas no período de 1998 a 2004 e a predominância dos compostos descritos era para espécies de *Annona*. A primeira acetogenina de *Annonaceae*, a uvaricina (Figura 2-I), foi isolada das raízes de *Uvaria acuminata* (JOLAD et al., 1982).

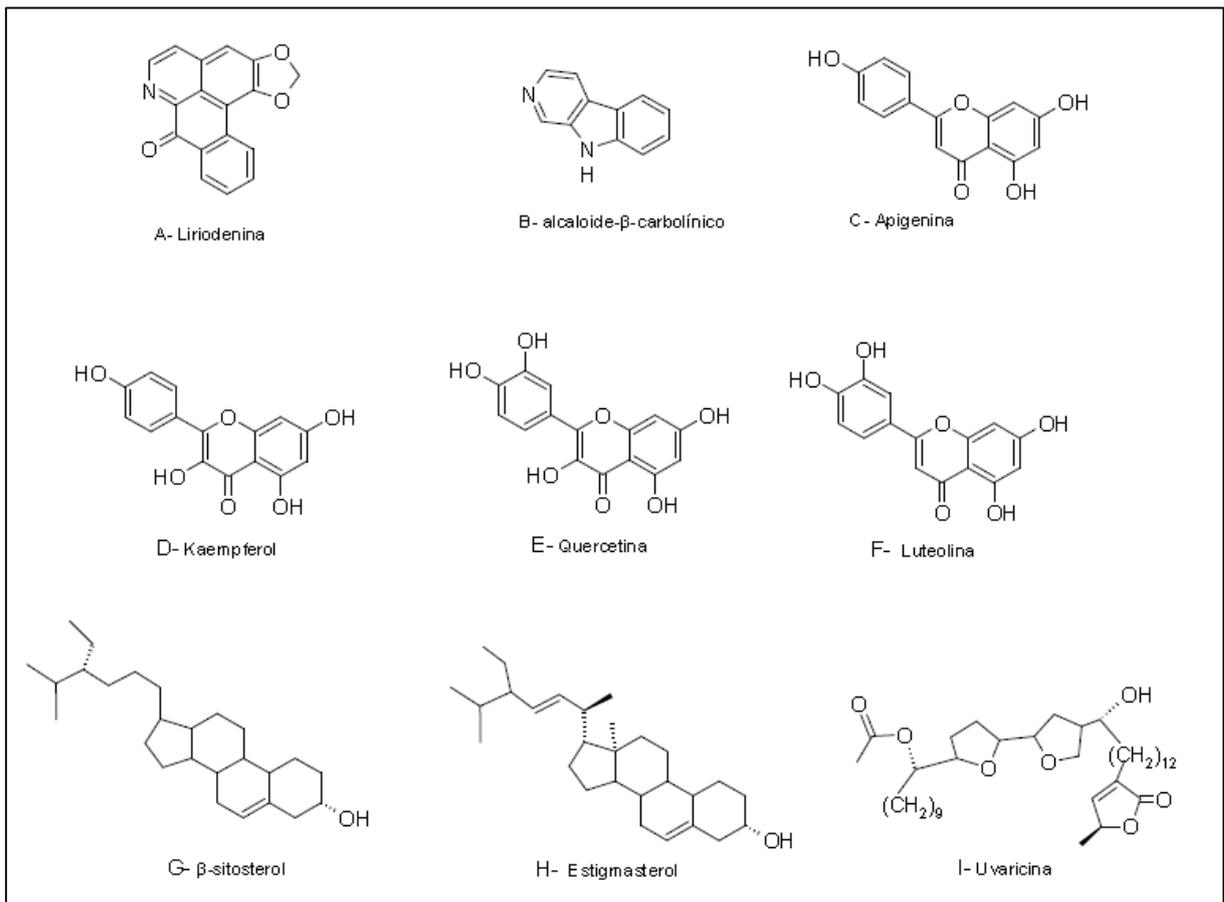


Figura 2: Metabólitos secundários encontrados na família *Annonaceae*.

O uso medicinal de espécies do gênero *Annona* é muito variável, como é o caso da infusão das folhas da *A. muricata* que é usada para o câncer, para emagrecer, falta de ar e também para diabetes; já a *A. squamosa* é utilizada para anemia e verminoses (LIPORACII E SIMÃO, 2013). Entretanto, ambas demonstraram atividade antimicrobiana e antileishmania em estudos anteriores (VIEIRA, 2002; RABELO et al., 2014).

Vários estudos têm demonstrado grande quantidade de compostos de natureza química diversificada nas mais variadas partes da planta deste gênero. Os principais

grupos de compostos químicos presentes em extratos preparados de cascas (CHEN et al., 2000), folhas e frutos (CHANG et al., 1998) de *A. glabra* são: os alcaloides, flavonoides, as acetogeninas e os diterpenos (OLIVEIRA et al., 2002; CHEN et al., 2004). Os monoterpenos, canfôra e borneol (Figura 3-A e B), foram encontrados em raízes e casca de *A. squamosa* (LEBOEUF, 1982).

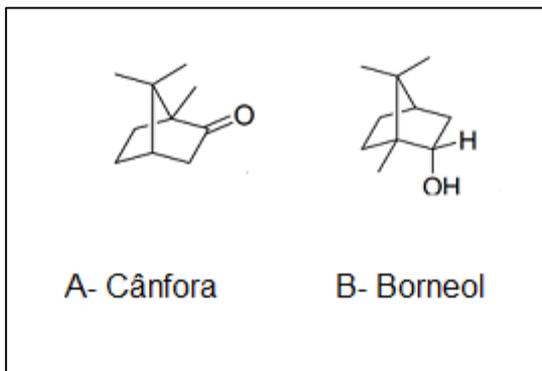


Figura 3: Monoterpenos isolados de *Annona squamosa*.

Lima e colaboradores (2010), utilizando extrato etanólico das folhas de *A. cornifolia* obteve a fração Hexânica, que após fracionamento em coluna cromatográfica utilizando como eluentes solventes com polaridades crescentes, obteve sete acetogeninas, puras ou em misturas: hidroxifolianina, esquamocina, folianina A, folianina B, 4-desoxilongimicina B, annonfolina e esquamocina M (Figura 4-A, B, C, D, E, F e G). No estudo de Pimenta (2003) o extrato de éter de petróleo obtido das sementes de *A. crassiflora* foi fracionado através de partição entre metanol e hexano, e em seguida a fração metanólica foi fracionada em coluna de sílica gel e eluída com solventes de polaridades crescentes, sendo isoladas as acetogeninas: crassiflorina (Figura 4-H), desoxicrassiflorina (Figura 5-A). No mesmo estudo, a acetogenina araticulina foi isolada do extrato etanólico das sementes de *A. crassiflora* submetido a coluna cromatográfica aberta com sílica gel seguida de lavagem com tampão de pH 4.

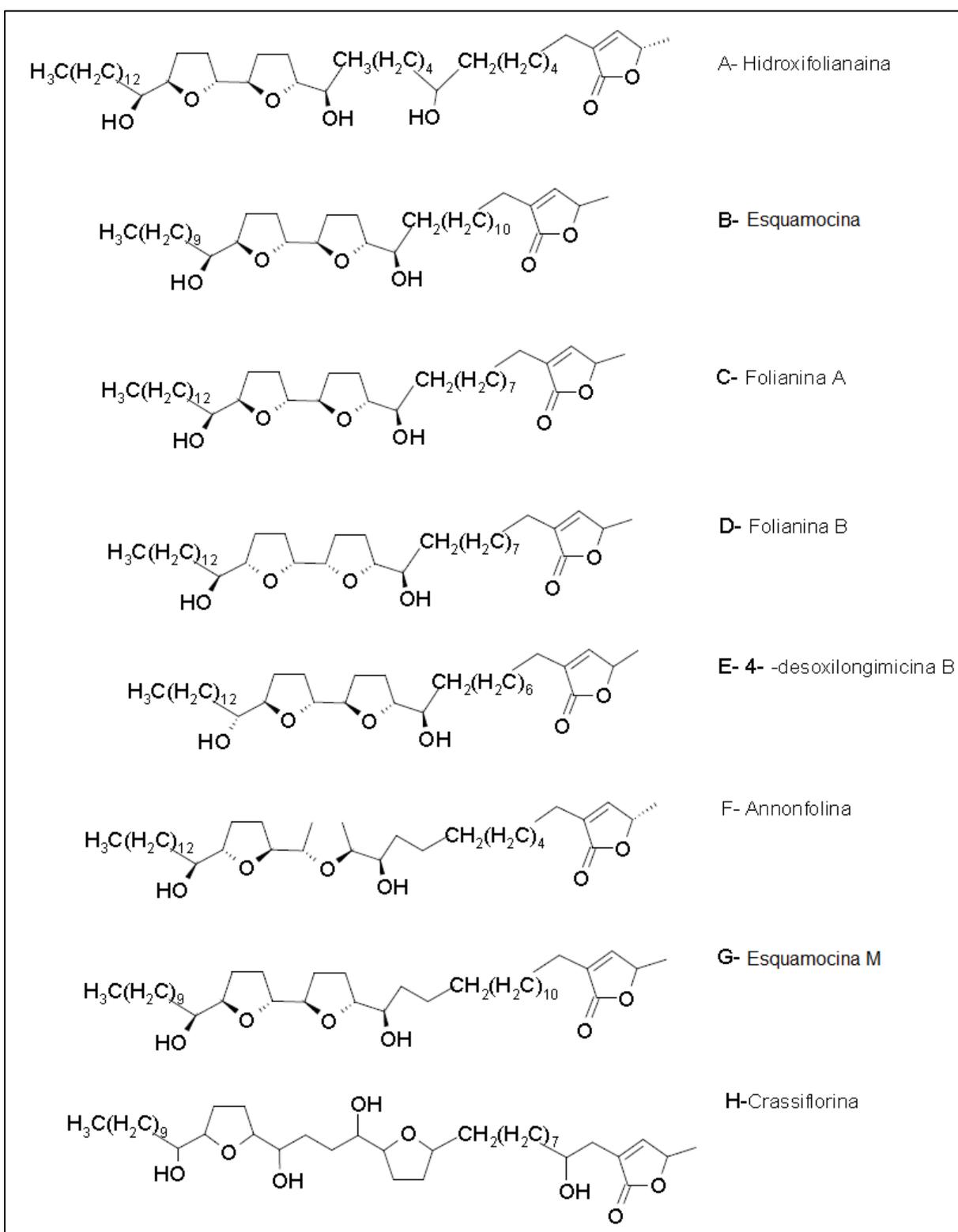


Figura 4: Acetogeninas obtidas de *Annona cornifolia*.

O extrato etanólico obtido das sementes de *A. muricata* foi submetido a partição com diclorometano e água (1:1), sendo isolada a partir da fração solúvel em diclorometano as seguintes acetogeninas: annonacina, annonacina-10-ona e

goniotalamicina. Estas foram submetidas à avaliação da atividade antitumoral nas linhagens tumorais humanas: A-549 (carcinoma de pulmão), MCF-7 (carcinoma mamário) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon). O método utilizado foi de inibição de tumor em discos de batata induzido por *Agrobacterium tumefaciens*, no qual observou-se que todas as acetogeninas avaliadas apresentaram atividade significativa contra as células de tumores sólidos humanos testados, no entanto, a acetogenina annonacina apresentou-se muito mais potente em relação à linhagem HT-29, apresentando uma CI_{50} de $1,0 \times 10^{-8} \mu\text{g/mL}$ (RIESER et al., 1996).

A acetogenina, bullatacina (Figura 5-D), isolada de *A. muricata*, inibiu o crescimento de adenocarcinoma mamário resistente ao fármaco adriamicina (M17/Adr) através do ensaio de inibição de formação de colônia em soft agar por difusão em disco. Quando se observa a concentração inibitória mínima da bullatacina (0,25 $\mu\text{g/disco}$) percebe-se que esta mostrou-se muito mais eficaz na inibição de células de adenocarcinoma mamário em relação ao controle positivo adriamicina. Ainda, a bullatacina mostrou-se menos inibitória que o controle positivo em relação à linhagem não cancerígena de células epiteliais, sugerindo maior seletividade da acetogenina bullatacina para a linhagem tumoral M17/Adr. (OBERLIES et al., 1997).

O extrato de éter de petróleo das sementes de *A. squamosa* foi particionado, formando as frações aquosa e diclorometano, as quais exibiram potente atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais de mama (MCF-7) e leucemia (K-562). O extrato e frações foram submetidos aos ensaios de quantificação de apoptose utilizando Anexina V por citometria de fluxo, além de estimulação intracelular de espécies reativas de oxigênio, verificando-se um efeito de indução da morte celular (apoptose) dessas células (PARDHASARADHI et al., 2005).

Dentre os metabólitos secundários já encontrados ou detectados em *Annonaceae*, alguns demonstraram também atividade antioxidante, destacando-se os flavonoides e as acetogeninas. As acetogeninas hidroxifolianina, esquamocina, folianina A, folianina B, 4-desoxilongimicina B, annonfolina, esquamocina M (Figura 4-A, B, C, D, E, F e G), isolongimicina B, bulatacina, asimicina, annotacina e cornifolina (Figura 5-C, D, E, F e G) foram submetidas à atividade antioxidante frente ao radical orgânico 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e todas apresentaram resultado positivo (LIMA et al., 2010). Flavonoides como quercetina, kaempferol (Figura 2-A e B) e seus derivados C- ou O- glicosídeos demonstraram atividade antioxidante utilizando dois métodos, frente ao radical DPPH e ao β - caroteno (ALVES et al., 2007).

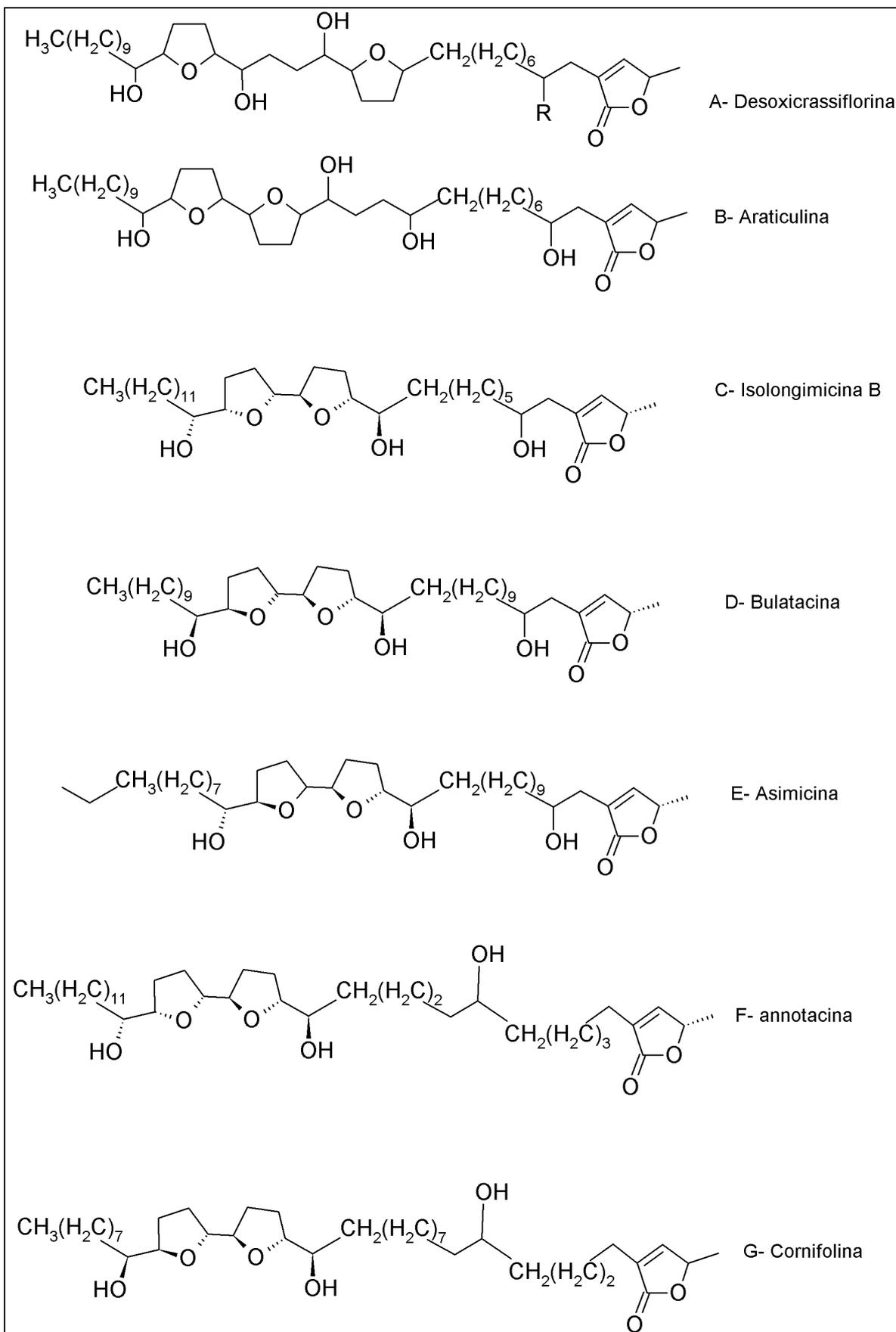


Figura 5: Flavonoides e acetogeninas com atividade antioxidantes encontrados na família *Annonaceae*.

2.2.1 *Annona glabra* L.

A *Annona* pode ser encontrada em locais alagadiços das regiões tropicais e subtropicais, tendo ocorrência na América do Norte, América Central, América do Sul e Oeste da América. No Brasil, esta espécie ocorre em todo o território, principalmente em regiões costeiras (Figura 6), ao longo das margens de lagos, pois necessitam de solos úmidos ou em regiões periodicamente ou permanentemente inundadas (CROAT, 1978).

A presença de raízes adventícias, aerênquima nas raízes e na base do caule, frutos flutuantes e sementes que se dispersam pela água são adaptações desta espécie a este tipo de ambiente (CROAT, 1978). Um espécime possui normalmente tronco único, porém as sementes germinam em grupo, dando aparência de moitas com vários caules (Figura 6) (SIEBRA, 2007).



Figura 6: Hábitat em que pode ser encontrada a espécie *A. glabra*
Fonte: Stephen Brown, (2013).

As flores, raramente observadas, porém muito atrativas, geralmente possuem dois a três cm de diâmetro, variando de amarelo pálido a creme, com três pétalas maiores externas encouraçadas e três pétalas pequenas internas (SIEBRA, 2007).

As folhas possuem de 7 a 12 cm de comprimento, pecíolo cilíndrico, lâmina oblonga, cartácea, base obtusa, ápice acuminado, margem plana, com nove a 13 pares de nervuras secundárias. A maturidade reprodutiva é atingida após aproximadamente dois anos, quando se inicia a floração e a produção de frutos (SIEBRA, 2007).

O fruto é esférico, com cerca de 5 a 15 cm de diâmetro, naturalmente verde. Após sua queda, torna-se amarelado, escurecendo em seguida. Contém pouco mais de 100 sementes, de aspecto semelhante aos da abóbora, com aproximadamente um centímetro de comprimento (SIEBRA, 2007).

No Brasil, a *A. glabra* é popularmente conhecida como araticum-do-brejo, araticum-bravo, araticum-da-lagoa, anona-lisa, entre outros; e em inglês, *pond apple*. (LORENZI et al., 2006). Popularmente a *A. glabra* é utilizada, principalmente, como fonte de madeira para carpintaria, caixotaria, ripas, mastros e remos de pequenas embarcações. As raízes são utilizadas como cortiça (FONSECA-KRUEL E PEIXOTO, 2004). Além disso, os frutos são comestíveis e utilizados, também, como maturativos, anti-helmínticos (LOBÃO et al., 2005), larvicida (MENDONÇA et al., 2005).

Essa espécie tem demonstrado conter grande quantidade de compostos de natureza química nas suas várias partes (OLIVEIRA et al., 2002; SIEBRA et al., 2009). Análises fitoquímicas desta espécie a partir de extratos preparados das cascas (CHEN et al., 2000), folhas e frutos (CHANG et al., 1998) revelaram a presença de várias classes de metabólitos secundários, tais como diterpenos, acetogeninas, esteroides, oxoaporfinas.

No estudo de Chen e colaboradores (2004) o extrato acetato de etila obtido das cascas de *A. glabra* foi fracionado por cromatografia líquida a vácuo em coluna aberta com sílica gel e eluída com mistura dos solventes hexano e acetato de etila com polaridades crescentes. Das 6 frações obtidas, apenas a fração de número 6 foi refracionada em coluna cromatográfica com sílica gel e eluída com hexano-acetato de etila 95:5, obtendo-se o ácido caurenico (Figura 7), ou ácido caur-*ent*-16-en-19-oico. Estudos realizados com o ácido caurenico demonstraram as seguintes atividades biológicas: relaxante da musculatura lisa vascular aórtica de ratos (TIRAPPELLI et al., 2004), analgésico (BLOCK et al., 1998), tripanosomicida (ALVES et al., 1995; VIEIRA

et al., 2002), inibição da replicação do vírus *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) em linfócitos (CHANG et al., 1998), agente citotóxico (COSTA-LOTUFO et al., 2002; ZHANG et al., 2004), agente anti-inflamatório (PAIVA et al. 2002) e antimicrobiano (PADMAJA et al. 1995; VELIKOVA et al., 2000).

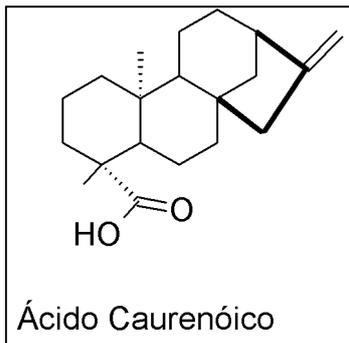


Figura 7: Estrutura química do ácido caurenóico.

No estudo de Liu e colaboradores (1999) as acetogeninas annoglaxina e 27-hidroxi-bullatacina (Figura 8-A e B) foram isoladas de uma fração metanólica obtida através do fracionamento do extrato etanólico das folhas de *A. glabra*. Esta fração foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica aberta com sílica gel e eluída usando gradientes de diclorometano e metanol. As subfrações resultantes da coluna foram então purificadas utilizando-se análises cromatográficas por CLAE. Para avaliação da atividade citotóxica do extrato, frações e substâncias isoladas utilizou-se o ensaio de toxicidade com *Artemia salina*, além do teste de viabilidade celular utilizando o MTT para as células das linhagens tumorais humanas A-549 (pulmão), MCF-7 (mama), HT-29 (côlon), A-498 (rim), PC-3 (próstata), e PACA-2 (pâncreas). Adriamicina foi utilizado como controle positivo. A fração metanólica apresentou-se mais ativa no ensaio com *Artemia salina* ($CI_{50}=0,15\mu\text{g/mL}$). A acetogenina 27-hidroxi-bullatacina (Figura 8-B) mostrou atividade comparável a adriamicina para os carcinomas de pulmão, mama e côlon. No entanto, esta mesma acetogenina mostrou ser mais potente e mais seletiva que a adriamicina sobre as linhagens de câncer de rim, próstata e pâncreas, sendo pelo menos 100.000 vezes mais potente.

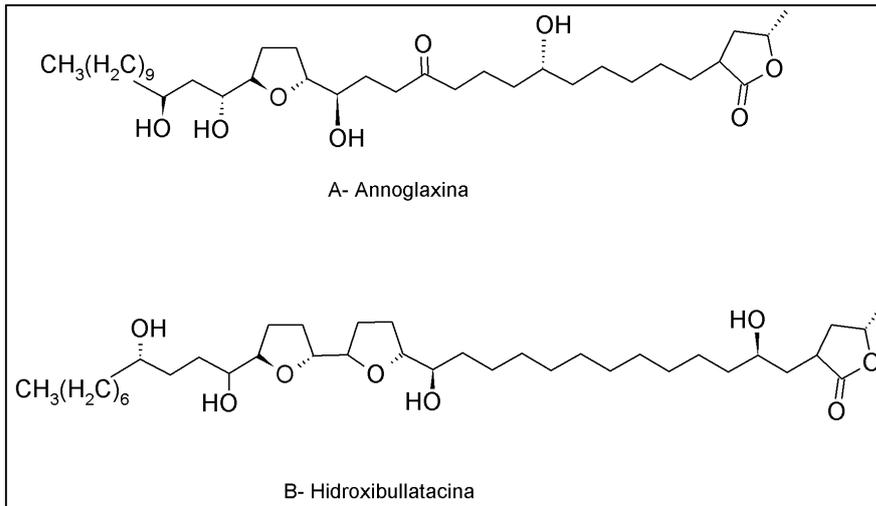


Figura 8. Acetoneginas isoladas de *A. glabra*.

Partindo-se do extrato hexânico das cascas do caule de *A. glabra* foi realizado o fracionamento do extrato em coluna cromatográfica aberta com sílica gel e eluída com hexano, benzeno e clorofórmio. A fração de hexano-benzeno após evaporação foi recristalizada com metanol, obtendo-se a substância ácido caurenóico (Figura 7). Este diterpeno isolado das cascas do caule de *A. glabra* apresentou diversas propriedades biológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica, inseticida, esporicida e citotóxica (PADMAJA et al., 1995).

No estudo de Zhang e colaboradores (2004) os diterpenos ácido cunabico e ácido *ent*-cauran-19-*al*-17-*oico* registraram atividade inibitória contra a linhagem tumoral humana de fígado (SMMC-7721), em que foram realizados os ensaios de viabilidade celular com MTT, ensaios de avaliação morfológica de apoptose por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que ácido cunabico e ácido *ent*-cauran-19-*al*-17-*oico* inibiram a proliferação das células SMMC-7721 nas concentrações $>5 \mu\text{mol/L}$ e $>10 \mu\text{mol/L}$, respectivamente. Os resultados ainda mostraram que as células tratadas com as substâncias isoladas apresentaram modificações morfológicas típicas de apoptose, como condensação de cromatina e redução de volume celular.

O extrato etanólico das cascas da *A. glabra* obtido utilizando o equipamento Soxhlet foi submetido a avaliação da atividade contra larvas de *Aedes aegypti*, utilizando-se técnica padronizada pela OMS. O extrato das cascas de *A. glabra* mostrou considerável atividade larvicida ($CI_{50}=27 \mu\text{g/L}$), confirmando o uso pela medicina tradicional devido sua alta atividade inseticida (MENDONÇA et al., 2005).

2.3 Teste para viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular é realizada através do ensaio colorimétrico com o sal de tetrazólio MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) em que a leitura é realizada em espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços. Neste teste o sal de tetrazólio MTT é reduzido nas mitocôndrias das células vivas em cristais de formazan, através da clivagem da enzima suClinato desidrogenase, exibindo coloração púrpura (Figura 9); estes cristais são extraídos das células através da adição de um solvente apropriado. O número de células viáveis é verificado através da quantidade de cristais formados (GALÚCIO, 2014).

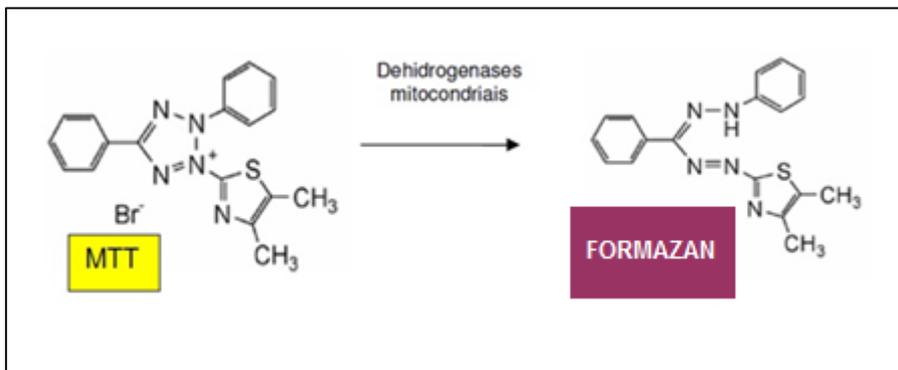


Figura 9: Redução do MTT por enzimas mitocondriais.
Fonte: GOMES, 2008.

A absorvância resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). A Absorvância de cada amostra em diferentes concentrações testada é lida e comparada com controle negativo de células (100% células viáveis), calculando-se o percentual de células viáveis em cada concentração da amostra analisada. A partir da análise do percentual de células viáveis em cada diluição das amostras em teste é possível calcular a concentração citotóxica 50% (CI_{50%}) que mata 50% das células (DAGUANO et al. 2007).

O ensaio MTT tem limitações como falta de linearidade frente a densidades celulares elevadas. Esta situação é corrigida mediante padronização da técnica de acordo com a linhagem celular a ser utilizada. Outra limitação está no fato de diferentes linhagens diferirem na capacidade de reduzir o corante; porém uma grande vantagem, as células mortas não podem interferir nos níveis de absorvância porque

apenas as células metabolicamente ativas podem reduzir o sal de tetrazólio ao seu produto formazan. Todavia, pode ocorrer redução do MTT em células em apoptose em estágios iniciais visto que as mitocôndrias permanecem intactas (LOTZE e THOMSON, 2005).

Apresenta como vantagens: simplicidade da técnica, o curto prazo de execução e é um ensaio reprodutível. Citado inclusive como teste adequado para o rastreo e modulação da resistência aos medicamentos em casos clínicos individualizados, em tratamento de tumores. Neste ensaio as celulares destes tumores são expostas a diferentes concentrações dos antitumorais, estabelecendo a concentração inibitória mínima. Pode-se inferir que é um excelente teste de triagem que norteia os demais ensaios de toxicidade (KEEPERS et al., 1991; SARGENT, 2003; LOTZE E THOMSON, 2005).

2.4 Métodos de Avaliação e Quantificação de populações celulares por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica bem estabelecida pela utilização de laser óptico que tem como função realizar a separação, a contagem individual de células, e detecção de biomarcadores em proteínas. A técnica por meio de um feixe, de laser incidentes, faz a medição da dispersão e da fluorescência do feixe de laser refletido, a partir da amostra de células (TEVA et al., 2009). Assim, fornece informações rápidas e precisas com a identificação de inúmeras características intrínsecas e extrínsecas contidas nas células, e reconhecer com precisão o tamanho, e a granulosidade, por meio da leitura da intensidade da fluorescência refletida em células previamente marcadas com anticorpos monoclonais fluorescentes (O'DONNELL et al., 2013).

A apoptose representa um processo ativo de remoção de células caracterizado morfológicamente pela condensação da cromatina, diminuição do citoplasma, formação de vesículas a partir da membrana e formação dos corpos apoptóticos, portanto, demanda ativação gênica, síntese proteica e ativação de endonucleases (COTTON et al., 1997).

A citometria de fluxo fornece análises mais precisas e reprodutíveis do processo de morte celular por apoptose, pois neste método a redução do volume celular e o aumento da granulosidade das células apoptóticas podem ser avaliados a

partir de modificações nos padrões FSC (*forward scatter*) e SSC (*side scatter*) de dispersão da luz, respectivamente (BROWN et al., 1993).

2.4.1 INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA (DETECÇÃO DE APOPTOSE)

A Anexina V é útil na detecção de células apoptóticas em decorrência de sua ligação com fosfolipídios negativamente carregados, como a fosfatidilserina (FS) exposta no início do processo apoptótico (KOOPMAN et al., 1994; VERMES et al., 1995; LEE et al., 2004). Ao conjugar-se a Anexina V ao corante Isotiocionato de Fluoresceína (FITC), é possível identificar e quantificar as células apoptóticas através da citometria de fluxo (Figura 10) (van ENGELAND et al., 1998).

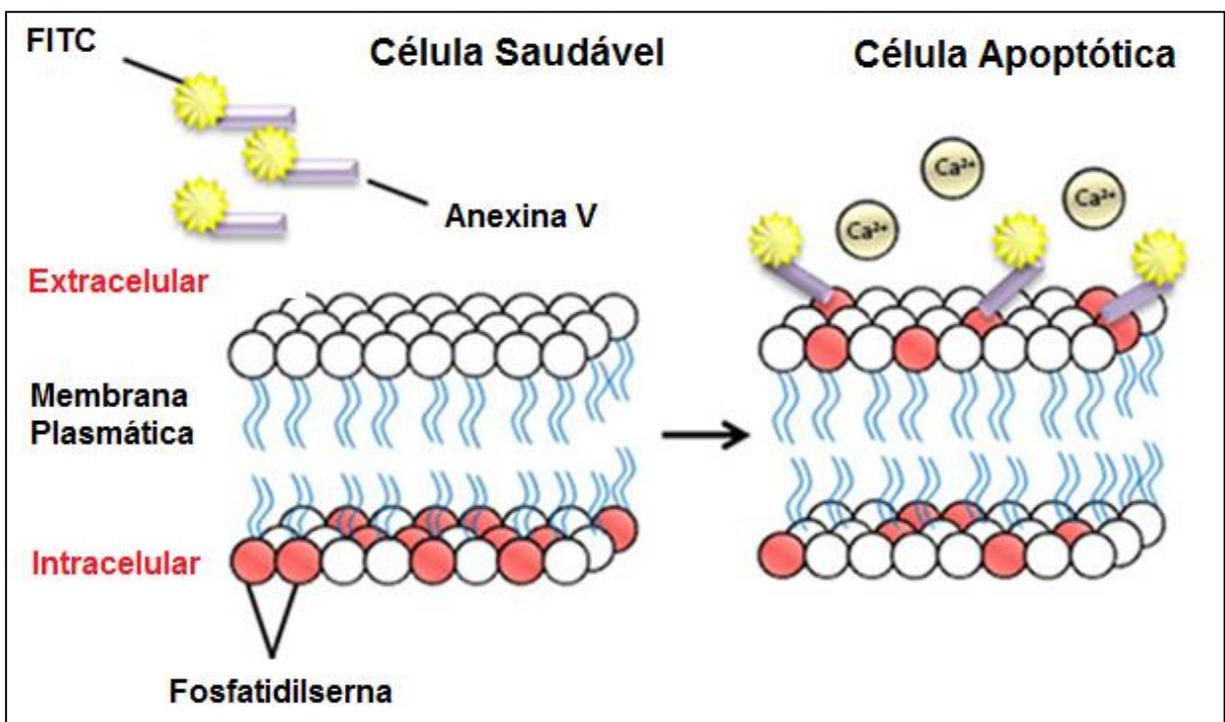


Figura 10: Ligação da anexina V aos resíduos de fosfatidilserina. (Adaptado de <http://www.taper.pt/website/wp-content/uploads/necrosis-apoptosis2.jpg>). Acesso em: 27 junho 2016.

Em células apoptóticas, a FS é translocada do interior da membrana plasmática para o exterior, desta forma expondo a FS para o ambiente externo. A Anexina V é

uma proteína que se liga a fosfolipídios em uma forma dependente de cálcio, com alta afinidade pela FS da membrana plasmática celular. A utilização concomitante do marcador nuclear Iodeto de propídeo (IP), que é um marcador de ácido nucleico que se intercala com o DNA celular, torna possível verificar alterações nucleares características dos estágios tardios de apoptose, pois marcadores de DNA de elevado peso molecular, como o IP, não penetram em células intactas ou que não apresentam alterações na permeabilidade da membrana, característico dos estágios finais de apoptose (WILLINGHAM, 1999).

Portanto, a utilização da citometria de fluxo associado ao marcador FITC Anexina V permite detectar células nos estágios iniciais de apoptose, enquanto que o IP permite determinar os estágios finais deste processo de morte celular por necrose (vanENGLAND et al., 1998; WILLINGHAM, 1999).

2.5 Determinação da Fragmentação de DNA

No ensaio para determinação de fragmentação de DNA, as células serão rompidas pelo tampão de lise expondo os núcleos. O IP se ligará ao DNA e as células contendo núcleos íntegros emitirão alta fluorescência. A condensação da cromatina e fragmentação de DNA podem ser observadas pela ocorrência de eventos com baixa fluorescência. Isto se deve a menor marcação do DNA com o IP devido a condensação da cromatina. Além disso, pedaços menores de DNA captam menos IP, emitindo menor fluorescência (YUAN et al., 2003).

2.6 Avaliação da atividade antioxidante

As plantas são fontes importantes para a busca de novas drogas, principalmente devido ao seu emprego na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer, sendo mais da metade dos medicamentos utilizados para o tratamento desta doença derivados de fontes naturais como plantas, microrganismos e espécies marinhas (CRAGG et al., 2005; SEWELL et al., 2014).

Entretanto, o mecanismo pelo qual estas drogas atuam nas células tumorais não são bem esclarecidos. Os radicais livres ou ERO, quando em excesso nos organismos, são apontados como os causadores de diversas doenças como câncer,

doenças cardiovasculares, catarata, diabetes mellitus tipo 1 e disfunções cerebrais (NASCIMENTO et al., 2011). A poderosa reatividade das ERO representa um impacto abrangente na saúde humana, pois danifica diversas moléculas nos sistemas biológicos, podendo iniciar a mutagênese, a carcinogênese, os distúrbios circulatórios, entre outras enfermidades que se desenvolvem com a idade (GUEDES, 2006).

Antioxidantes são substâncias que podem retardar ou inibir a oxidação de moléculas, pois atuam inibindo a reação em cadeia de oxidação, tendo papel importante como um fator de proteção dos organismos, e a maioria das plantas são boas fontes de antioxidantes (VELIOGLU et al., 1998; HEIDARIAN et al., 2013; ROOAHFIZA et al., 2013).

A atividade antioxidante dos derivados vegetais tem sido avaliada por diversos métodos, colorimétricos, biológicos e eletroquímico, dentre outros métodos. Entre os métodos colorimétricos destacam-se aqueles relacionados à capacidade dos antioxidantes de neutralizar o radical ABTS⁺ [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] ou DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).

2.6.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AO TROLOX (TEAC)

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺), que pode ser gerado através de uma reação eletroquímica ou enzimática, podendo-se medir a atividade antioxidante de compostos hidrossolúveis e lipossolúveis, através da medida por espectrofotometria da diminuição da formação do radical ABTS⁺ na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio (SILVA et al., 1999; KUSKOSKI et al., 2005; BORGES et al., 2011).

A reação do radical com espécies doadoras de hidrogênio, como compostos fenólicos, o converte em uma forma não colorida de ABTS⁺ (Figura 11). Assim, o grau de descoloração, que funciona como índice de inibição do radical ABTS⁺, determina o total da atividade antioxidante da amostra comparada a reatividade do Trolox, utilizado como padrão, sob as mesmas condições (FIGUEIRA et al., 2014).

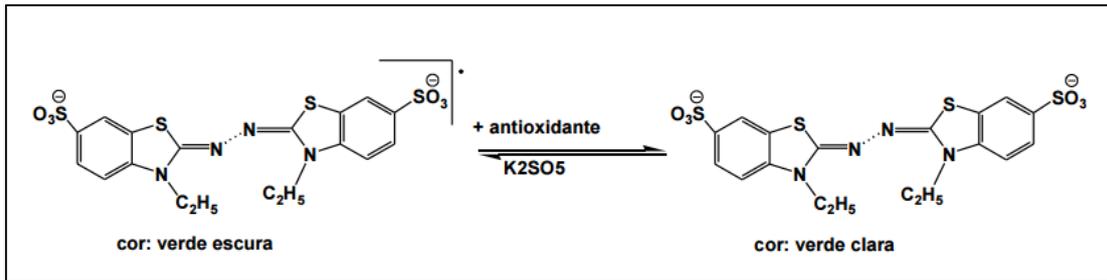


Figura 11: Estabilização do radical ABTS.+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptada de SOUSA et al, 2007.

2.6.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ACORDO COM A REDUÇÃO DO RADICAL DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

O teste DPPH é um dos métodos indiretos mais antigos para se determinar a atividade antioxidante sendo sugerido inicialmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em matérias naturais, e mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos, não exigindo para isso condições drásticas de temperatura e oxigenação (SILVA et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2011).

O método de DPPH é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos (SOUSA et al., 2007), fenilpropanóides, fenólicos totais, flavonóis (LEJA et al., 2007), cumarinas (VOGEL et al., 2005), quitosana com diferentes pesos moleculares (KIM; THOMAS, 2006), antocianinas, antocianidinas (LEJA et al., 2007; LIMA et al., 2007), carotenóides (AJILA et al., 2007), rutina, kaempferol (SILVA et al., 2005).

No método proposto por Blois (1958), adaptado por Figueira e colaboradores (2014) a determinação da atividade antioxidante das amostras é mensurada a partir da interação da substância antioxidante com o radical DPPH, de coloração púrpura, resultando na formação irreversível de um produto hidrogenado (hidralazina) o qual possui coloração amarela (Figura 12). Este método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via a atividade sequestradora do radical livre DPPH, a qual pode ser monitorada pelo decréscimo da absorvância numa dada concentração (NASCIMENTO et al., 2011). A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

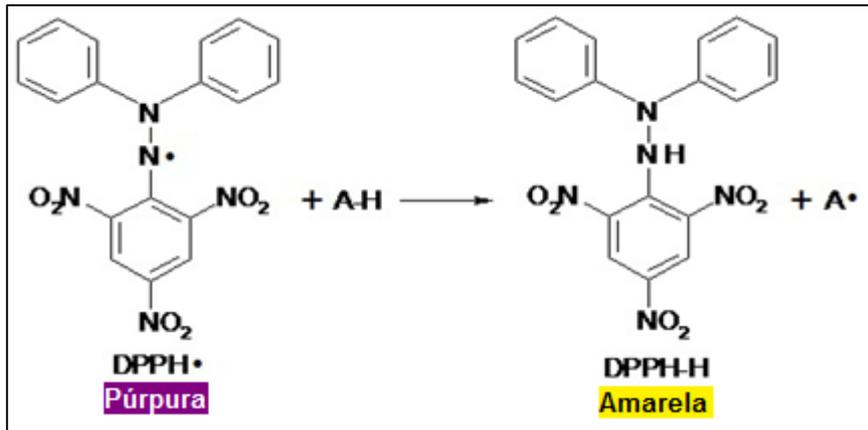


Figura 12: Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio. Fonte Adaptado de OLIVEIRA, 2015.

O DPPH é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade como a maioria dos compostos, portanto, apenas agentes redutores fortes são capazes de reagir com esses radicais estáveis em um modo estequiométrico. A baixa absorvância indica atividade sequestrante de radicais livres (SANTOS et al., 2007).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar atividade antitumoral, além da ação protetora contra danos ao DNA e indução de apoptose de extrato, frações, subfrações e rutina obtidos de *Annona glabra*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de extratos, frações, subfrações e substâncias puras da *Annona glabra*;
- Avaliar se mecanismo envolvido na citotoxicidade do extrato, frações, subfrações e substâncias puras da *Annona glabra* está relacionado à indução de apoptose ou atividade antioxidante;
- Avaliar se o mecanismo de morte celular envolve apenas a indução de apoptose ou necrose e indução de apoptose;
- Avaliar a capacidade antioxidante de extrato, frações, subfrações e substâncias puras da *Annona glabra*.
- Comparar qual atividade mais promissora para cada uma das amostras obtidas de *A. glabra*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético mini com aquecimento – Quimis;
- Autoclave 75L – Phoenix;
- Balança analítica modelo FA2104 Eletronic Balance – Bio precisa,;
- Banho-maria, modelo SL 150– SOLAB Científica;
- Banho de ultrasson, modelo 2210 Brason – Tecnal Equipamentos para laboratório;
- Cabine de fluxo laminar vertical, modelo PA 310 – Pachane;
- Câmara de contagem de Neubauer espelhada – Improved;
- Capela – Quimis;
- Centrífuga refrigerada, modelo CT-600R – Cientec Equipamentos para Laboratório;
- Citômetro de fluxo, CyFlow space - Partec
- Contador manual de células - DIGETIMER;
- Deionizador, modelo EasyPure II – Banstead;
- Dessecador de vidro;
- Destilador de água;
- Equipamento de Fluxo Unidirecional, modelo CFLV 12 – Grupo Veco;
- Estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), modelo HF212 UV – Byosistens com Importadora e Exportadora de Equipamentos para Laboratório LTDA;
- Espectrofotômetro, modelo Spectra Max M2 – Molecular Devices;
- Estufa, modelo Md 12 – Medicate Produtos Médicos;
- Evaporador rotatório, Fisatom;
- Geladeira - Eletrolux;
- Incubadora CO₂, modelo Series 8000WJ – Thermo scientific;
- Micropipetas, volume ajustável de 10-100 µL e de 100-1000 µL – Paguepet;
- Microscópio Óptico, modelo E200-NIKON - Eclipse,;
- Phmetro de bancada – Quimis Q400RS;

- Sistema de Filtração a vácuo 250 mL, membrana 0,22 µm – TPP – Switzerland.

4.1.2 MATERIAL DE CONSUMO

4.1.2.1 Solventes e Reagentes

- ABTS® Aldrich Chemical - Co
- Acetato de etila P.A – Isofar Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos;
- Álcool Metílico (Metanol) – CAQ (CASA da Química Indústria e Comércio LTDA);
- Álcool grau 96° (Álcool Etílico hidratado) – Santa Cruz LTDA;
- Diclorometano P.A – Isofar Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos;
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) – Sigma Aldrich;
- DPPH - 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl – Sigma Aldrich;
- Hexano P.A – CQA (CASA da Química Ind. E Com, LTDA);
- TROLOX® Aldrich Chemical – Co;

4.1.2.2 Meio de Cultura e Outros

- Anexina V marcada com FITC – BD Pharmingim;
- Bicarbonato de Sódio – Sigma Aldrich;
- Citrato de sódio PA Tribásico – Vetec;
- Cloreto de cálcio – Vetec;
- Cloreto de sódio PA - Vetec
- Corante Azul de Tripán solução (0,4%V100mL) – Sigma Aldrich;
- Estreptomicina – Sigma Aldrich;
- Hepes – Sigma Aldrich;
- Meio DMEM P1502 (Dulbecco's Modified Eagle Mediem) com glutamina e vermelho fenol, isento de bicarbonato de sódio – Gibco;
- MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium 500mg – Sigma Aldrich;

- Penicilina G – Sigma Aldrich;
- RNase A5x1mL – Ludwig Biotec;
- SEPHADEX;
- Silica gel para cromatografia em coluna fina – Macherey-Nagel;
- Soro bovino Fetal – Gibco;
- Tripsina – EDTA (1X) – Gibco;
- Triton® X-100 – Sigma Aldrich;

4.1.2.3 Materiais plásticos, metal e vidro

- Algodão hidrófobo;
- Cuba cromatográfica;
- Cubeta de quartzo;
- Eppendorffs;
- Espátulas de metal;
- Estantes plásticas;
- Garrafas de cultura de células 75cm² – TPP – Switzerland;
- Garrafas de cultura de células 25cm² – SPL Life Sciences;
- Papel de filtro;
- Placas de cultura de células de 24 poços – TPP;
- Placas de cultura de células de 96 poços – TPP;
- Ponteira 200 µL amarela, tipo universal – Labware Manufacturing CO;
- Ponteira 100-1000 µL, azul, tipo universal – Kartell S. P.A.;
- Tubo cônico graduado 15 mL estéril (Tipo Falcon);
- Tubo cônico graduado 50 mL estéril (Tipo Falcon) – Becton-Dickson;
- Tubos de microcentrifuga (Tubos eppendorff) de 1,5 mL – Kartell S. P.

A.)

- Suporte de ferro.

4.1.2.4 Vidrarias

- Balão volumétrico de 250 mL, 500 mL, 1000 mL – Laborquimi;
- Bastão de vidro;
- Becker de 600 mL, 1000 mL – Satelit;
- Coluna cromatográfica;
- Erlenmeyes de 250, 2000 mL – Vidrolabor;
- Funil de separação de 1000 mL – Schott Duran;
- Pipetas de vidro graduadas de 1mL, 5 mL, 10 mL, - Vidrolar;
- Pipeta Pasteur descartável;
- Proveta de 50 mL, 200 mL, 500 mL e 1000 mL – Vidrolex;

4.1.3 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.3.1 Linhagem celular

Para os testes citotóxicos foram utilizadas a linhagem celular permanente de células 4T1, oriunda de carcinoma mamário murino, cedidas gentilmente pelo laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília (UnB) e adquiridas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro.

4.1.4 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As cascas dos troncos da *A. glabra* foram coletadas em abril de 2014, na rodovia estadual Alça Viária, próximo ao município de Abaetetuba, Estado do Pará. A identificação botânica foi realizada pela Dra. Márlia R. F. Coelho; e a amostra testemunho pertence ao Herbário João Murça Pires (MG) do Museu Paraense “Emílio Goeldi” sob o registro MG. 176948.

4.2 Métodos

4.2.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As cascas do tronco 5 kg foram lavados em água corrente para retirada do limo e cortiça presente e higienizados com álcool 70° GL O material vegetal foi mantido em estufa de circulação de ar a 40 °C por 7 dias. Após secagem completa, o material foi submetido à moagem em moinho de facas e foi obtido 3 kg de um pó grosso, caracterizado previamente no estudo de Brígido (2016).

4.2.2 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO

A quantidade de 1,395 kg do pó das cascas de *A. glabra* foi submetido à maceração descontínua com etanol na proporção de 1:10, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Inicialmente utilizou-se 10 L de etanol e manteve-se a solução em repouso por 72 h. A solução extrativa foi removida e mais 10 L de etanol foram adicionados e mantidos em repouso por mais 24h. Repetiu-se o procedimento até obtenção de solução extrativa incolor. Após, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador-rotativo até obtenção de resíduo. O material seco foi acondicionado em frascos de vidro previamente pesados e então mantidos em estufa estufa (50 °C) até peso constante.

O extrato etanólico obtido das cascas de *A. glabra* (5,2025 g) foi solubilizado em 50 mL de metanol com o auxílio de banho de ultrassom, e submetido à partição (1:1) com 1000 mL de hexano e metanol aquoso 10% (v/v), obtendo-se as frações hexânica (FH) e metanólica (FM), que em seguida foram concentradas em evaporador rotativo. Dois gramas (2 g) da FM foram novamente fracionados em coluna com Sephadex (LH20®) como barreira de exclusão (altura: 49 cm, diâmetro: 4 cm e volume: 615,44 mL) e como fase móvel utilizou-se metanol. As subfrações obtidas também foram concentradas em evaporador rotativo até obtenção de resíduo, e após completa secagem em estufa a 50 °C foram determinadas as massas das subfrações (Figura 13; Tabela 1).

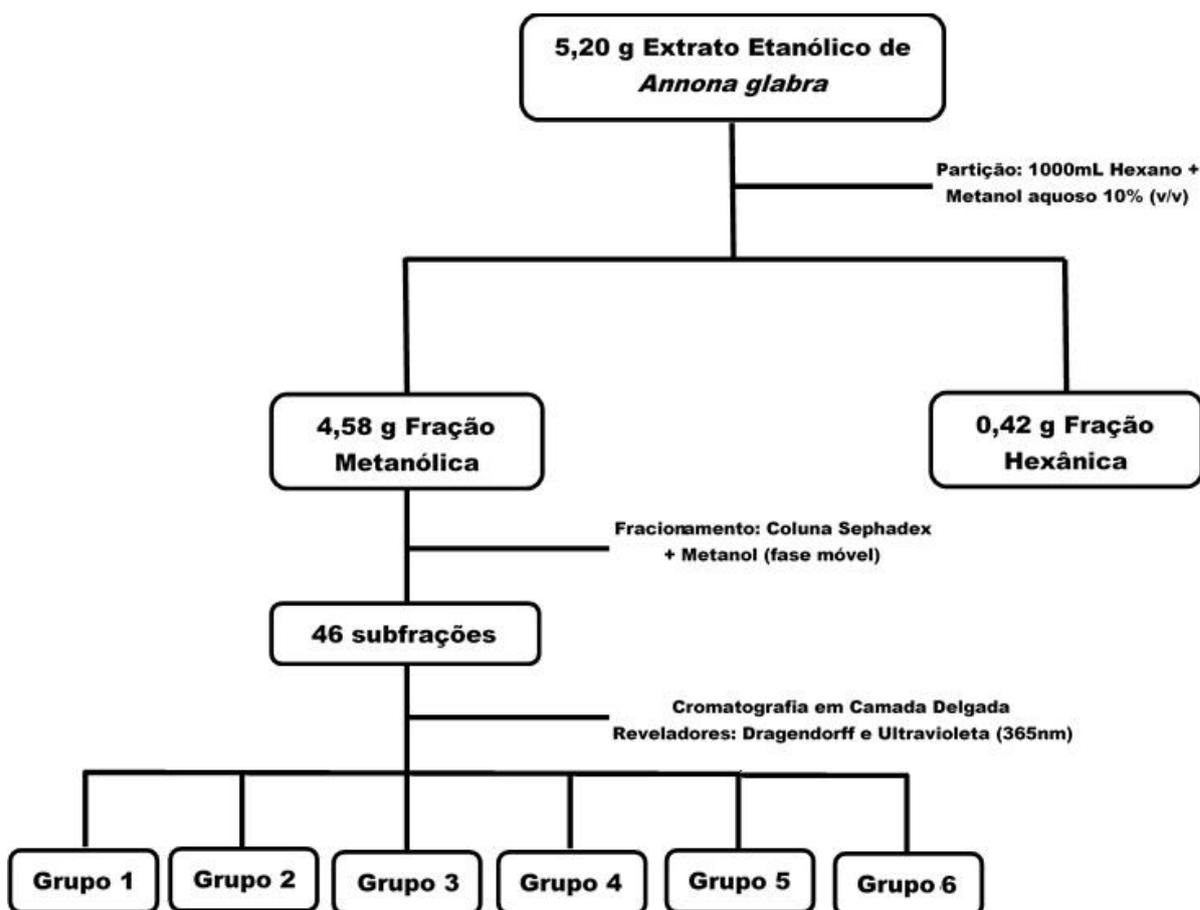


Figura 13: Esquema utilizado para o fracionamento do extrato etanólico obtido das cascas de *A. glabra*.

Tabela 1. Frações resultantes do fracionamento por cromatografia em coluna de Sephadex da fração metanólica (FM) obtido do extrato etanólico da casca de *A. glabra* e agrupamento.

Subfração	Massa (mg)	Frações Reunidas	Fração	Massa (mg)
1	10,2		23	35,6
2	12,4		24	25,9
3	10,4		25	26,8
4	20,2		26	25,7
5	28,3		27	24,9
6	21,6	Grupo 1	28	34,8
7	90,2	Grupo 2	9	35,6
8	26,5	Grupo 3	30	35,7
9	339,3		31	34,6
10	83,4		32	36,8
11	70,6	Grupo 4	33	27,9
12	38,2		34	33,2
13	30,2		35	26,5
14	44,2		36	33,8
15	53,1	Grupo 5	37	36,8
16	52,4		38	26,2
17	67,2		39	32,6
18	55,8	Grupo 6	40	24,7
19	23,6		41	25,7
20	45,3		42	25,2
21	43,4		43	25,6
22	24,2		44	22,6
23	33,4		45	14,2
24	35,6		46	13,2

Amostras de 1 mg do extrato, frações e subfrações foram solubilizadas em 1mL de metanol e analisadas em cromatografia em camada delgada (CID), em placas de vidro cobertas com sílica gel 60 mesh. Como fase móvel foram utilizados acetato de etila/metanol/água (88%:11%:8%), seguindo metodologia adaptada por Wagner (1984) para detecção de alcaloides. Como reveladores foram utilizados o reagente de Dragendorff e Ultravioleta (UV) (365 nm). As subfrações obtidas da coluna cromatográfica de Sephadex que apresentaram perfis semelhantes foram reunidas, enquanto que as subfrações que não revelaram com o reagente de Dragendorff e UV (365 nm) e que apresentaram rendimento inferior a 50 mg não foram submetidas as demais etapas do estudo.

Na figura 14 é apresentada a sequência cronológica de realização dos experimentos.

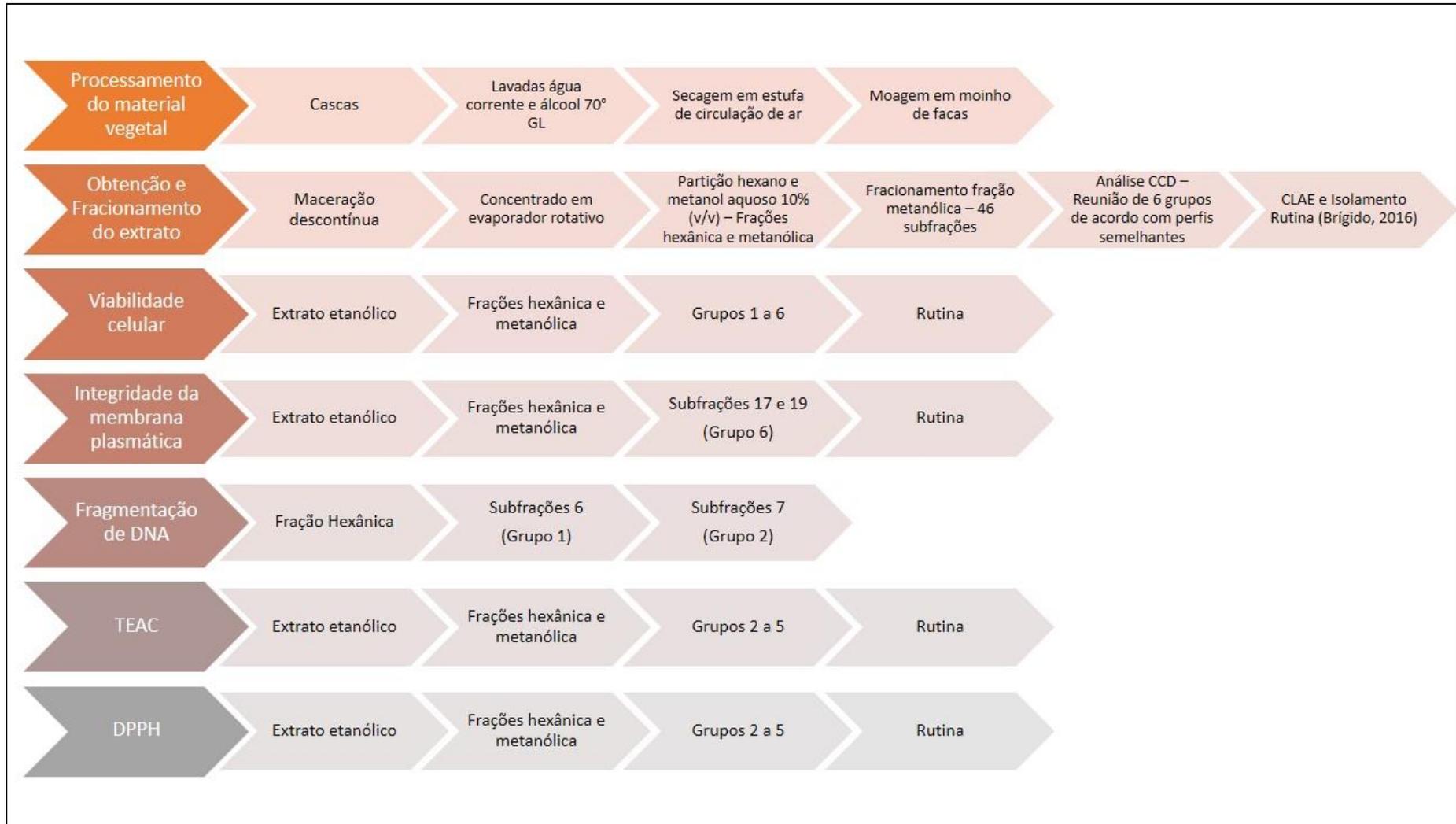


Figura 14: Sequência cronológica dos experimentos.

Legenda: TEAC – Capacidade Antioxidante equivalente ao Trolox; DPPH – Capacidade antioxidante de acordo com a redução do radical 1,1 –difetil-2-picrilhidrazila).

4.2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

4.2.3.1 Cultivo e manutenção das linhagens celulares

As células 4T1 (Figura 14) foram cultivadas em garrafas de cultura, com meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado com 10% de SFB - Soro Fetal Bovino, mantidas em incubadora com atmosfera úmida, 5% de CO₂ a 37 °C, sendo repicadas a cada 2 a 3 dias. Para a realização dos experimentos, as células foram retiradas das garrafas de cultivo através da exposição à tripsina por 3 minutos, coletadas em tubos cônicos de 15 mL, centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, ressuspensas em meio DMEM ou RPMI 1640, contadas em Câmara de Neubauer e plaqueadas conforme a necessidade do protocolo experimental realizado. Após 24h, as células foram expostas as amostras testes e realizados os procedimentos experimentais.

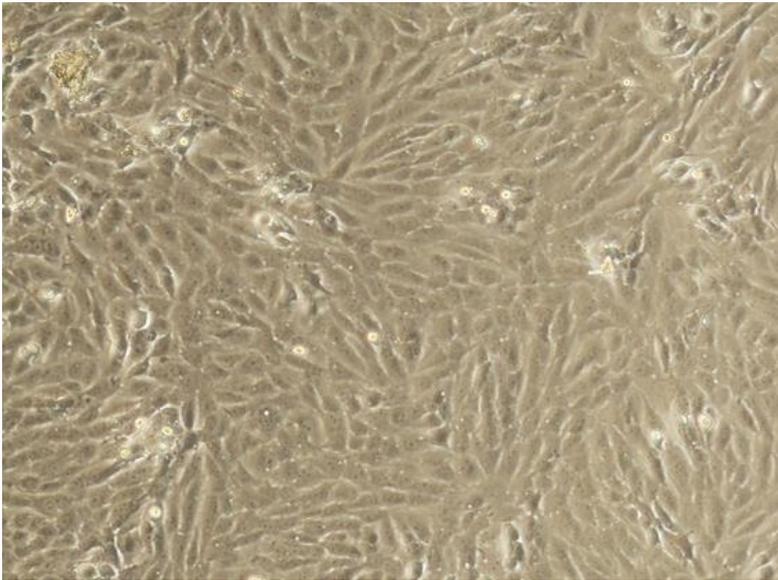


Figura 15: Células 4T1

Fonte: Shen et al., 2003.

4.2.3.2 Teste de Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mossman e colaboradores (1983). Utilizando placa de 96 poços foram distribuídas as células 4T1 ($2,5 \times 10^4$ células/mL meio DMEM suplementado com 10% de SFB). As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Depois de 24h de incubação foi realizado o tratamento com concentrações decrescentes das amostras testes (200 µg/mL; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; e 6,25 µg/mL).

As placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 24h de tratamento, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 150 µL da solução de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, 5 mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ durante 4 horas. Após este tempo, foi adicionado 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) a todos os poços para dissolver os cristais de formazan. Após 5 minutos, as absorbâncias dos poços foram lidas em um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços, utilizando um comprimento de onda de referência de 570 nm.

Os valores de CI₅₀ (concentração inibitória 50%) foram calculados utilizando-se curvas de dose-resposta a partir de três experimentos independentes. Para o cálculo da viabilidade celular, adaptado de Galucio (2014):

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{Absorbância células tratadas}}{\text{Absorbância células sem tratamento}} \times 100$$

(Equação 1)

Ou seja, para o cálculo das células mortas:

$$\% \text{ células inviáveis} = \frac{\text{Absorb.células sem tratamento} - \text{Absorb.cél.tratadas}}{\text{Absorb.cél.sem tratamento}} \times 100$$

(Equação 2)

A concentração inibitória de 50% (CI₅₀) foi determinada pela regressão linear, $p < 0.05$ e, adotando-se os critérios estabelecidos pelo protocolo da *American Cancer Institute* (NCI), o qual recomenda que valores de CI₅₀ ≤ 30 µg/mL para extratos brutos de plantas, assim como CI₅₀ ≤ 4 µg/mL para substâncias puras (GERAN et al., 1972).

4.2.3.3 Determinação da Externalização da Fosfatidilserina (Detecção de Apoptose)

Para o ensaio de detecção de apoptose células da linhagem 4T1 foram plaqueadas em placas com 12 poços na concentração de 5×10^4 células/mL, incubadas a 5% de CO₂, 37 °C e umidade controlada, por 24h. Após este tempo as células foram tratadas com as amostras nas concentrações inferiores a CI₅₀. As placas foram novamente incubadas a 5% de CO₂, 37 °C e umidade controlada, por mais 24h. No terceiro dia, 800 µL de solução de peróxido de hidrogênio (2 mM) foram adicionadas aos poços de controle positivo. Após 30 minutos, as células foram lavadas com PBS e então desaderidas com tripsina. Depois desse período, com as células completamente desaderidas, estas foram coletadas, centrifugadas (2000 rpm/ 5 min, 4 °C). O sobrenadante foi descartado, sendo adicionado tampão de ligação (300 µL) e feito a ressuspensão as células. Esta suspensão foi dividida em 3 aliquotas (100 µL), sendo o primeiro grupo utilizado como controle não marcado, o segundo grupo foi marcado com 5 µL de FITC Anexina V e 50 µL de iodeto de propídeo (20µL/mL) e o terceiro grupo será marcado apenas com 50 µL de iodeto de propídeo. Todos os grupos foram lidos em citômetro de fluxo (VERMES, 1995).

Portanto, células marcadas positivamente pela FITC Anexina V e negativa para IP, estão no estágio inicial de apoptose; células marcadas para ambos FITC Anexina V e IP estão ou no estágio final de apoptose, sofrendo necrose ou já estão mortas; células marcadas negativamente para ambos FITC Anexina V e IP estão vivas e não estão sofrendo apoptose mensurável (VERMES, 1995).

O fluorocromo verde isotiocianato de fluoscina (FITC) associado a Anexina V e o iodeto de propídeo são excitáveis por laser de argônio (480 nm) e emitem fluorescência na faixa de 515-530 nm (FL1) e 560-580 nm (FL2), respectivamente (VERMES, 1995).

4.2.3.4 Determinação da Fragmentação de DNA

O ensaio para determinação de fragmentação de DNA objetiva-se a marcar ácidos nucleicos com IP para realização de leitura em citômetro de fluxo (YUAN et al., 2003).

Semelhante ao ensaio de detecção de apoptose, as células foram plaqueadas a uma concentração de 5×10^4 células/mL em placas de 12 poços. Após 24h, foram tratadas com as substâncias em concentrações inferiores a CI_{50} . No terceiro dia foram tripsinizadas e centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μ L de solução de RNase A (250 μ g/mL) e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. As células foram ressuspendidas com 200 μ L de tampão de lise contendo IP, e então, foram incubadas por 30 minutos a 4°C (YUAN et al., 2003).

Para controle positivo foram utilizadas células tratadas com peróxido de hidrogênio a 2 mM. Na leitura no citômetro de fluxo, os parâmetros foram ajustados para FL2, que representa a emissão de fluorescência do IP na faixa de 560-580 nm (YUAN et al., 2003).

4.2.4 TROLOX EQUIVALENT ANTIOXIDANTE CAPACITY (TEAC)

O potencial antioxidante foi determinado de acordo com a sua equivalência ao um potente antioxidante conhecido como Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxylic acid), um análogo sintético e hidrossolúvel da vitamina E. Foi seguido o protocolo proposto por Miller e colaboradores (1993), modificado por Re e colaboradores (1999), adaptando-se as condições de temperatura, proporções relativas de reagente e mensuração de tempo.

Para realização deste ensaio, inicialmente testou-se a capacidade antioxidante apenas dos extratos, frações, subfrações e substância isolada das cascas de *A. glabra*. As amostras foram testadas nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μ g/mL. Também foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos após exposição as células 4T1, no qual semeou-se as células em placas com 96 poços. Após 24h de incubação em incubadora com 5% de CO_2 , umidade controlada e temperatura de 37 °C, as células fora tratadas com as mesmas concentrações das amostras (200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μ g/mL). As leituras foram realizadas após 24 h de exposição das células, onde o sobrenadante foi recolhido e armazenado em

tubos cônicos com capacidade para 1,5 mL devidamente identificados e então, encaminhados para realização da leitura. Para a leitura, os reagentes foram preparados previamente, onde o ABTS reage com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), produzindo diretamente o radical cátion $ABTS^{+\bullet}$, que apresenta um cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815 nm.

As amostras foram adicionadas ao radical pré-formado, esperando-se que as que possuíssem capacidade antioxidante o reduzisse novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração do antioxidante e duração da reação. Estes aspectos foram avaliados através de espectrofotometria pela observação da mudança na absorvância lida a 734 nm durante o intervalo de tempo de 5 min. A extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion $ABTS^{+\bullet}$ foi determinada como a atividade antioxidante da amostra, e esta relação com reatividade do TROLOX[®] como padrão (Figura 15) calculada sob as mesmas condições. Os resultados finais foram expressos em mmol/L, correspondendo a concentração do Trolox com capacidade antioxidante equivalente a amostra analisada.

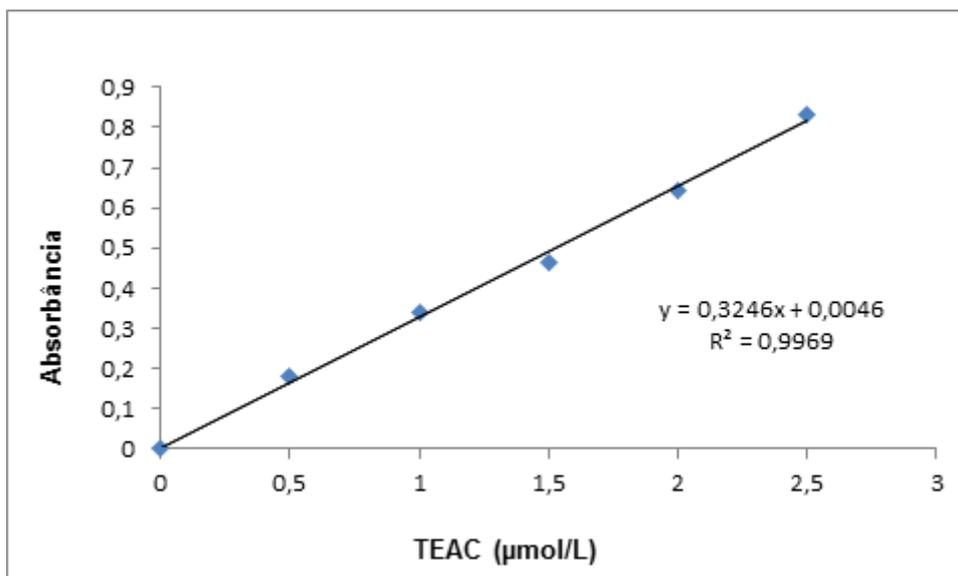


Figura 16: Curva padrão do Trolox para a determinação do TEAC.

O resultado antioxidante foi determinado segundo Re e colaboradores (1999), através da porcentagem de inibição da absorbância da solução de ABTS a 734 nm e representadas graficamente como uma função de concentração.

4.2.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ACORDO COM A REDUÇÃO DO RADICAL DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).

Para avaliação da capacidade antioxidante das amostras foi utilizado o método de redução do radical DPPH proposto por Blois (1958), adaptado por Figueira (2014). A preparação das amostras foi realizada conforme descrito no subitem 4.2.3.7.

Para realização da leitura das amostras, uma solução de DPPH 0,1 mM em metanol foi preparada. Em tubos de ensaio foram acrescentados 600 µL da solução de DPPH 0,1mM em etanol, 50 µL da amostra e 350 µL de água destilada, resultando no volume final de 1 mL. Os tubos foram mantidos por 30 min em banho-maria a 37 °C, e após este período as absorbâncias das amostras foram mesuradas a 517 nm. A absorbância inicial do DPPH foi avaliada, e as mudanças observadas nas absorbâncias foram proporcionais a atividades antioxidante das amostras. Uma curva padrão do Trolox foi utilizada (Figura 17). A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através da conversão dos valores de absorbância em porcentagem da capacidade antioxidante (% CA) pela equação a seguir:

$$\% CA = \frac{(Abs.control - Abs.Extrato) \times 100}{Abs.control}$$

(Equação 3)

Onde:

Abs. controle é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH e Abs. extrato é a absorbância da mistura reacional (DPPH + extrato) (OLIVEIRA et al., 2014).

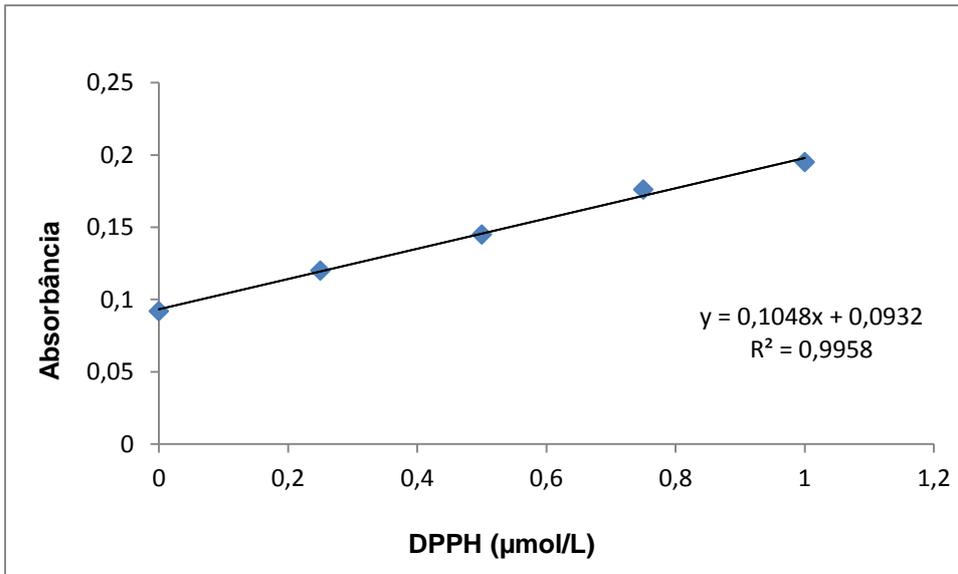


Figura 17: Curva padrão do Trolox para a determinação do DPPH.

4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa SPSS versão 20.0 foi utilizado para a obtenção dos valores das médias e DP (desvio padrão). Diferenças significativas entre as médias foram determinadas usando análise de variância (ANOVA) pelo teste de Turkey usando o mesmo programa. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção e seleção das amostras submetidas ao estudo

O extrato etanólico (rendimento = 8,39%) foi submetido à partição, sendo obtidas as frações hexânica (rendimento = 8,077%) e metanólica (rendimento = 88,138%).

A premissa deste trabalho é que se a *A. glabra* tiver atividade antioxidante é devido à presença de flavonoides. Visando obter subfrações enriquecidas com estes metabólitos ou obter as substâncias isoladas, a fração metanólica foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta com Sephadex como fase estacionária e metanol como fase móvel, obtendo-se 46 subfrações. (BRIGIDO, 2016).

No estudo de Brígido (2016) o extrato, frações e subfrações foram analisados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a Arranjos de Diodos (CLAE-DAD) com a finalidade de detectar a presença de flavonoides. Esta etapa serviu de base para a seleção das amostras que foram submetidas as demais etapas do estudo.

No extrato etanólico, frações hexânica e metanólica, e grupos 2 e 3 apresentaram picos majoritários cujos os espectros em ultra-violeta (UV) são sugestivos de flavonoides (Figura 16).

Nos espectros em UV foram observados em 255 nm um sinal é sugestivo do da banda II (anel A, porção benzoil), enquanto que o pico em 318,9 nm pode estar relacionado com a banda I (anel B, porção cinamoil) do flavonóide (Figura 17) (MARBRY et al., 1970; ALONSO-SALCES et al., 2004).

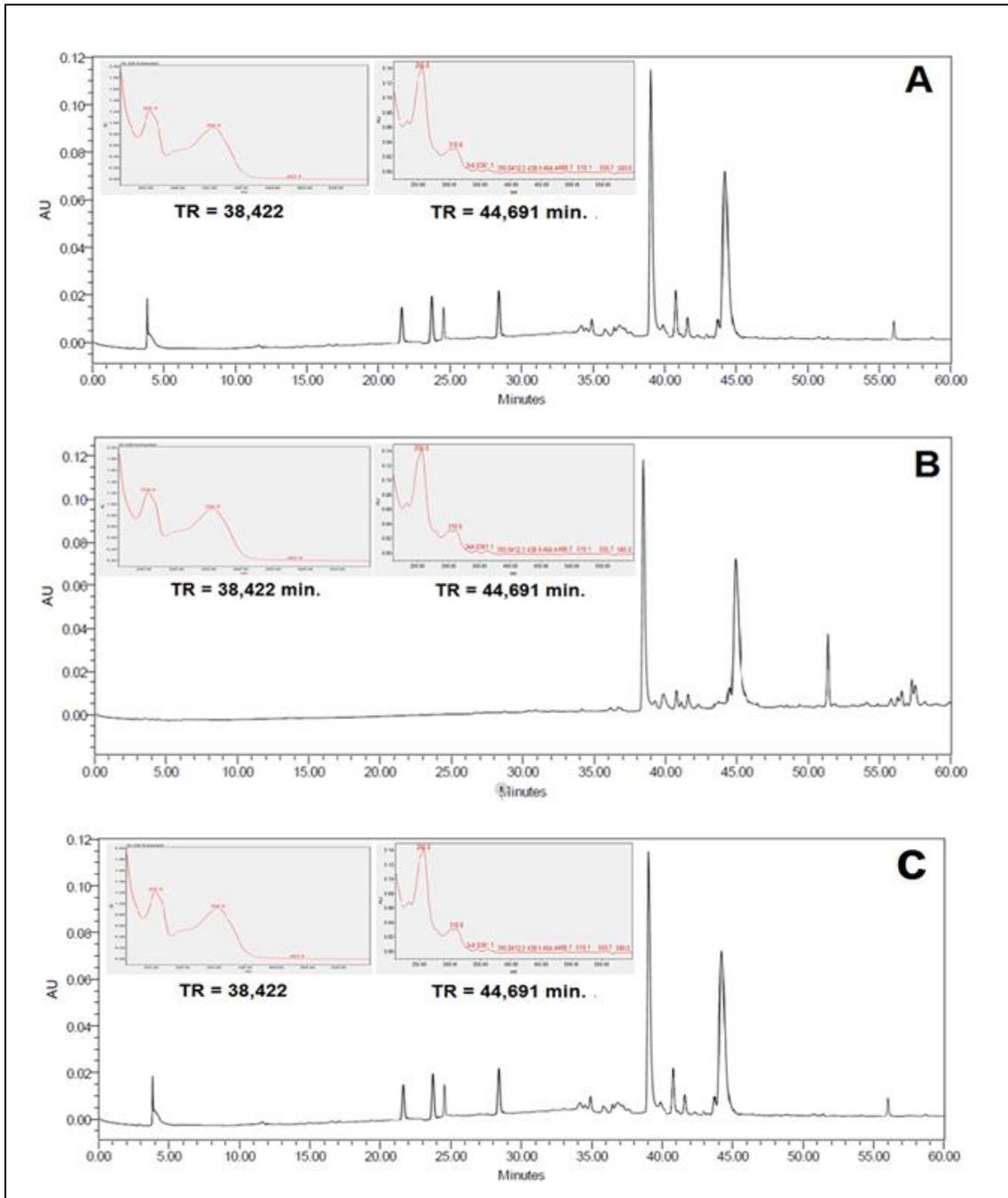


Figura 18: Perfis cromatográficos e espectros de UV do extrato e frações obtidos das cascas de *A. glabra*. $\lambda = 280$ a 400 nm.
Condição: Coluna Sunfire C18, $5 \mu\text{m}$ ($4,6 \times 150$ mm), fluxo = $0,5$ mL/min, temperatura 40°C , **Fase móvel:** $t = 0$ min: 90% água e 10% metanol, $t = 20$ min: 90% água e 10% metanol, $t = 40$ e 50 min: 0% água e 100% metanol, $t = 60$ min: 90% água e 10% metanol.
Legenda: A – Extrato etanólico (EE); B – Fração Hexânica (FH) e C – Fração Metanólica (FM) (BRÍGIDO, 2016).

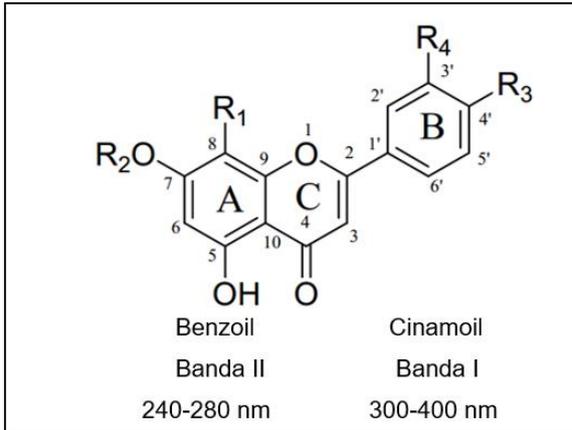


Figura 19: Estrutura química geral de um flavonoide.

Baseado nos resultados do CLAE-DAD selecionou-se as seguintes amostras para estudo: EE, FH, FM, G2, G3, G4 e G5. O Grupo 3, devido as características cromatográficas e o rendimento, foi submetido a novo fracionamento para o isolamento do flavonoide (BRIGIDO, 2016)

5.2 Avaliação da citotoxicidade

Através do ensaio de viabilidade celular (MTT) determinou-se a concentração inibitória 50%. Baseado nesta determinou-se o potencial citotóxico para linhagem celular 4T1. O fracionamento do extrato etanólico ($CI_{50} = 137,7 \mu\text{g/mL}$) levou a obtenção de fração com maior atividade inibitória (Fração hexânica $CI_{50} = 45,07 \mu\text{g/mL}$). Entretanto, não houve alteração significativa da atividade para a fração metanólica ($CI_{50} = 139,4 \mu\text{g/mL}$).

Devido ao baixo rendimento da fração hexânica (8,007%), optou-se por fracionar a fração metanólica.

As subfrações 7 e 8, pertencentes aos grupos 2 e 3, respectivamente, não inibiram o crescimento das células 4T1, apresentando viabilidade de 100% com $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 2), portanto, não foram consideradas citotóxicos.

As subfrações 6, 11, 15 e 20 (grupos 1, 4, 5 e 6, respectivamente) demonstraram atividade inibitória superior as subfrações 7 e 8, inibindo aproximadamente 35,76%, 22,74%, 10,17% e 26,66% da proliferação da linhagem tumoral a $100 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 2).

Tabela 2. Cl_{50} do extrato etanólico obtido das cascas de *A. glabra* e suas frações testadas em células 4T1 (Carcinoma mamário murino).

Amostra	Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EE	137,7
FM	139,4
FH	45,07
Subfração 6 (Grupo 1)	142,6
Subfração 7 (Grupo 2)	>200
Subfração 8 (Grupo 3)	>200
Subfração 9 (Grupo 3)	97,12
Subfração 11 (Grupo 4)	103,7
Subfração 15 (Grupo 5)	100,6
Subfração 17 (Grupo 6)	53,45
Subfração 19 (Grupo 6)	80,65
Subfração 20 (Grupo 6)	104,6
Rutina	>200

Legenda: Cl_{50} – Concentração Inibitória 50%; EE – Extrato Etanólico; FM – Fração Metanólica; FH – Fração Hexânica.

Observa-se na figura 19, que a subfração 9 nas concentrações de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ a 50 $\mu\text{g/mL}$ apresenta um comportamento que favorece a proliferação das células tumorais, e nas concentrações acima de 50 $\mu\text{g/mL}$, a mesma mostra atividade de inibição do crescimento das células tumorais.

No presente estudo, o extrato, suas frações e subfrações mostraram-se ricas em flavonoide, logo a citotoxicidade destas amostras, provavelmente, estão relacionadas a estes metabólitos. Visando compreender os possíveis mecanismos envolvidos nesta citotoxicidade avaliou se a fragmentação do DNA está envolvida neste evento, ou se houve indução de apoptose intrínseca pelos flavonoides.

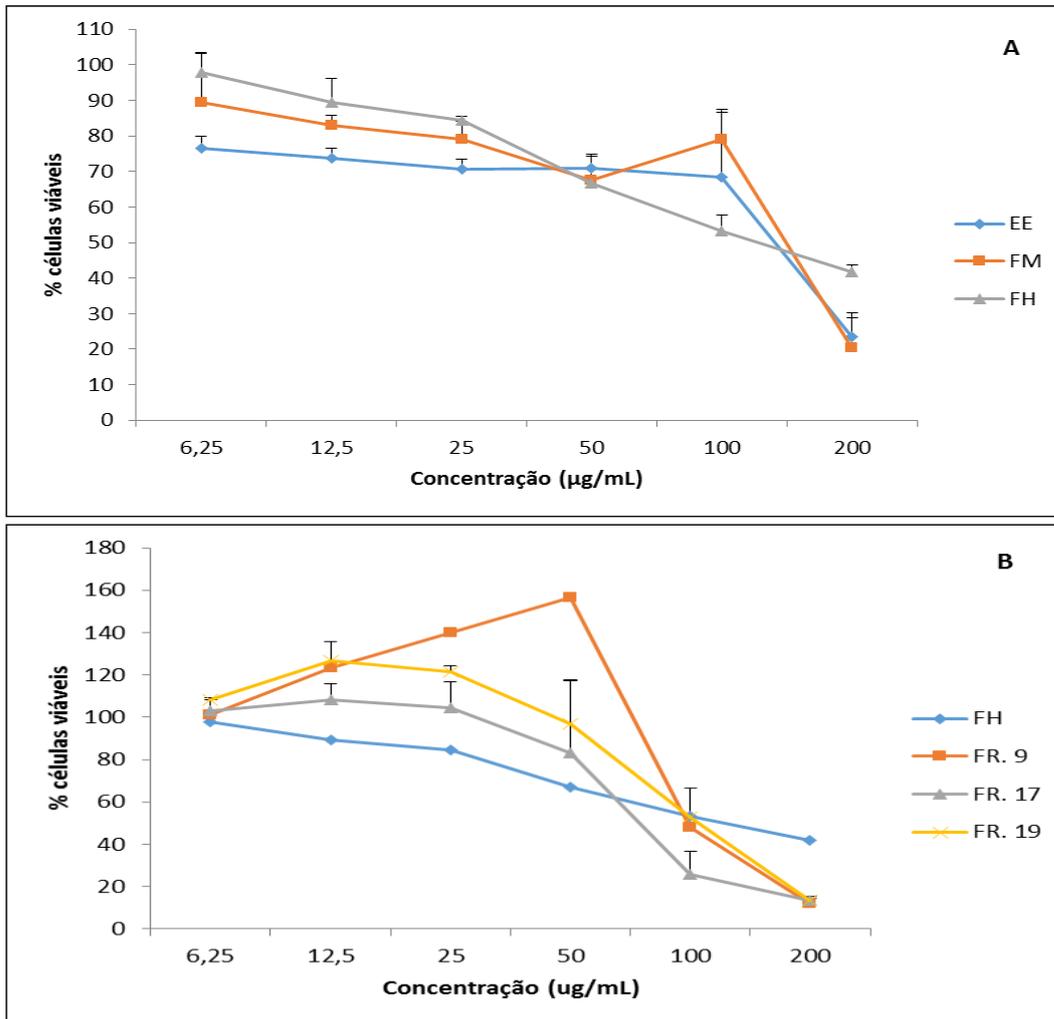


Figura 20: Viabilidade Celular de *A. glabra* sobre as células 4T1 (Carcinoma mamário murino). **A** – Percentual de células viáveis tratadas com Extrato Etanólico (EE), Fração Metanólica (FM) e Fração Hexânica (FH); **B** – Percentual de células viáveis tratadas com Fração Hexânica (FH), Subfração 9 (FR. 9), Subfração 17 (FR. 17) e Subfração 19 (FR. 19).

5.3 Integridade da membrana plasmática (Detecção de Apoptose)

Após observados os resultados de viabilidade celular através do ensaio de MTT, o EE, FM, e rutina que apresentaram baixa potencial citotóxico ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$), enquanto FH, subfração 17, subfração 19 apresentaram moderado potencial citotóxico ($CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$) foram selecionadas para o ensaio de detecção de apoptose através de citometria de fluxo, marcados com Anexina V e IP, para que fosse verificado se o fracionamento do extrato contribuiu para os danos provocados na membrana plasmática das células.

As células analisadas após o tratamento com o EE, FM e Rutina apresentaram marcações com Anexina V e IP (2,58%, 2,71% e 0,67%, respectivamente; Figura 21) comparável ao controle negativo (1,04%; Figura 21), assim como, a marcação apenas com Anexina V (6,78%, 13,46% e 10,11, respectivamente; Figura 21) e IP (5,31%, 0,72% e 2,43%, respectivamente; Figura 21) foram comparáveis ao controle negativo (11,65% e 2,43, respectivamente; Figura 21).

Os resultados expressos na figura 22 mostram que tanto o EE quanto a rutina provocaram modificações no tamanho e granulosidade das células, enquanto as tratadas com a FM não demonstraram alterações. O EE e a rutina mantiveram 39,54% e 56,96% das células com tamanho e granulosidade normais, enquanto o controle negativo manteve 82,4% de células com tamanho e granulosidade normais. Observou-se que as células tratadas com o EE evidenciaram alterações de tamanho, no entanto, as células tratadas com rutina mostraram mudanças no tamanho e na granulosidade (Figura 22).

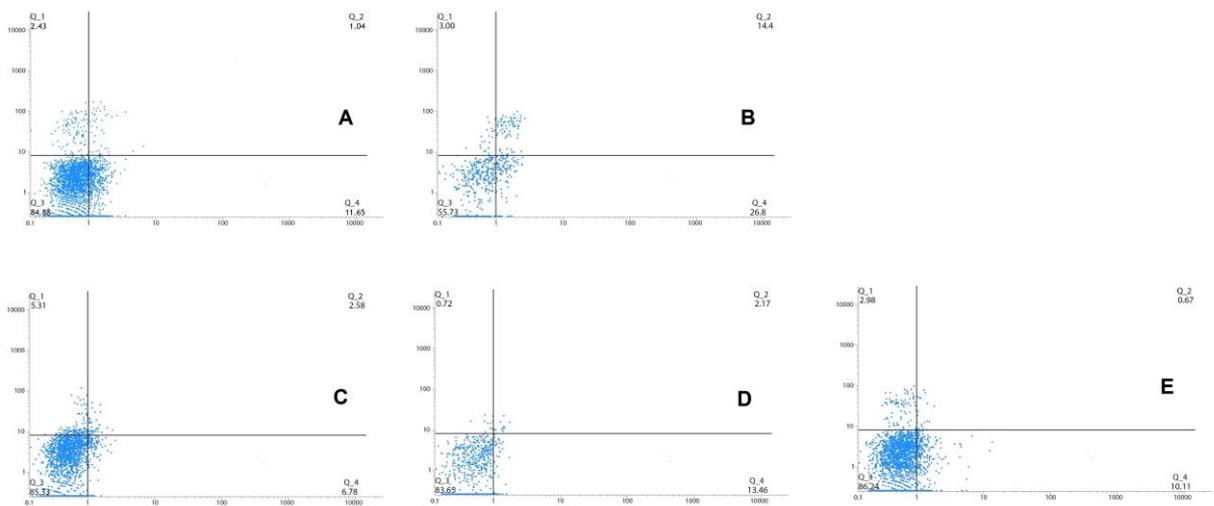


Figura 21. DotPlot comparando a marcação das células 4T1 por Anexina V e Iodeto de propídeo (IP) após tratamento de 24h com as amostras. **A**-Controle; **B**- Peróxido de hidrogênio; **C**- Extrato etanólico (EE); **D**- Fração metanólica (FM); **E**- Rutina.

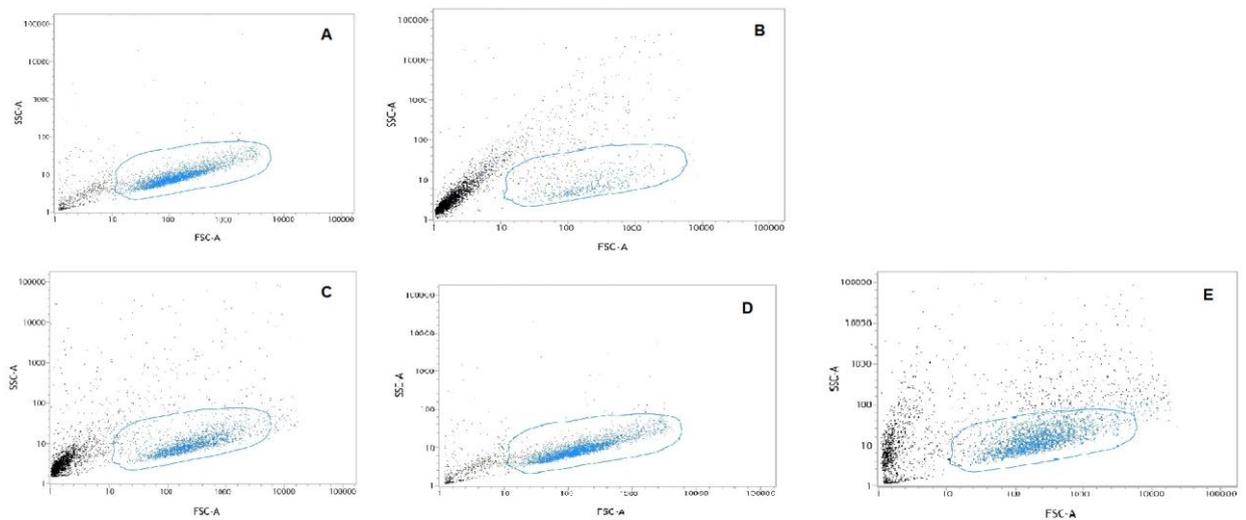


Figura 22. DotPlot comparando as alterações na morfologia (tamanho e granulosidade) das células 4T1 após tratamento de 24h com as amostras. **A-** Controle; **B-** Peróxido de hidrogênio; **C-** Extrato etanólico (EE); **D-** Fração metanólica (FM); **E-** Rutina.

A citometria de fluxo para análise da integridade da membrana das células tratadas com FH, subfração 17 e subfração 19 mostrou que tanto na marcação com Anexina V e IP (0,51%, 0,59% e 0,53%, respectivamente), apenas Anexina V (0,4%, 0,18% e 0,4%, respectivamente) quanto apenas IP (3,55%, 9,68% e 5,69%, respectivamente), não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo que teve 0,25%, 0,11% e 5,46% de marcação com Anexina V e IP, Anexina V apenas e IP apenas, respectivamente (Figura 23).

Neste ensaio também pode-se observar alterações nas características morfológicas (tamanho e granulosidade) nas células tratadas com as frações de *A. glabra*. A FH foi apresentada modificações mais evidentes em relação ao tamanho e granulosidade das células, mantendo apenas 22,39% das células com características normais comparado ao controle negativo (71,66%; Figuras 24).

Neste estudo as subfrações 17 e 19 não apresentaram alterações significativas de granulosidade e tamanho celular, exibindo 69,15% e 74,29%, respectivamente, de células com características normais, sendo comparável ao controle negativo (71,66%; Figura 24).

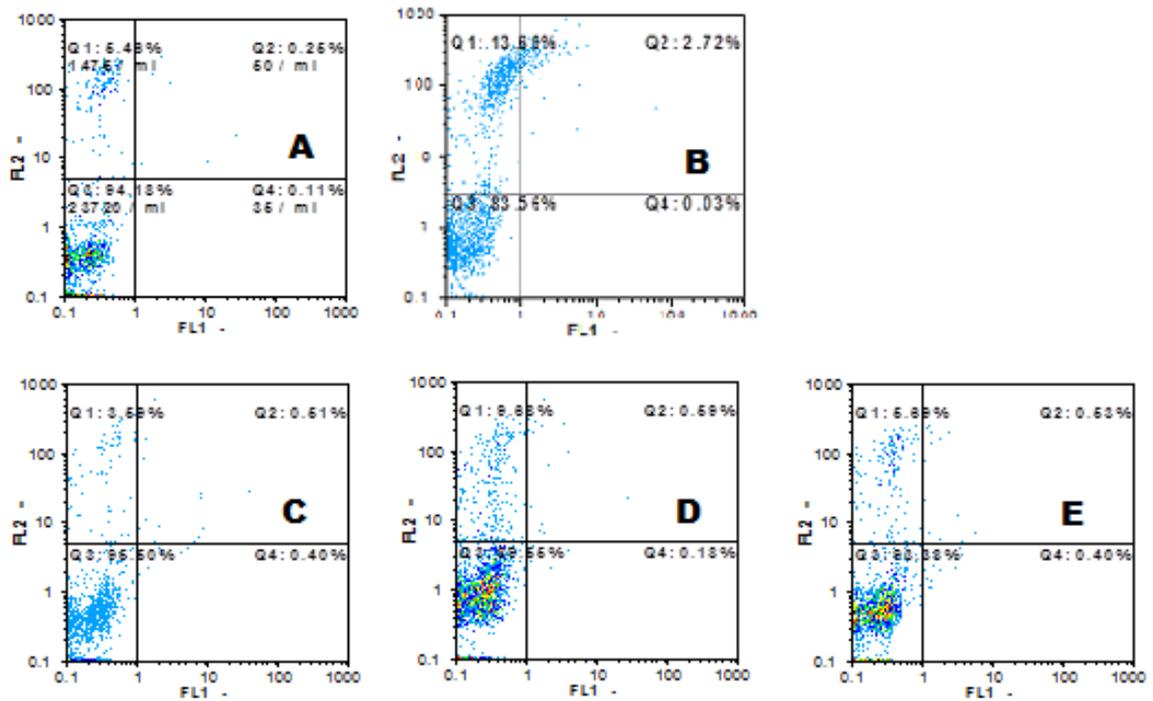


Figura 23: DotPlot comparando a marcação das células 4T1 por Anexina V e Iodeto de propídeo (IP) após tratamento de 24h com as amostras. **A-**Controle Negativo; **B-** Peróxido de hidrogênio; **C-** Fração Hexânica (FH); **D-** Subfração 17 (FR. 17); **E-** Subfração 19 (FR. 19).

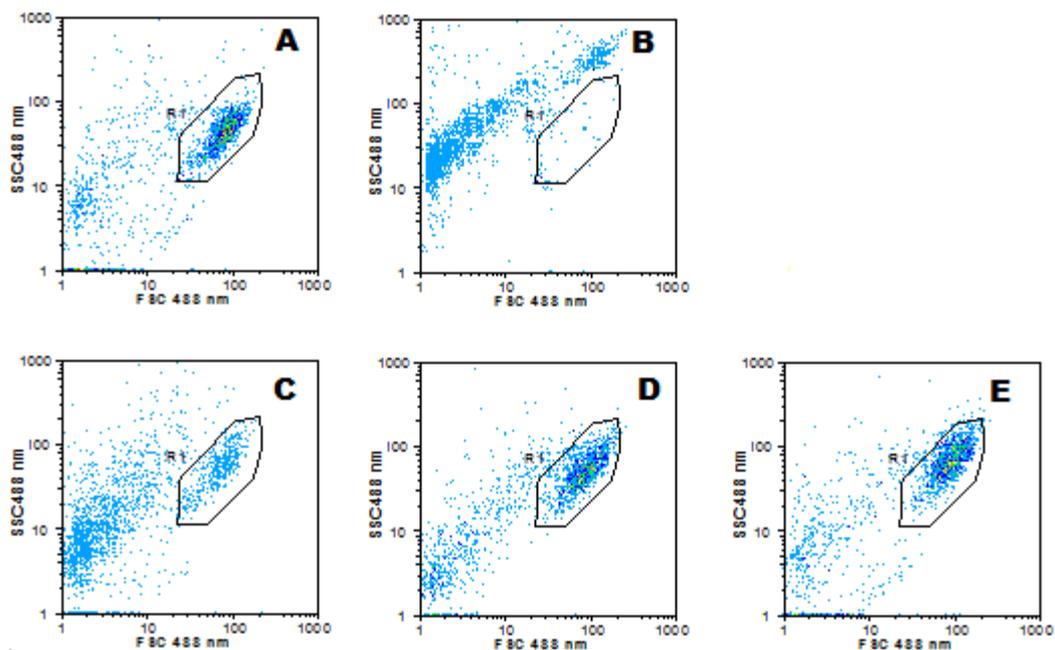


Figura 23. DotPlot comparando as alterações na morfologia (tamanho e granulosidade) das células 4T1 após tratamento de 24h com as amostras. **A-**Controle; **B-** Peróxido de hidrogênio; **C-** Fração Hexânica (FH); **D-** Subfração 17 (FR. 17); **E-** Subfração 19 (FR. 19).

5.4 Determinação da Fragmentação de DNA

A fragmentação de DNA é uma marca típica para análise de células que estão morrendo pelo processo de apoptose. As frações subfração 17 e 19 evidenciaram baixa taxa de células 4T1 com DNA fragmentado após o tratamento (6,51% e 19,22%, respectivamente; Figura 25). No entanto, o tratamento das células com as subfração 6 e 7 resultou em taxa de fragmentação de DNA comparável ao controle positivo (49,87% e 57,71%, respectivamente; Figura 25). A taxa de células com DNA fragmentado após tratamento com a FH (87,19%) foi superior ao controle positivo com peróxido de hidrogênio (52,79%)

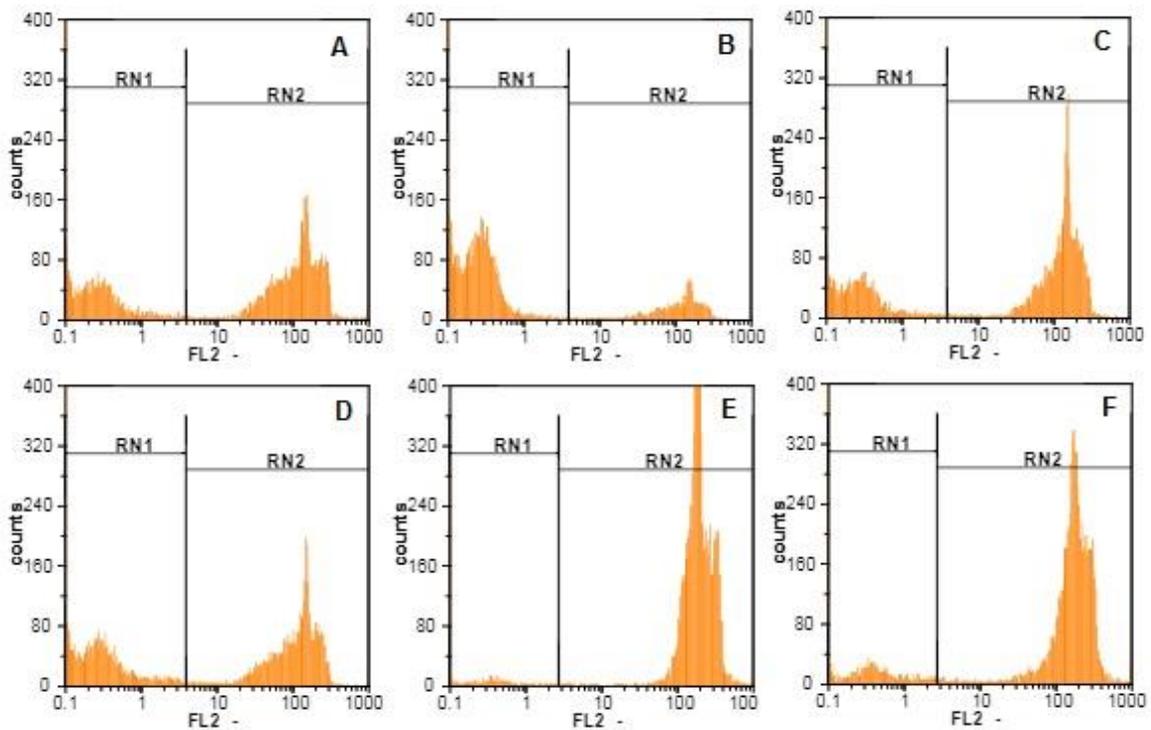


Figura 25: Histograma da quantificação de fragmentação de DNA das células 4T1 após tratamento de 24h com as frações de *Annona glabra*. **A-** Peróxido de hidrogênio; **B-** Fração Hexânica (FH); **C-** Subfração 6 (FR. 6); **D-** Subfração 7 (FR. 7); **E-** Subfração 17 (FR. 17); **F-** Subfração 19 (FR. 19).

5.5 Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)

Para análise da capacidade antioxidante pelo método ABTS^{•+}, obteve-se o valor do TEAC do extrato, frações, subfrações e rutina obtidos de *A. glabra* nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, a partir da curva padrão do

Trolox ($r^2 = 0,9969$) em 24h. Os valores de IC_{50} foram determinados através de regressão linear.

Os valores de TEAC para o EE, Grupo 5 e rutina apresentaram diferenças significativas em função da concentração, sendo evidenciado que para o Grupo 5 estas amostras houve aumento do percentual de inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ conforme há o aumento da concentração do material testado (Figura 26).

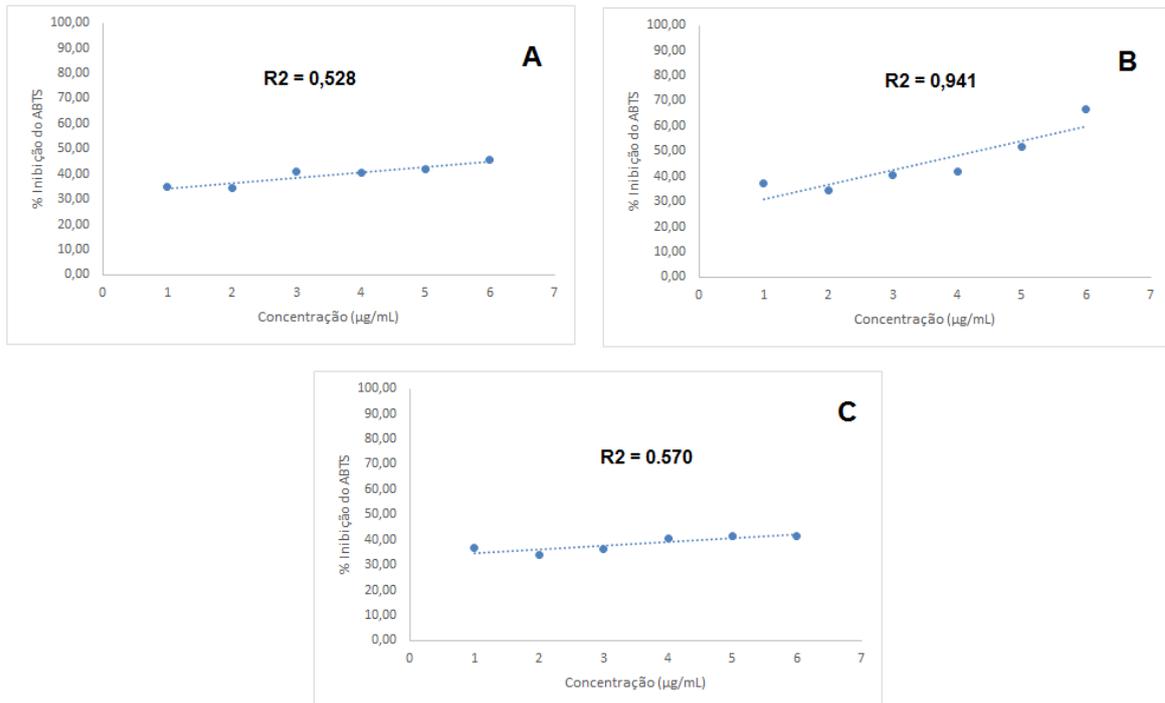


Figura 26: Resultados da ação antioxidante do extrato etanólico da *Annona glabra* subfração grupo 5 e rutina sobre a inibição da solução de radical $ABTS^{\bullet+}$. (A) Extrato etanólico ($r^2 = 0,528$), (B) Grupo 5 ($r^2 = 0,941$) e (C) rutina ($r^2 = 0,570$).

Para o EE as concentrações de 6,25 e 12,5 µg/mL o percentual de inibição do radical foi significativamente inferior a concentração de 200 µg/mL. Entretanto, o extrato etanólico não apresentou alta atividade antioxidante, visto que o valor de IC_{50} para esta amostra foi maior que 200 µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração Inibitória 50% do extrato, frações, subfrações e rutina de *Annona glabra* a base do teste TEAC.

Amostra	CI ₅₀ µg/mL
Extrato etanólico	> 200*
Fração hexânica	> 200
Fração metanólica	> 200
Grupo 2	> 200
Grupo 3	> 200
Grupo 4	> 200*
Grupo 5	94,59 ± 3,01*
Grupo 6*	> 200
Rutina	> 200

* Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes (Tukey)

O fracionamento do EE para obtenção de substância isolada contribuiu para o aumento da atividade antioxidante. Apesar de não haver diferença significativa de atividade antioxidante entre do EE, FM e rutina, observou-se que o Grupo 5 apresentou percentual de inibição do radical ABTS•⁺ significativamente superior em relação ao EE, o que demonstra que com o fracionamento do EE obteve-se subfração com melhor atividade antioxidante (Tabela 3).

Para o Grupo 5 os percentuais de inibição do radical nas concentrações 25, 50, 100 e 200 µg/mL foram significativamente superiores às concentrações 6,25 e 12,5 µg/mL (Figura 25). Esta amostra mostrou atividade antioxidante significativamente superior as demais amostras (CI₅₀=94,59 ± 3,01 µg/mL). Estudos para identificação deste grupo ainda precisam ser realizados.

A substância isolada rutina mostrou aumento do percentual de inibição do radical ABTS•⁺ em função do aumento da concentração da amostra. Nesse sentido, verificou-se que o percentual de inibição da rutina nas concentrações 6,25 e 12,5 µg/mL foram significativamente inferiores às concentrações 50, 100 e 200 µg/mL (Figura 26).

As amostras FH, FM, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4 e Grupo 6 não apresentaram diferença significativa em relação a sua capacidade antioxidante no teste TEAC sobre as demais amostras.

5.6 Capacidade antioxidante de acordo com a redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

Os resultados obtidos para o extrato, frações no teste DPPH• não apresentaram diferença significativa em nenhuma das amostras analisadas. A avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e TEAC fornece apenas algumas indicações da capacidade de certas substâncias de remover radicais livres e não indica o efeito do antioxidante sobre a sobrevivência celular (WU et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

Em todas as amostras avaliadas nas diferentes concentrações a capacidade antioxidante não foi significativa.

5.7 Análise Estatística

Com o objetivo de comparar médias das amostras (Tabelas 4 e 6) e suas concentrações nos testes TEAC E DPPH aplicou-se o teste ANOVA, obedecendo-se os critérios de igualdade de variância, avaliado através do teste de Levene e a normalidade dos dados com o teste de Smirnov Komolgorov. Para a análise de múltiplas comparações das variáveis utilizou-se o teste de Tukey (Tabela 5 e 7). Segue abaixo resultados das análises estatísticas.

Tabela 4: Média e desvios padrões do percentual de inibição do extrato etanólico, frações, subfrações e substância isolada rutina de *Annona glabra* pelo teste TEAC.

Grupo	Concentração µg/mL	Média	Desvio-padrão	Grupo	Concentração µg/mL	Média	Desvio-padrão
Extrato etanólico	6,25	35,14	1,49	Grupo 4	6,25	34,59	1,53
	12,50	34,38	1,91		12,50	32,80	1,24
	25,00	40,82	1,65		25,00	35,24	3,87
	50,00	40,34	2,90		50,00	34,88	2,93
	100,00	42,01	6,22		100,00	38,64	3,47
	200,00	45,78	7,44		200,00	38,47	5,88
Fração Hexânica	6,25	33,96	1,74	Grupo 5	6,25	37,08	3,75
	12,50	31,78	3,38		12,50	34,26	3,57
	25,00	33,00	2,85		25,00	40,41	2,17
	50,00	33,19	3,55		50,00	42,12	2,57
	100,00	33,75	2,81		100,00	51,85	3,40
	200,00	33,82	1,92		200,00	66,91	3,35
Fração metanólica	6,25	38,28	3,31	Grupo 6	6,25	38,86	5,15
	12,50	36,74	4,55		12,50	36,66	6,53
	25,00	37,89	6,64		25,00	37,70	5,86
	50,00	34,15	3,65		50,00	35,51	3,88
	100,00	37,98	1,79		100,00	34,54	1,92
	200,00	38,13	4,06		200,00	33,42	2,21
Grupo 2	6,25	34,78	2,42	Rutina	6,25	36,74	1,48
	12,50	33,07	2,05		12,50	33,91	2,41
	25,00	34,43	2,60		25,00	36,41	2,76
	50,00	32,79	1,98		50,00	40,37	2,61
	100,00	35,71	3,11		100,00	41,41	3,27
	200,00	33,55	4,62		200,00	41,44	4,02
Grupo 3	6,25	36,09	3,81				
	12,50	34,86	3,75				
	25,00	39,74	3,37				
	50,00	38,23	4,64				
	100,00	38,46	1,13				
	200,00	38,12	2,60				

* Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes avaliados pelo teste ANOVA.

Tabela 5: Múltiplas comparações entre as amostra de extrato, frações, subfrações e rotina obtidas de *Annona glabra* usadas no teste TEAC

Amostra (I)	Amostra (J)	Diferença entre as médias (I-J)	P	Amostra (I)	Amostra (J)	Diferença entre as médias (I-J)	P
Extrato etanólico	Fração Hexânica	6,4929*	p<0,0001	Grupo 2	Grupo 3	-3,5288*	0,0236
	Fração metanólica	2,5500	0,2621		Grupo 4	-1,7154	0,7746
	Grupo 2	5,6887*	p<0,0001		Grupo 5	-11,3838*	p<0,0001
	Grupo 3	2,1600	0,4908	Grupo 6	-2,0596	0,5575	
	Grupo 4	3,9733*	0,0057	Rutina	-4,3229*	0,0016	
	Grupo 5	-5,6950*	p<0,0001	Grupo 3	Grupo 4	1,8133	0,7172
	Grupo 6	3,6292*	0,0174		Grupo 5	-7,8550*	0,0000
	Rutina	1,3658	0,9256		Grupo 6	1,4692	0,8908
Fração hexânica	Fração metanólica	-3,9429*	0,0063	Rutina	-0,7942	0,9976	
	Grupo 2	-0,8042	0,9974	Grupo 5	-9,6683*	p<0,0001	
	Grupo 3	-4,3329*	0,0016	Grupo 4	Grupo 6	-0,3442	1,0000
	Grupo 4	-2,5196	0,2773		Rutina	-2,6075	0,2348
	Grupo 5	-12,1879*	p<0,0001	Grupo 5	Grupo 6	9,3242*	p<0,0001
	Grupo 6	-2,8638	0,1367		Rutina	7,0608*	p<0,0001
	Rutina	-5,1271*	0,0001	Grupo 6	Rutina	-2,2633	0,4243
Fração metanólica	Grupo 2	3,1388	0,0701				
	Grupo 3	-0,3900	1,0000				
	Grupo 4	1,4233	0,9073				
	Grupo 5	-8,2450*	p<0,0001				
	Grupo 6	1,0792	0,9814				
	Rutina	-1,1842	0,9671				

* Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes avaliados pelo teste de Tukey.

Tabela 6: Média e desvios padrões do percentual de inibição do extrato etanólico, frações, subfrações e substância isolada rutina de *Annona glabra* pelo teste DPPH.

Grupo	Concentração µg/mL	Média	Desvio-padrão	Grupo	Concentração µg/mL	Média	Desvio-padrão
Extrato etanólico	6,25	72,71	17,31	Grupo 4	6,25	73,55	20,55
	12,50	68,40	19,97		12,50	70,81	19,21
	25,00	61,91	25,25		25,00	68,94	22,09
	50,00	72,83	17,17		50,00	70,08	19,58
	100,00	70,06	21,51		100,00	72,80	18,35
	200,00	68,15	21,42		200,00	70,66	20,25
Fração Hexânica	6,25	71,71	19,82	Grupo 5	6,25	61,61	26,90
	12,50	71,50	18,68		12,50	70,63	15,07
	25,00	65,74	20,23		25,00	74,01	17,81
	50,00	72,62	17,79		50,00	72,41	19,80
	100,00	67,61	17,20		100,00	69,51	20,62
	200,00	70,72	12,71		200,00	68,36	21,27
Fração metanólica	6,25	73,43	19,73	Grupo 6	6,25	71,53	18,55
	12,50	68,61	17,37		12,50	72,32	17,66
	25,00	68,97	18,95		25,00	69,36	20,90
	50,00	68,09	21,00		50,00	65,83	23,01
	100,00	70,48	19,62		100,00	65,29	22,52
	200,00	74,40	16,69		200,00	71,92	18,35
Grupo 2	6,25	75,00	19,60	Rutina	6,25	73,83	20,33
	12,50	68,55	20,49		12,50	73,01	17,84
	25,00	68,22	20,00		25,00	68,12	22,62
	50,00	70,54	19,00		50,00	71,83	19,73
	100,00	72,29	17,74		100,00	73,67	17,19
	200,00	65,86	22,63		200,00	70,39	20,76
Grupo 3	6,25	73,16	17,44				
	12,50	67,70	20,82				
	25,00	70,33	17,84				
	50,00	73,34	17,75				
	100,00	70,21	18,53				
	200,00	71,71	17,62				

* Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes avaliados pelo teste ANOVA.

Tabela 7: Múltiplas comparações entre as amostra de extrato, frações, subfrações e rotina obtidas de *Annona glabra* usadas no teste DPPH.

Amostra (I)	Amostra (J)	Diferença entre as médias (I-J)	P	Amostra (I)	Amostra (J)	Diferença entre as médias (I-J)	P	
Extrato etanólico	Fração Hexânica	-0,9750	1,0000	Grupo 2	Grupo 3	-0,9992	1,0000	
	Fração metanólica	-1,6538	1,0000		Grupo 4	-1,0650	1,0000	
	Grupo 2	-1,0667	1,0000		Grupo 5	0,6550	1,0000	
	Grupo 3	-2,0658	1,0000		Grupo 6	0,7008	1,0000	
	Grupo 4	-2,1317	1,0000		Rutina	-1,7325	1,0000	
	Grupo 5	-0,4117	1,0000		Grupo 3	Grupo 4	-0,0658	1,0000
	Grupo 6	-0,3658	1,0000			Grupo 5	1,6542	1,0000
	Rutina	-2,7992	0,9999			Grupo 6	1,7000	1,0000
	Fração hexânica	Fração metanólica	-0,6788		1,0000	Rutina	-0,7333	1,0000
		Grupo 2	-0,0917		1,0000	Grupo 5	1,7200	1,0000
Grupo 3		-1,0908	1,0000	Grupo 4	Grupo 6	1,7658	1,0000	
Grupo 4		-1,1567	1,0000		Rutina	-0,6675	1,0000	
Grupo 5		0,5633	1,0000	Grupo 5	Grupo 6	0,0458	1,0000	
Grupo 6		0,6092	1,0000		Rutina	-2,3875	1,0000	
Rutina		-1,8242	1,0000	Grupo 6	Rutina	-2,4333	1,0000	
Fração metanólica	Grupo 2	0,5871	1,0000					
	Grupo 3	-0,4121	1,0000					
	Grupo 4	-0,4779	1,0000					
	Grupo 5	1,2421	1,0000					
	Grupo 6	1,2879	1,0000					
	Rutina	-1,1454	1,0000					

* Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes avaliados pelo teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

A seleção da espécie *A. glabra* para estudo se fundamentou em:

- Estudos etnobotânicos: espécies pertencentes ao gênero *Annona* são utilizadas no tratamento de tumor (BORGES, 2010; CHAVES et al., 2011; MELO et al., 2013).

- Estudo químico: de algumas espécies de *Annona* foram isolados flavonoides, como a rutina isolada de *A. glabra*, quercetina e catequinas isoladas de *A. muricata* (NAWWAR et al., 2012; GEORGE et al., 2014; BRIGIDO, 2016).

- Estudos farmacológicos: extratos obtidos de espécies de *Annona* ricos em composto fenólicos com alto potencial antioxidante contra uma variedade de espécies de radicais livres, além de capacidade protetora ao DNA (BARRECA et al., 2011; NAWWAR et al., 2012; GEORGE et al., 2014).

6.1 Obtenção e seleção das amostras

Com o fracionamento do extrato etanólico foi observado maior rendimento para a fração metanólica, sugerindo que o extrato contém majoritariamente constituintes de maior polaridade (Tabela 1). Alguns estudos fitoquímicos relatam o isolamento de alcaloides, acetogeninas e flavonoides, dos quais já foram descritas atividades citotóxica e antitumoral para alcalóides e acetogeninas (CHEN e al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; PARDHASARADHI et al., 2005; COSTA et al., 2011).

De extratos metanólicos de folhas de *A. crassiflora*, *A. warmingiana* e *A. tomentosa* foram isolados flavonoides como: kaempferol-3- O-glicosídeo, quercetina-3-O-arabinosídeo, O- glicosídeos de quercetina, kaempferol e luteolina (Figura 2-E, D e F) (SANTOS E SALATINO, 2000). Flavonoides glicosilados possuem maior polaridade e podem estar presentes no extrato etanólico e na fração metanólica.

Além de flavonoides, estas podem conter acetogeninas, visto ter sido isolado este metabólito do extrato metanólico obtido de folhas de *A. cherimolia*, sendo isoladas as seguintes substâncias: esquamocina, itrabina, querimolina -1, neonanonina e asimicina (COLOM et al., 2007). Também do extrato metanólico de *A. purpúrea* já foram isolados os alcaloides: estefarina, glaziovina e promucosina através de partição entre clorofórmio e água, seguido de extração com 3% de ácido clorídrico da fração clorofórmica (CHANG et al., 2000).

Em síntese, a composição química do extrato etanólico de *A. glabra* pode ser complexa, podendo conter flavonoides, alcaloides, acetogeninas entre outros metabólitos secundários. As acetogeninas isoladas de *A. glabra* annoglaxina e 27-hidroxiullatacina (Figura 6-A e B) apresentaram atividade antitumoral em linhagem celular de hepatoma humano (CHEN et al., 2004), células tumorais de mama, rim, próstata e pâncreas (LIU et al., 1999). Outras acetogeninas mostraram-se ativas em linhagens de células tumorais de mama (MCF-7) e leucemia (K-562; PARDHASARADHI et al., 2005).

A atividade antitumoral dos alcaloides tem sido amplamente relatada (ALMEIDA et al., 2005; MOHAN et al., 2012; MOREIRA et al., 2015). Inclusive, os alcaloides vimblastina e vincristina são utilizados para o tratamento do câncer (ALMEIDA et al., 2005).

Como sugerido no estudo de Brígido (2016), o extrato etanólico, fração metanólica, fração hexânica e grupos 2 e 3 de *A. glabra* apresentaram sinais sugestivos de flavonoides na análise em CLAE-DAD. De *Annonaceae* foram isolados e identificadas cerca de 76 flavonas e flavonóis, a sendo a maior parte glicosídeo e com polaridade intermediária (isovitexina, vitexina, isoorientina entre outros. (MEDEIROS E KANIS, 2010). Todos os fenóis encontrados foram glicosídeos de flavonas (apigenina, scutellareina, hispidulina e luteolina) ou flavonóis (canferol, ramnocitrina, 6-hidroxiiramnocitrina, quercetina, isoramnetina e ramnetina), com predominância deste último, sobressaindo-se a quercetina (SOARES et al., 2000; SANTOS E SALATINO, 2000). Estes flavonóides são pouco solúveis em água, porém muito solúveis em etanol e metanol (MEDEIROS E KANIS, 2010). Logo, os flavonóides presentes no EE, FM e subfrações, provavelmente, possuem polaridade intermediária.

Flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários vegetais e têm sido associados a capacidade antioxidante (RICE-EVANS et al., 1995; GÜLÇİN, 2012; DAI e MUMPER, 2010; ARAÚJO, 2013). Flavonoides isolados de *A. crassiflora* como quercetina, isoramnetina, campferol e seus derivados C- ou O- glicosídeos demonstraram atividade antioxidante utilizando os métodos DPPH e β -caroteno (LAGE, 2011). Compostos fenólicos impedem a ação dos radicais livres no organismo e, uma vez que protegem moléculas como o DNA, podem vir a bloquear alguns processos carcinogênicos (SILVA et al., 2010).

Um fato relevante é que nas cascas coletadas para este estudo verificou-se a presença de fungos. Muitos fungos que crescem em plantas utilizam mecanismos de defesa para reduzir a concentração de compostos aromáticos, como alcaloides e flavonoides, produzidos por estas plantas, visto que muitos desses compostos aromáticos são tóxicos em pequenas concentrações para muitos fungos (MÄKELÄ et al., 2015). Isto poderia justificar a identificação de compostos com características de flavonoides em grandes quantidades no extrato metanólico das cascas de *A. glabra*, ou seja, devido a região em que o material vegetal foi coletado ter características de elevados percentuais de umidade, isto favoreceria o crescimento de fungos, e estes, por conseguinte, através de adaptações de defesa, possam estar desviando a rota de síntese dos alcaloides.

6.2 Avaliação da citotoxicidade

Conforme dito anteriormente, em espécies de *Annona* já foram isolados metabólitos como alcaloides, acetogeninas e flavonoides. A atividade inibitória de acetogeninas em linhagens de células tumorais de mama já foram descritas em outros estudos (OBERLIES, 1997). No presente estudo avaliou-se, inicialmente, a citotoxicidade sobre a linhagem de células tumorais de mama (4T1) e em seguida investigou se a fragmentação do DNA e apoptose. O Fluxograma abaixo sumariza o desenho experimental utilizado neste estudo (Figura 27).

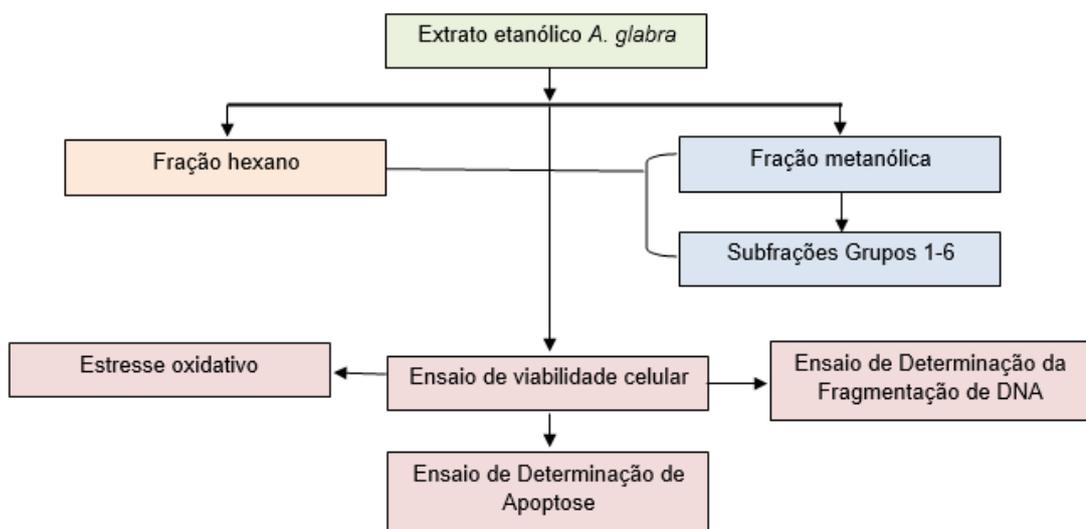


Figura 27: Fluxograma das etapas de desenvolvimento dos experimentos.

Na literatura, a atividade antitumoral através dos mecanismos de indução de apoptose de outras espécies *Annona* têm sido atribuída a metabólitos terpenos, acetogenina (ZHANG et al., 2004; YUAN et al., 2006). Para *A. glabra* poucos trabalhos relacionam a atividade antitumoral aos mecanismos de indução de apoptose, contudo, estudos vem demonstrando que a presença de flavonoides em extratos de plantas apresentam a capacidade de prevenir a indução de apoptose (RUVO et al., 2000; BETTUZZI et al., 2007; MARTÍN et al., 2008). Portanto, estudos relacionando a capacidade citoprotetora de frações de *A. glabra* enriquecidas de flavonoides precisam ser realizados.

O extrato etanólico de *A. glabra* foi fracionado, evidenciando que este processo foi benéfico para o aumento do potencial citotóxico. A fração hexânica apresentou maior potencial citotóxico ($CI_{50} = 45,07 \mu\text{g/mL}$) em relação ao extrato etanólico ($CI_{50} = 137,7 \mu\text{g/mL}$). Sabe-se que a fração hexânica, provavelmente, é constituída por substâncias de menor polaridade, logo, atravessam facilmente a membrana celular e chegam ao seu local de ação (citoplasma ou núcleo) (CONTE, 2002). Estudos através de CLAE-DAD da fração hexânica de *A. glabra* evidenciaram sinais com tempo de retenção semelhante ao extrato etanólico e seus espectros de UV iguais, sugerindo presença de flavonoides nesta fração (BRÍGIDO, 2016).

Pimenta (1995), após realizar partição entre hexano e metanol aquoso do extrato de éter de petróleo das sementes de *A. crassiflora* conseguiu isolar através de cromatografia de adsorção de sílica os esteroides β -sitosterol e estigmasterol (Figura 2-G e H), a acetoargenina crassiflorina (Figura 4-H), além de identificar frações contendo misturas de acetogeninas. Considerando-se as características relativas a polaridade do extrato de éter de petróleo, bem como a fração hexânica, pode-se supor que a fração hexânica obtida a partir do extrato etanólico das cascas de *A. glabra* apresente conteúdo considerável de acetogenina, o que justificaria a atividade inibitória observada no teste de viabilidade celular.

Em contrapartida, a fração metanólica apresentou potencial citotóxico ($CI_{50} = 139,04 \mu\text{g/mL}$) comparável ao extrato etanólico ($CI_{50} = 137,7 \mu\text{g/mL}$). Estudos em CLAE-DAD realizados com o extrato etanólico e fração metanólica de *A. glabra* demonstraram espectros de UV sugestivos de flavonoides (BRIGIDO, 2016).

Do extrato de metanol aquoso de folhas e ramos *Miliusa balansae* de (Annonaceae) foram isolados os flavonoides ombuine, chrysofenol B, pachypodol e

chrysofenol C; os quatro compostos apresentaram atividade inibitória para as linhagens tumorais KB (Carcinoma Epidermoide humano), Hep-G2 (Hepatoma-G2) e RB (RABDOSARCOMA; HUONG et al., 2005).

O fracionamento da fração metanólica de *A. glabra* objetivou obter subfrações ricas em flavonoides. Os efeitos, preventivo e inibidor, no desenvolvimento de cânceres são atribuídos aos flavonoides encontrados em diversas plantas da família *Annonaceae*, portanto, esperava-se que subfrações ricas em flavonoides apresentassem maior citotoxicidade (HU et al., 2007).

No estudo de Brígido (2016) em CLAE-DAD as subfrações 7 e 8 (Grupos 2 e 3, respectivamente) apresentaram espectros sugestivos de flavonoides, por conseguinte estas não apresentaram potencial citotóxico ($CI_{50} > 200\mu\text{g/mL}$; Tabela 2), assim como a substância isolada rutina, um flavonoide considerado potente antioxidante e com efeito protetor contra pro-carcinógenos (MARCARINI et al, 2011).

As subfrações 6, 11, 15 e 20, pertencentes aos grupos 1, 4, 5 e 6, respectivamente, apresentaram pequenos percentuais de inibição a $100\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). No estudo de Brígido (2016) foi observado que estas subfrações não foram ativas para *Leishmania amazonensis*, no entanto, em concentrações entre 100 e $200\mu\text{g/mL}$, foram verificados pequenos efeitos de inibição, o que pode sugerir a presença destes compostos nestas subfrações, mas em pequenas quantidades.

O comportamento citoprotetor subfração 9 em baixas concentrações (Figura 20) pode estar relacionado a presença da substância flavan-3-ol, como foi sugerido na análise do EE de *A. glabra* por CLAE-DAD realizada no estudo de Brígido (2016). A ingestão de flavonoides, entre eles a catequina flavan-3-ol pode estar associada a redução do risco de câncer de pâncreas em pacientes fumantes (BOBE et al., 2008). Embora haja evidências de que dietas rica em flavonoides possam contribuir para a saúde, não há certezas sobre as quantidades e condições de uso ideais, uma vez que o flavonoides podem ser substâncias potencialmente perigosas (MARCARINI, 2013). Estudo vem demonstrando que tratamentos prolongados com concentrações elevadas de flavonoides induziram a apoptose (KIM e JANG, 2009).

A redução do risco de câncer renal pode estar associada à ingestão de vegetais ricos em flavonoides (BOSETTI et al., 2007).

Pesquisa realizada com flavonoides isolados do extrato metanólico de *Annona dioica* confirmou o efeito anti-oxidante, antitumoral, hipoglicemiante e anti-inflamatório (FORMAGIO et al., 2015). Os flavonoides ombuina, crisosfenol, paquipodol e

crisosfenol C foram citotóxicos para as linhagens KB (Carcinoma epidermoide humano), Hep-G2 (Hepatoma-G2) e RD (Rabdossarcoma). Entre elas, o paquipodol teve atividade muito elevada contra as linhagens KB ($CI_{50}=0,7 \mu\text{g/mL}$) e Hep-G2 ($CI_{50}=0,55 \mu\text{g/mL}$) (HUONG et al., 2005).

Estudos tem indicado que o estresse oxidativo pode apresentar um duplo papel, no qual em uma delas o aumento do estresse oxidativo aumenta a taxa de crescimento do tumor e promove futuramente a tumorigênese. Entretanto, este mesmo aumento do estresse oxidativo pode potencializar o efeito de agentes terapêuticos produtores de ERO, como o paclitaxel (MATEESCU et al., 2011). Portanto, estes estudos trazem outras perspectivas sobre o efeito positivo da suplementação com doses terapêuticas de antioxidantes em tratamentos do câncer (MATEESCU et al., 2011; GOODMAN et al., 2011). Isto é resultado de discrepâncias existentes entre estudos experimentais com animais ou linhagens celulares de câncer e ensaios clínicos pra estudos humanos no que diz respeito a associação de substâncias antioxidantes e o risco de câncer (MYUNG et al., 2010).

6.3 Integridade da membrana plasmática (Detecção de Apoptose)

A apoptose é caracterizada pela diminuição do volume celular, condensação da cromatina e formação dos corpos apoptóticos (KANNAN e JAIN, 2000). A externalização da FS na superfície de células apoptóticas ocorre antes da fragmentação de DNA e da formação de vesículas da membrana plasmática, marcando células em estágio de apoptose inicial, enquanto que o aumento progressivo da permeabilidade da membrana plasmática, é uma alteração morfológica típica de células apoptóticas tardias ou inviáveis (BLANKENBERG et al. 1998; BOUDET et al., 1996; PALMA, 2005).

A análise por citometria de fluxo evidenciou que nenhuma das amostras analisadas induziu as células à apoptose (Tabela 3). Tal fato pode ser explicado devido a presença de flavonoides, como foi indicado na análise em CLAE-DAD do EE, FM, FH e Grupo 3 do qual foi isolada a substância rutina, realizado no estudo de Brígido (2016).

Flavonoides têm apresentado potencial uso na prevenção da apoptose. Um exemplo é o flavonoide quercetina que protege células contra a apoptose induzida por H_2O_2 via modulação de disfunção mitocondrial (PARK et al., 2003; DORTA, 2007).

Estudos demonstram que a rutina em baixas concentrações potencializa as defesas antioxidantes das células, mesmo na ausência de qualquer substância de espécies reativas de oxigênio, exercendo assim, atividade antioxidante indireta e, conseqüentemente, podendo atuar impedindo ou retardando o estresse oxidativo celular que pode induzir a apoptose (SHEN et al., 2003; MARCARINO, 2013).

Na citometria de fluxo, a redução do volume celular e o aumento da granulosidade das células apoptóticas podem ser avaliados a partir de modificações nos padrões FSC (forward scatter) e SSC (side scatter) de dispersão da luz, respectivamente (BROWN et al., 1993).

Neste estudo, observou-se que apesar de EE não induzir células 4T1 a apoptose, o mesmo promoveu modificações relacionadas a redução do tamanho das células (Tabela 3). De diversas espécies de *Annona* já foram identificados metabólitos como alcaloides, acetogeninas, terpenos, carboidratos, flavonoides lipídeos e ácidos aminados (FERELLI et al, 2005; LUNA, 2006). Devido esta complexidade de compostos bioativos presentes em plantas do gênero *Annona*, pode-se sugerir que alterações na morfologia de linhagens celulares esteja relacionada a presença de outros metabólitos secundários que estejam presentes no extrato em menor quantidade.

A substância rutina isolada de *A. glabra* também mostrou alterações na morfologia das células tratadas (Tabela 3). Neste caso, a substância promoveu redução do tamanho das células e aumento da granulosidade. Modificações na morfologia das células provocadas pela rutina. No estudo de Santos (2011) o flavonoide rutina induziu modificações morfológicas após 48h de tratamento de células da linhagem GL-15, tendo essas células apresentado modificações como contração do corpo celular e um fenótipo bipolar com a emissão de finos prolongamentos citoplasmáticos.

A FH, embora não tenha sinalizado para a indução de apoptose através da marcação com Anexina V e IP, apresentou um maior potencial citotóxico ($CI_{50}=45,07\mu\text{g/mL}$) em relação as demais amostras avaliadas, e ainda promoveu alterações consideráveis na morfologia das células, reduzindo tamanho e granulosidade das mesmas (Tabela 3). No estudo de Pimenta (1995) foram isolados de *A. crassiflora* diversas acetogeninas a partir da fração de éter de petróleo. Tendo em vista as características de polaridades das frações, pode-se sugerir que haja a presença de acetogeninas em baixos níveis na FH de *A. glabra*.

O mecanismo de ação de atividade citotóxica de acetogeninas está relacionado com a inibição da NADH oxidase da membrana plasmática da célula tumoral e da membrana interna mitocondrial. Este mecanismo inibe a fosforilação oxidativa, resultando na diminuição dos níveis de ATP celular e inibindo a proliferação das células tumorais (TORMO et al., 2003).

Morfologia das células Retração celular, condensação da cromatina, degradação de membranas celulares e fragmentação internucleossômica do DNA são algumas das características morfológicas das células que são alteradas (CAMPAGNARO, 2012).

Em relação as subfrações 17 e 19 (Grupo 6), estas não induziram as células à apoptose, tampouco promoveram alterações na morfologia das células. Portanto, sugere-se que o potencial citotóxico moderado indicado para estas subfrações não esteja relacionado à indução de apoptose.

6.4 Fragmentação de DNA

Como observado pela análise dos resultados anteriores, o mecanismo envolvido no potencial citotóxico das amostras de *A. glabra* não envolvem a indução de apoptose, portanto, analisou-se a capacidade de fragmentação de DNA daquelas que apresentaram potencial citotóxico moderado.

Substâncias genotóxicas invadem o núcleo de células e causam danos aos ácidos nucleicos. Portanto, genotoxicidade é uma propriedade possuída por algumas substâncias que as torna nocivas para as informações genéticas de um organismos. Estas mudanças podem ser observadas usando a fragmentação de DNA (JOHANSSON, 2009).

A FH apresentou capacidade de fragmentação de DNA (87,19% de DNA fragmentado) superior ao controle positivo (52,79%). Confirmando que o mecanismo envolvido no potencial citotóxico desta amostra não é apoptose, entretanto, a possível presença de metabólitos como acetogeninas poderia justificar a intensa fragmentação do DNA das células (Tabela 8).

As subfrações 6 e 7 (Grupos 1 e 2, respectivamente), apresentaram fragmentação de DNA (46,87% e 57,71%, respectivamente) comparável ao controle

positivo (52,79%), no entanto, apenas a subfração 7 apresentou espectros sugestivo de flavonoides segundo o estudo de Brígido (2016; Tabela 8).

Flavonoides são reportados por exibir uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante e de captura de radicais livres. Entretanto, em altas concentrações, também são capazes de exercer ação pró-oxidante, incluindo a formação de radicais (LAUGHTON et al., 1989; CAO et al., 1997; O'BRIEN et al., 2000). Estudos tem demonstrado que baixas concentrações de flavonoides podem estabilizar a fita dupla de DNA, enquanto que a desestabilização da dupla hélice de DNA pode ocorrer após incubação por longos períodos com alto teor de flavonoides (KANAKIS et al., 2005).

As subfrações 17 e 19 apresentaram taxa de fragmentação de DNA não representativa, o que indica que o mecanismo envolvido no seu potencial citotóxico não esta relacionado à apoptose ou fragmentação de DNA.

Tabela 8. Resultados de Indução de apoptose e Fragmentação de DNA por citometria de fluxo.

Amostra	Anexina V	IP	Anexina V e IP	FSC e SSC (R1)	Fragmentação de DNA
Controle Negativo	0,11%	5,46%	0,25%	71,66%	Nd
Controle Positivo	0,02%	13,69%	2,72%	1,39%	93,65%
Extrato Etanólico*	6,78%	5,31%	2,58%	39,54%	Nd
Fração Metanólica*	13,46%	0,72%	2,71%	13,82%	Nd
Fração Hexânica	0,40%	3,59%	0,51%	22,39%	12,81%
Subfração 6	Nd	Nd	Nd	Nd	49,87%
Subfração 7	Nd	Nd	Nd	Nd	57,71%
Subfração 17	0,18%	9,68%	0,59%	69,15%	93,53%
Subfração 19	0,40%	5,69%	0,53%	74,29%	80,89%
Rutina*	10,11%	2,43%	0,67%	56,96%	Nd

Legenda: IP – Iodeto de Propídeo; FSC - *Forward Scatter* (volume celular); SSC – *Side Scatter* (granulosidade celular); Nd – não determinado.

* Ensaio realizado em outro equipamento, com outros controles. **Controle negativo** (Anexina V - 11,65%; IP – 2,43%; Anexina V e IP – 1,04; FSC e SSC – 82,4%); **Controle Positivo** (Anexina V – 26,8%; IP – 3,0%; Anexina V e IP – 14,4%; FSC e SSC – 13,82%).

6.5 Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)

Os valores do TEAC e da porcentagem de inibição da solução de ABTS•+ demonstram a capacidade relativa de uma amostra antioxidante de doar átomos de hidrogénio ou elétron para eliminar o cátion radical ABTS•+ (EREL, 2004).

Para o EE, apesar da diferença significativa entre as menores concentrações (6,25 e 12,5 µg/mL) apresentar diferença significativa em relação a maior concentração (200 µg/mL), esta amostra V apresentou baixa atividade antioxidante.

Estudos de avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico das cascas de *A. crassiflora* ($CI_{50} = 42,82 \mu\text{g/mL}$) demonstrou que estes apresentam polifenóis com excelente capacidade antioxidante (ROESLER et al., 2007). Os extratos aquoso e hidroalcoólico de *A. muricata* através do método TEAC mostrou baixa atividade antioxidante ($CI_{50} = 11,5\% \pm 2,3$ e $13,6\% \pm 6,1 \mu\text{g/mL}$).

Entretanto, o fracionamento do EE mostrou-se benéfico para a atividade antioxidante, evidenciando que o grupo 5 mostrou melhor capacidade antioxidante em relação ao EE. O fracionamento de extratos de plantas para avaliação da capacidade antioxidante é importante, uma vez que possibilita maior concentração de substâncias com capacidade antioxidante (IHA et al., 2007; ARAÚJO, 2013).

Para a amostra de rutina observou-se que apesar baixa capacidade antioxidante, esta apresentou aumento significativo da capacidade antioxidante conforme o aumento da concentração da amostra. A rutina é um dos flavonoides mais estudados devido a sua diversidade de propriedades farmacológicas (PEDRIALI, 2005). Estudos já observaram que a rutina apresenta atividade antioxidante considerável, sendo este efeito relacionado ao tratamento de patologias que envolvam radicais livres, sem promover toxicidade potencial (AFANAS'EV et al., 1989). A capacidade antioxidante de composto fenólicos e flavonoides pode estar relacionada a sua capacidade de atuar como doadores de átomos de hidrogênio (GALLEANO et al., 2010).

6.6 Capacidade antioxidante de acordo com a redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

A ausência de diferença significativa entre os resultados obtidos no teste DPPH mostra a falta de especificidade do método, e por isso, há a necessidade de utilização de mais de uma técnica analítica para a avaliação da capacidade antioxidante.

O radical catiônico ABTS é mais reativo que o radical DPPH, logo a reação ocorre completamente após 1 minuto. Esses métodos são úteis para a busca de novos antioxidantes, mas não quando se pretende valorizar extratos com solventes, pois os solventes alteram fatores que são importantes para a atividade antioxidante como polaridade, solubilidade e atividade quelante de metais (PEREIRA, 2010). Os resultados de determinação do TEAC são dependentes do tempo de incubação assim como a taxa da amostra quantificada, portanto esta dependência somada a pouca

seletividade do radical catiônico ABTS na reação com átomos doadores de hidrogênio podem justificar a maior expressão de resultados significantes do teste TEAC em relação ao teste DPPH (DARONCHO et al., 2012).

7 CONCLUSÃO

O fracionamento do extrato etanólico de *A. glabra* contribuiu para o potencial citotóxico, visto que apresentou a fração hexânica como a mais promissora, comparada às demais amostras, para esta finalidade. Por outro lado, a capacidade antioxidante também foi favorecida com o fracionamento do extrato etanólico e da fração metanólica, uma vez que foi evidenciado que o grupo 5 apresentou a melhor capacidade antioxidante. As amostras avaliadas não induzem células a apoptose, entretanto, a rutina foi capaz de promover modificações no tamanho e granulosidade das células.

Portanto, nota-se que mesmo a *A. glabra* ter como metabólito majoritário flavonoides, que são substâncias muito conhecidos pela sua capacidade antioxidante, há a presença ainda que em menor quantidade de outros metabólitos que podem representar riscos de toxicidade às células. Sendo assim, o cuidado na utilização de produtos naturais como adjuvantes na terapia do câncer é fundamental, devido a falta de especificações sobre quantidades e manejo adequados destes produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMI, H.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. (Ed.). **Textbook of Cancer Epidemiology**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2008.
- AFANAS'EV, I. B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p.1763-1769, jun. 1989.
- AJILA, C.M.; BHAT, S.G.; RAO, U.J.S. Prasada. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p.1006-1011, jan. 2007.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINAI, L. C. B.; MONTANARII, C. A.; DONNICII, C. L.; LOPESI, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p. 118-129, 2005.
- ALONSO-SALCES. R. M.; BARRANCO. A.; ABAD. B.; BERRUETA. L. A.; GALLO. B.; VICENTE. F. Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.2938-2952, 2004
- ALVES, T. M.; CHAVES, P. P.; SANTOS, L. M.; NAGEM, T. J. MURTA, S. M.; CERAVOLO, L. P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Tripanossoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 61, n. 1, p. 85-87, 1995.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, ano V, n. 12, 2007.
- AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington DC, v.90,n.17, p.7915-7922, 1993
- ARAÚJO, C. S. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2013. 198p.
- ARAYA, H. Studies on annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* L. seeds. **Bulletin of National Institute for Agro-Environmental Sciences**,v 23, p 77-149, 2004.
- ASARE, G.A.; AFRIYIE, D.; NGALA, R.A.; ABUTIATE, H.; DOKU, D.; MAHMOOD, S.A.; RAHMAN, H. Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. on the prostate, BPH-1 cells, and some target genes. **Integrative Cancer Therapies**. v 14, n.1, p 65-74, 2015.
- BALLIET, R. M. et al. Mitochondrial oxidative stress in cancer-associated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth. **Cell Cycle**, [s.l.], v. 10, n. 23, p.4065-4073, dez. 2011.
- BARRECA, D. et al. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p.2302-2310, ago. 2011.
- BARTKOVA, J. et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**, v. 434, n. 7035, p.864-870, 14 abr. 2005.
- BERMEJO, A.; FIGADÉRE, B.; ZAFRA-POLO, M. C. BARRACHINA, I. Acetogenins from Annonaceae: recente progressin isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Productis Reporter**. v. 22, p. 269-303, 2005.

- BETTUZZI, S.; RIZZI, F.; BELLONI, L. Clinical relevance of the inhibitory effect of green tea catechins (GtCs) on prostate cancer progression in combination with molecular profiling of catechin-resistant tumors: an integrated view. **Pol J Vet Sci**, v. 10, p. 57–60, 2007
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p.123-130, ago. 1999.
- BLANKENBERG, F. G. et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p.6349-6354, 26 May 1998.
- BLOCK, L. C.; SANTOS, A. R. S.; SOUZA, M. M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, M. A.; MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 61, p 85-89, 1998.
- BLOIS, S. M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-200, 1958.
- BOBE, G.; WEINSTEIN, S. J.; ALBANES, D.; HIRVONEN, T.; ASHBY, J.; TAYLOR, P. R.; VIRTAMO, J.; STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z. Flavonoid intake and risk of pancreatic cancer in male smokers (Finland). **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**. v.17, n.3, p.553-562, 2008
- BONNER, William M. et al. γ H2AX and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 12, p.957-967, 13 nov. 2008.
- BORGES, B. M. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas na região sul do estado de santa catarina para o tratamento do câncer**, (Monografia),Criciúma, 2010 .
- BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, N.12; Pág. 1-20, 2011.
- BOSCOLO, O.H.; VALLE, L.S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, v. 63, n. 2, p. 263-277, 2008.
- BOSETTI, C.; ROSSI, M.; MCLAUGHLIN, J. K.; NEGRI, E.; TALAMINI, R.; LAGIOU, P.; MONTELLA, M.; RAMAZZOTTI, V.; FRANCESCHI, S.; LAVECCHIA, C. Flavonoids and the Risk of Renal Cell Carcinoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, v. 98, 2007.
- BOUDET, F., LECOEUR, H., GOUGEON, M.L. Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation in potential cytotoxic CD8+T lymphocytes during HIV infection. **J. Immunol.**, Baltimore, v.156, n.6, p.2282-2293, 1996.
- BOUWMAN, P.; JONKERS, J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 9, p.587-598, 24 ago. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia**/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde – Brasília, 2014.
- BRIGIDO, H. P. C. Estudo fitoquímico e atividade antipromastigota de de *Annona glabra* (Annonaceae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.
- BRINGMANN, G.; RÜCKERT, M.; MESSER, K.; SCHUPP, O.; LOUIS, A. M. Acetogenic isoquinoline alkaloids CXXI. Use of the on-line high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry coupling in phytochemical screening studies: rapid identification of metabolites in *Dioncophyllum thollonii*. **Journal of Chromatography A**, v. 837, p. 267-272, 1999.

- BROWN, D. G.; SUN, X. M.; COHEN, G. M. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.3037-3039, 1993.
- CAMPAGNARO, B. P. Utilização da Citometria de Fluxo para Análise do Efeito da Hipertensão Renovascular 2r1c sobre Células Sanguíneas, Endoteliais e da Medula Óssea de Camundongos. (**Tese de Doutorado**). Universidade Federal do Espírito Santo. 159p. Vitória, 2012.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L.. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 22, n. 5, p.749-760, jan. 1997.
- CARRASCO-POZO, C., GOTTELAND, M., SPEISKY, H.. Protection by apple peel polyphenols against indomethacin-induced oxidative stress, mitochondrial damage and cytotoxicity in Caco-2 cells. **J. Pharm. Pharmacol.**, 62, p. 943–950, 2010.
- CHANG, F. R.; YANG, P. Y.; LIN, J. Y.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 437-439, 1998.
- CHANG, F.R; CHEN, C. Y.; WU, P. H.; KUO, R. Y.; CHANG, Y. C.; WU, Y. C. New alkaloids from *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.746-748, 2000.
- CHAO-MING, L. Cyclopeptide from the seedes of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 521-523, 1997.
- CHAVES, M. S.; DANTAS, F. M.; FONTES, L. S.; CHAVES, R. S.; KINUPP, V. F. Etnobotânica em uma comunidade ribeirinha do Careiro Castanho, AM, Brasil. **Cadernos de Agroecologia** v 6, n. 2, 2011.
- CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; CHO, C. P.; WU, Y. C. Ent-kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**. v. 63, n. 7, p. 1000-1003, 2000.
- CHEN, C. H.; HSIEH, T. J.; LIU, T. Z.; CHERN, C. L.; HSIEH, P; Y.; CHEN, C. Y. Annoglabayin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annomontacin from fruits of *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1942-1946, 2004.
- CICIJA, A.; ELLEDGE, S. J.. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p.179-204, out. 2010.
- COCHRANE, C. B.; RAVEENDRAN, P. K. N.; MELNICK, S. J.; RESEK, A. P.;RAMACHANDRAN, C. Anticancer Effects of *Annona glabra* Plant Extracts in Human Leukemia Cell Lines. **Anticancer Research**, v 28, p 965-972, 2008.
- COHEN, M.F., MEZIANE, T., TSUCHIYA, M., YAMASAKI, H. Feeding deterrence of *Azolla* in relation to deoxyanthocyanin and fatty acid composition. **Aquatic Bot.**, in press., 2002.
- COLOM, O. Á.; NESKE, A.; POPICH, S.; BARDÓN, A. Toxic Effects of Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimólia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v. 80, n.1, p. 63-67, 2007.
- CONTE, C. M. Transporte através das Membranas Biológicas. Centro Universitário de Brasília. (Monografia), 28p. Brasília, 2002.
- COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; JESUS, H. C. R.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; SALVADOR, M. J.; PRATA, A. P. N. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, 34., 2011, Florianópolis. Anais.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M.; FARIAS, P. A; VIANA, G. S; CUNHA, K. M; PESSOA, C; MORAES, M. O; SILVEIRA, E. R; GRAMOSA, N. V; RAO, V. S. The

- cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene. **Toxicol**, v. 40, p 1231-1234, 2002.
- COTTON, M.F., IKLE, D.N., RAPAPORT, E.L., MARSCHNER, S., TSENG, P.O., KURRELE, R., FINKEL, T.H. Apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells isolated immediately ex vivo correlates with disease severity in human immunodeficiency virus type 1 infection. **Pediatr Res**, v. 42, p. 656–664, 1997.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.
- 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, ago. 2005.
- CROAT, T. *Flora of Barro Colorado Island*. Stanford University Press, Stanford. 943 pp. 1978
- CURTIN, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 12, p.801-817, 23 nov. 2012.
- DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. **Revista Matéria**, v. 12, n. 1, p. 134 – 139, 2007.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p.7313-7352, 21 out. 2010.
- DARONCHO, M.; FOGAÇA, A. O.; SOLDERA, C. ; FIORAVANTE, J. B. Quantificação da atividade antioxidante através de análises pelos métodos dpph e abts. In: **Seminário de Nutrição da UNIFRA**, 2012, Santa Maria. Seminário de Nutrição da UNIFRA, 2012.
- DHILLON, A S et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p.3279-3290, 14 maio 2007.
- DISEASES. Cancer Multidrug Resistance. In. **Nature America Inc**. v. 18, 2000.
- DORTA, D. J. Efeito citoprotetor e/ ou citotóxico dos flavonoides: estudo estrutural-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose. Tese (Doutorado). 134p. Ribeirão Preto, 2007.
- DURET, P.; HOCQMULLER, R.; CAVÉ, L. Bulladecin and Atemotetro, two bis-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona atemoya* seeds. **Phytochemistry**, v.48, p 499-506, 1998.
- EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry** , v. 37, n. 4, p.277-285, abr. 2004.
- FERELLI, C.; NEPOMUCENO, M. F. Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de graviola (*Annona muricata*) e suas frações. In: **3º Congresso de Pesquisa**, Piracicaba. 3a Mostra Acadêmica da UNIMEP, 2005.
- FIGUEIRA, M. S.; SÁ, L. A.; VASCONCELOS, A. S.; MOREIRA, D. R.; LAURINDO, P. S. O. C.; RIBEIRO, D. R. R.; SANTOS, R. S.; GUZZO, P.; DOLABELA, M. F.; PERCÁRIO, S. Nutritional supplementation with the mushroom *Agaricus sylvaticus* reduces oxidative stress in children with HIV. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, v. 25, n. 5, p. 257- 264, 2014.
- FILARDI, M. A. **Potencial Antitumoral de extratos da própolis brasileira e de folhas de graviola (*Annona muricata*) efeito citotóxico sobre células hepatocarcinogênicas HEPG2**. 2010. 140f. (Dissertação Magister Scientiae) Viçosa, 2010.
- FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 18, n.1, p. 177-190, 2004.

- FORMAGIO, A.S.N.; VIEIRA, M.C.; VOLOBUFF, C.R.F.; SILVA, M.S.; MATOS, A.I.; CARDOSO, C.A.L.; FOGGIO, M.A.; CARVALHO, J.E. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.48, n.4, Ribeirão Preto, 2015.
- FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Annonaceae essential oils: a review. **Journal of Essential Oil Research**. v. 11, p. 131-142, 1999.
- GALLARDO, T.; ARAGON, R.; TORMO, J. R.; BLAZQUEZ, M.A.; ZAFRA-POLO, C.; CORTES, D. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry**. v 47, p 811-816, 1998.
- GALLEANO, M. et al. Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, v. 501, n. 1, p.23-30, set. 2010.
- GALUCIO, N. C. R. **Estudos Fitoquímicos, Citotoxicidade E Genotoxicidade De *Eleutherine Plicata* Herb.**, 2014, 90f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2014
- GEORGE, V. C. et al. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. **J Food Sci Technol**, v. 52, n. 4, p.2328-2335, 25 fev. 2014.
- GERALD, D. et al. JunD Reduces Tumor Angiogenesis by Protecting Cells from Oxidative Stress. **Cell**, v. 118, n. 6, p.781-794, set. 2004.
- GERAN, R.I., GREENBERG, N. H., MACDONALD, M. M., SCHUMACHER, A. M., ABBOTT, B. J. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Cancer Chemoth Rep**. 3: 1-102, 1972.
- GIUNTA, S.; JACKSON, S. P. Give me a break, but not in mitosis. **Cell Cycle**, v. 10, n. 8, p.1215-1221, 15 abr. 2011.
- GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica in vitro de produtos naturais**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 2008.
- GOODMAN, M. et al. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: Past, present, and future. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 51, n. 5, p.1068-1084, set. 2011.
- GORGOULIS, V. G. et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature**, v. 434, n. 7035, p.907-913, 14 abr. 2005.
- GRUOSSO, T. et al. Chronic oxidative stress promotes H2AX protein degradation and enhances chemosensitivity in breast cancer patients. **Embo Molecular Medicine**, v. 8, n. 5, p.527-549, 22 mar. 2016.
- GUEDES, M.C. Química e bioquímica da peroxidação lipídica. I. Formação de radicais livres: espécies reativas de oxigênio. **Revista Científica do IMAPES**, v. 4, n. 4, p. 19-24, 2006
- GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives Of Toxicology**, v. 86, n. 3, p.345-391, 20 nov. 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011.
- HEIDARIAN, E., RAFIEIAN-KOPAEI, M. Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat. **Pharm Biol.**, v. 51, p. 1104-1109, 2013.

- HOEIJMAKERS, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p.366-374, 17 maio 2001.
- HU, C. M.; WU, J. H. [Progress in study of flavonoids from Annonaceae and biological activities of these compounds]. **Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica**, v. 32, n. 9, p. 765-770, 2007.
- HUONG, D. T.; LUONG, D. V.; THAO, T. T. P.; SUNG, T. V. A new flavone and cytotoxic activity of flavonoid constituents isolated from *Miliusa balansae* (Annonaceae). **Pharmazie**, v. 60, n. 8, p.267-269, 2005.
- IHA, S. M. et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 18, n. 3, p.387-393, set. 2008.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/rbc/n_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 8 ago 2015
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER¹. Estimativa 2016/2017. 2015. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso: 2 dez. 2015.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER². Tipos de câncer: Mama. 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dnCI/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 2 dez. 2015.
- JOHANSSON, B. G. Agarose gel electrophoresis. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 29, n. 124, p. 7-19, 2009.
- JOLAD, S. D.; HOFFMANN, K. H. S.; COLE, J. R.; Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria aCluminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, v. 47, p. 3151-3153, 1982.
- KANAKIS, C. D. et al. DNA Interaction with Naturally Occurring Antioxidant Flavonoids Quercetin, Kaempferol, and Delphinidin. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, v. 22, n. 6, p.719-724, jun. 2005.
- KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v. 7, n. 3, p.153-163, set. 2000.
- KEEPERS, Y.P.; PIZAO, P.E.; PETERS, G.J.; ARK-OTTE, J.; WINOGRAD, B.; PINEDO, H.M. Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTT) Assays for in vitro Chemosensitivity Testing. **European Journal of Cancer**, v. 27, n. 7, p.897-900, 1991.
- KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nature Genetics**, v. 27, n. 3, p.247-254, 1 mar. 2001.
- KIM, G.; JANG, H. Protective Mechanism of Quercetin and Rutin Using Glutathione Metabolism on H₂O₂-induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 7, p. 1171-1530, 2009.
- KINSELLA, J. E. et al. Possible mechanism for the protective role of the antioxidant in wine and plant foods. **Food Technol**, v. 47, p.85-89, 1993.
- KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.; KUIJTEN, G. A.; KEEHNEN, R. M.; PALS, S. T.; VAN OERS, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v.84, p.1415-1420, 1994.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI_FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

- LAGE, G. A. Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. 2011. 132 p.
- LAUGHTON, M. J. et al. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, p. 28-59, 1989.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v 21, n.12, p 2783-2813, 1982.
- LEE, Y.-J. Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis. **Molecular Biology Of The Cell**, v. 15, n. 11, p.5001-5011, 1 set. 2004.
- LEJA, M., MARECZEK, A., WYZGOLIK, G., KLEPACZ-BANIAK, J., CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v. 100, p. 237-240, 2007.
- LI, Y. et al. Flavonoids from tartary buckwheat induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 46, n. 6, p.460-470, 22 abr. 2014.
- LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1129–1138, 2010.
- LIPORACII, H.S.N.; SIMÃO, D.G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nos quintais do Bairro Novo Horizonte, Ituiutaba, MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v 15, n. 4, p 529-540, 2013.
- LIU, X.X., PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Two novel acetogenins, annoglaxin and 27- hydroxybullatacin, from *Annona glabra*. **Journal of Natural Product**, 62, 848-852, 1999.
- LOBÃO, A. Q.; ARAUJO, D. S. D.; KURTZ, B. C. Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, .. 56, n. 87, p. 85-96, ,2005.
- LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura): **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, São Paulo, 640p. 2006.
- LOTZE, M.T.; THOMSON, A.W. Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice.. **Elsevier Science**. 1ª ed, p. 344-346, 2005.
- LUKAS, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 10, p.1161-1169, 3 out. 2011.
- LUNA, J. S. (2006) Estudo de Plantas Bioativas. **Tese de Doutorado** – Recife – PE, Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, 254 p.
- MAAS, P.; RAINER, H.; L O B Ã O , A. Annonaceae. In: **LISTA de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB110219>>. Acesso em: nov. 2015.
- MACEDO, M.; FERREIRA, A.R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. *Revista Brasileira Farmacognosia*. v 14(Supl. 1). p 40-44, 2004.
- MÄKELÄ, M. R.; MARINOVIC, M.; NOUSIAINENX, P.; LIWANAGI, A. J.M.; BENOIT, I.; SIPILÄ, J.; HATAKKA, A.; VRIES, R. P.; HILDÉN, K. S. Aromatic Metabolism of Filamentous Fungi in Relation to the Presence of Aromatic Compounds in Plant Biomass. In **Advances in Applied Microbiology**. Elsevier Inc., Volume 91, 2015.
- MARBRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, B. M. The Systematic Identification of Flavonoids in **Springer-Verlag Berlin- Heidelberg**, New York, 1970

- MARCARINI, J. C. Estudo do flavonoide rutina na citotoxicidade e análise de biomarcadores gênicos e bioquímicos de estresse genotóxico e oxidativo em cultura de células. **Tese** (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2013.155 p.
- MARCARINI, J. C. et al. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. **Experimental And Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 5, p.459-465, 2011.
- MATEESCU, B. et al. MiR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. **Nature Medicine**, v. 17, n. 12, p.1627-1635, 20 nov. 2011.
- MEDEIROS, J.; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de Mikania glomerata Spreng., Asteraceae, e Passiflora edulis Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.20, n.5, 2010
- MELO, E. M.; SILVA, J. M.; SANTANA, M. A.; LIMA FILHO, A. B.; SILVA, D. L. Composição florística do canal Derby-Tacaruna. In. XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife, 2013.
- MENDONÇA, F. A.; SILVA K. F.; SANTOS, K. K. ; RIBEIRO JUNIOR, K. A.; SANT'ANA, A. E.. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito Aedes aegypti. **Fitoterapia**. v. 76, p 629-636, 2005.
- MESQUITA, M. L.; DE PAULA, J. E.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTALOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, n.3, p.439-445, 2009.
- MILLER, N. J. et al. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. **Clin. Sci**, v. 84, n. 4, p.407-412, abr. 1993.
- MOHAN, K., JEYACHANDRAN, R.; DEEPA. Alkaloids as anticancer agents. **Annals of Phytomedicine**. v.1, n.1, p. 46-53, 2012
- MONTELES, R.; PINHEIRO, C.U.B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n.2 p. 38-48, 2007.
- MOREIRA, P. O. L.; BARBOSA, C. S.; SILVA, K. C.; GONÇALVES, A. M. M. N.; SILVA, L. M.; VIANA, G. H. R.; VAROTTI, F. P. Síntese e avaliação da atividade citotóxica in vitro de análogos de alcalóides 3 - alquilpiridínicos contendo o grupo tiossemicarbazona. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**. v. 10, n. 1, p. 17-21, 2015
- MOSMANN, T. Rapid colorimetry assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MYUNG, S.-K. et al. Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: meta-analysis of randomized controlled trials. **Annals Of Oncology**, v. 21, n. 1, p.166-179, 21 jul. 2009.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 29, n. 4, p.273-300, jan. 1990.
- NASCIMENTO, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M.; de SOUSA, A. N.; OLIVEIRA, F. Q. Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of Bauhinia variegata L. **Brazilian Journal of Pharmacy**, n. 92, v. 4, 327-332, 2011.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food Chemistry**. 2.ed. New York : Marcel Dekker, p.139-244, 1985.

- NAWWAR, M. et al. Flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. **Arch. Pharm. Res.**, v. 35, n. 5, p.761-767, maio 2012.
- 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. **Journal of Medical Chemistry**. v. 40, n. 13, 1997.
- O'BRIEN, N. M.; WOODS, J. A.; AHERNE, S. A.; O'CALLAGHAN, Y. C. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. **Nutritional Sciences**, Department of Food Science and Technology, University College, Cork Ireland. *Biochemical Society Transactions* (2000) v. 28, 2000.
- O'DONNELL, E. A.; ERNST, D. N.; HINGORANI, R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. **Immune Network Research**, v. 13, n. 2, p. 43-54, 2013.
- OLIVEIRA, B. H.; SANT'ANA, A. E.; BASTOS, D. Z. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. **Phytochemical Analysis**. v. 13, p 368-71. 2002.
- OLIVEIRA, G. L. S., et al. Avaliação da capacidade antioxidante in vitro e in vivo do extrato etanólico da *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 35, n. 2, p. 293-300, 2014.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determination in vitro of the antioxidant capacity of natural products by the DPPH•method: review study. **Rev. bras. plantas med**, v.17, n.1, pp.36-44, 2015.
- PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.48 p 21-4. 1995.
- PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; TOME, A. R.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascular Pharmacology*. v. 39, p 303-307, 2002.
- PALMA, P. R. Avaliação da Anexina V e Calceína AM como Marcadores de Apoptose em Linfócitos. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- PARDHASARADHI, B.V.V.; REDDY, M.; ALI, A.M.; KUMARI, A.L.; KHAR, A.. Differential cytotoxic effects of *Annona squamosa* seed extracts on human tumour cell lines: role of reactive oxygen species and glutathione. **Journal of Biosciences**, v. 30, p. 237-244, 2005.
- PARK, C. et al. Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis via inhibition of mitochondrial dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 7, p.1287-1295, out. 2003.
- PEDRIALI, C. A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- Pereira, M. O. S. Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioativos. **Dissertação** (Mestrado). Universidade técnica de Lisboa, Lisboa, 2010. 40p.
- PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F. E., BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v.10, p.209-212, 2003

- POLO, S. E.; JACKSON, S. P.. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. **Genes & Development**, v. 25, n. 5, p.409-433, 1 mar. 2011.
- PRADO, M. S. A.; BRITO, H. O. NORONHA, E. P.; FRANCA, L. M.; BRITO, L. M. O. Phytochemical analysis composition from *Annona squamosa* (ATA) leaf ethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 89, n. 3, p. 180-184, 2008.
- PUYAL, J.; VASLIN, A.; MOTTIER, V.; CLARKE, P. G. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. **Annals of Neurology**, v. 66, p. 378-389, 2009.
- RABELO, D. M. Avaliação das Atividades Antibacteriana e Antiplasmódica de Espécies de Annonaceae da Amazônia: Estudo Fitoquímico Bioguiado de *Gutteria citriodora*. **Tese (Doutorado em Biotecnologia)**120p., Manaus, 2014.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved abts radical Cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, pp. 1231–1237, 1999.
- REDDY, L., ODHAV, B., BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, n. 99, p. 1–13, 2003.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. B.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.
- 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, n.2, p.100-8, 1996.
- RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânicos de plantas medicinais do domínio cerrado na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Ciencia Agrotecnica**, v 25, p 102-123, 2001.
- ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p.1048-1054, jan. 2007.
- ROOHAFZA, H., SARRAFZADEGAN, N., SADEGHI, M., RAFIEIAN-KOPAEI, M., SAJJADI, F., KHOSRAVI-BOROJENI, H. The association between stress levels and food consumption among Iranian population. **Arch Iran Med**. v.16, p. 145-148, 2013.
- ROY, P.; KULKARNI, A.P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: Effect of selected chemicals. **Food And Chemical Toxicology**, v. 34, n. 6, p.563-570, jun. 1996.
- RUVO, C. de et al. Nutritional antioxidants as antidegenerative agents. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, v. 18, n. 4-5, p.359-366, jul. 2000.
- SANTOS, B. L. **Avaliação do Potencial Antitumoral de Flavonóides Polihidroxilados sobre células de Glioblastoma Humano**. 2011. 145 f. Tese (Doutorado) – Univeridade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2011.
- SANTOS, P. R. D.; MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dióica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 369-400, 2003.
- SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar Flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, v.55, p.567-573, 2000.
- SARGENT, J.M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. **Recent Results Cancer Research**, v. 161, p. 13-25, 2003.
- SCALBERT, A. et al. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, v. 45, n. 4, p.287-306, jun. 2005.

- SCHAFFER, Freya Q.; BUETTNER, Garry R.. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 30, n. 11, p.1191-1212, jun. 2001.
- SEWELL R. D. E., RAFIEIAN-KOPAEI M. The history and ups and downs of herbal medicine usage. **J HerbMed Pharmacol**. v. 3, p. 1-3, 2014.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D.. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 32, n. 1, p.67-103, jan. 1992.
- SHEN, S. et al. Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase 3 cascade. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 89, n. 5, p.1044-1055, 16 jul. 2003.
- SIEBRA, C.A. Atividades Biológicas de *Annona glabra* Linn., Annonaceae. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) 96 f., Curitiba, 2007.
- SIEBRA, C. A.; NARDIN, J. M.; FLORÃO, A.; ROCHA, F. H.; BASTOS, D. Z.; OLIVEIRA, B. H.; WEFFORT-SANTOS, A. M.. Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19 n.1a, p. 82-88. 2009.
- SIMIC, M. G.; JOVANOVIC, S. V. Inactivation of Oxygen Radicals by Dietary Phenolic Compounds in Anticarcinogenesis. **Acs Symposium Series**, p.20-32, 5 maio 1994.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. v. 22, p. 94-103 1999.
- SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.
- SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G.. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Cienc. Cult.**, v. 66, n. 1, p.38-42, 2014.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis, Ed. da UFSC, 2004.
- SOARES, G. L. G.; ISAIAS, R. M. S.; GONÇALVES, J. M. R.; CHRISTIANO, J. C. S. Alterações químicas induzidas por coClídeos galhadores (CoCloidea, Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Zoociências**. v. 2, n. 1, p. 103- 133, 2000.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p.71-81, jan. 2002.
- SOUSA, C.M.M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRAJR, G.M.; AYRES, M.C. C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.2, p.351-355, 2007
- SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta botânica brasílica**. v. 20, n 1, p 135-142. 2006
- TADDEI, M. L. et al. Mitochondrial Oxidative Stress due to Complex I Dysfunction Promotes Fibroblast Activation and Melanoma Cell Invasiveness. **Journal Of Signal Transduction**, v. 2012, p.1-10, 2012.
- TADHANI, M.B.; PATEL, V.H.; SUBHASH, R. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 20, n. 3-4, p.323-329, maio 2007.
- TEVA, A.; FERNANDEZ, J. C. C.; SILVA, V. L. Imunologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Eds.) **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, p.1-124, 2009.

- TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.; DE ANDRADE, H.F. JR; DE AMORIM GUALDA, N.C; YOGI, A.; CARVALHO, C.S.; BACHIEGA, D., LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids-producing. **Phytomed**; v 12, p 382-396, 2005.
- TIRAPELLI, C. R.; AMBROSIO, S. R.; DA COSTA, F. B.; COUTINHO, S. T.; DE OLIVEIRA, D. C.; DE OLIVEIRA, A. M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**. v 492, p 233-241, 2004.
- TORMO, J. R.; ROYO, I.; GALLARDO, T.; ZAFRA-POLO, M. C.; HERNANDEZ, P.; CORTESD.; PELAEZ, F. In vitro antitumor structureactivity relationship of threo/trans/three mono-tetrahydrofuranic acetogenins: correlation with their inhibition of mitochondrial complex 1. **Oncology Research**, v. 14, n. 3, p. 147-154, 2003.
- TOULLEC, Aurore et al. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. **Embo Molecular Medicine**, v. 2, n. 6, p.211-230, jun. 2010.
- vanENGELAND, M., NIELAND, L.J.W., RAMAEKERS, F.C.S., SCHUTTE, B., REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, n.3, n.1, p. 1–9, 1998.
- VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 44, n.4, p 457 – 472, 2014.
- VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV A.; MARCUCII, M. C. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**. v. 71, p 693-6. 2000.
- VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. **J. Agric. Food Chem**. v. 46, n. 10, p.4113-4117, out. 1998.
- VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELLINGSPERGER. C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometry detection of phosphatidyl serine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V; **Journal. of Immunology. Methods**. v. 184, p. 39–51, 1995.
- VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. Novel derivatives of ent-17,19-dihydroxy-16 β H-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p 3704-3707. 2002.
- VOGEL, H. et al. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *Haplopappus*-species known as bailahuén. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p.97-100, fev. 2005.
- WANG, L. Q.; MIN, B. S.; LI, Y.; NAKAMURA, N.; QIN, G. W.; LI, C. J.; HATTORI, M. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 561-565, 2002.
- WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v.47, n.9, p.1101-1109, 1999.
- WITZUM, J.L. **The oxidative hypothesis of atherosclerosis**. *Lancet*, London, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.
- WU, M. J. et al. An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Yeast Research**, v. 11, n. 4, p.379-387, 24 mar. 2011.
- YANG, B.; YANG, H.; LI, X.; TANG, Y.; ZHANG, N.; CHEN, J. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogens in *Annona*

genus plant seeds by HPLC-DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 49, n. 1, p. 140-144, 2009.

YUAN, S. S. F.; CHANG, H. L.; CHEN, H. W.; YAO, 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 Science**. v.72, p. 2853–2861, 2003.

ZHANG, Y. H.; PENG, H. Y; XIA, G. H; WANG, M. Y; HAN, Y. Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* Linn. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 25, p 937-942. 2004.

APÊNDICE A - Preparo de Meios de Cultivo

Para o preparo do meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's* médium (DMEM) completo foram utilizados:

DMEM	10 g
NaHCO ₃	1,2 g
Hepes	2,38 g
Penicilina (1,650 U/mg)	0,06 g \cong 99 U
Estreptomicina	0,1 g
H ₂ O deionizada	1000 mL

Após a mistura destes compostos em agitador magnético, foi ajustado o pH deste meio para a faixa de 7,2 a 7,4. Depois foi filtrado em membrana de 0,22 μ m, em condições estéreis e acondicionados em frascos estéreis a 4°C. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino.

APÊNDICE B – Preparo De Outras Soluções

- Solução de PBS

Os componentes foram misturados e após total dissolução dos sais, a solução foi autoclavada.

Cloreto de sódio	8g
Fostato de sódio monohidrogenado heptahidratado	21,07g
Fostato monopotássico	6g
Água deionizada	1000mL

- Preparo tampão de ligação

Para o preparo do tampão de ligação serão utilizados:

Hepes	0,1M
Cloreto de sódio	1,4M
Cloreto de Cálcio	25mM
Água deionizada	qsp 1L

Após solubilizar todos os componentes, a solução será armazenada a 4°C.

- Preparo tampão de lise

Para o preparo do tampão de lise serão utilizados:

Citrato de sódio	2mg
Triton® X-100	2mg
Iodeto de propídeo	20µg/mL
Água destilada	qsp 20mL

Após solubilizar todos os componentes, a solução deverá ser estocada ao abrigo da luz.

ANEXO A – Tabelas com resultados do teste ANOVA para os ensaios TEAC e DPPH

Tabela 9: Teste ANOVA para o ensaio TEAC

Fonte	Soma dos quadrados	Df	Média dos quadrados	F	p
Modelo corrigido	6332,718 ^a	53	119,485	9,230	p < 0,0001
Interceptar	303788,251	1	303788,251	23467,241	p < 0,0001
Amostra	2490,333	8	311,292	24,047	p < 0,0001
Concentração	1041,004	5	208,201	16,083	p < 0,0001
Amostra x Concentração	2801,380	40	70,035	5,410	
Erro	2097,123	162	12,945		
Total	312218,092	216			
Total corrigido	8429,841	215			

* $R^2 = 0,751$ (R_2 Ajustado = 0,670)

Tabela 10: Teste ANOVA para o ensaio DPPH

Fonte	Soma dos quadrados	Df	Média dos quadrados	F	p
Modelo corrigido	1812,508 ^a	53	34,198	0,089	1,0000
Interceptar	-	1	1066967,066	2767,128	0,0000
Amostra	171,763	8	21,470	0,056	0,9999
Concentração	226,592	5	45,318	0,118	0,9884
Amostra x Concentração	1414,152	40	35,354	0,092	1,0000
Erro	62465,000	162	385,586		
Total	-	216			
Total corrigido	64277,507	215			

* $R^2 = 0,028$ (R_2 Ajustado = -0,290)