

POTENCIAL DA BIOATIVIDADE DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA
ANNONACEAE E INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTINEOPLÁSICO
DAS ACETOGENINAS ISOLADAS DE *Annona dioica*

MARINA MEIRELLES PAES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes/RJ

Março/2016

POTENCIAL DA BIOATIVIDADE DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA
ANNONACEAE E INVESTIGAÇÃO DO EFEITO
ANTINEOPLÁSICO DAS ACETOGENINAS ISOLADAS DE *Annona*
dioica

Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais

Orientador: Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro
Coorientador: Profa. Dra. Maria Raquel Garcia Vega

Campos dos Goytacazes/RJ

Março/2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

40/2016

Paes, Marina Meirelles

Potencial da bioatividade de espécies da família Annonaceae e investigação do efeito antineoplásico das acetogeninas isoladas de *Annona dioica* / Marina Meirelles Paes. – Campos dos Goytacazes, 2016.

xxii, 257 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Milton Masahiko Kanashiro.

Coorientador: Maria Raquel Garcia Vega.

Área de concentração: Ciências naturais.

Bibliografia: f. 215-257.

1. ANNONACEAE 2. ACETOGENINAS 3. CITOTOXIDADE 4. APOPTOSE 5. PRODUTOS NATURAIS I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas II. Título

CDD 583.22

POTÊN-CIAL DA BIOATIVIDADE DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA
ANNONACEAE E INVESTIGAÇÃO DO EFEITO
ANTINEOPLÁSICO DAS ACETOGENINAS ISOLADAS DE *Annona*
dioica

Marina Meirelles Paes

“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais”

Aprovada em: ___/___/_____

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira

Prof. Dr. João Carlos de Aquino Almeida

Profa. Dra. Maria Raquel Garcia Vega (Coorientador)

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro - (Orientador)

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é uma das coisas mais belas que o ser humano pode fazer, é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém. É reconhecer que jamais poderemos lograr o dom de sermos autossuficientes”

A Deus e a Vida, por me dar forças e sabedoria para vencer mais uma etapa da minha formação e por me mostrar o quanto é importante o conhecimento e a perseverança.

Nas circunstâncias da vida, é imprescindível que alguém dê oportunidades e acredite em nós. Meus supremos agradecimentos aos meus ORIENTADORES: **Dra. Maria Raquel Garcia Vega, Dr. Milton Masahiko Kanashiro e Dr. Diego Miguel Cortes Martínez.**

A professora **Dra. Maria Raquel** pelo grande incentivo e positivismo, por sua disponibilidade irrestrita e por sua incrível forma crítica e criativa de arguir as ideias apresentadas sempre compreendendo minhas limitações. Obrigada por ser a idealizadora deste projeto que com todo saber, confiança e entusiasmo me deu a responsabilidade de dar continuidade ao seu trabalho.

Ao professor **Dr. Milton**, sempre disponível e agregando seus conhecimentos biológicos. Obrigada pelo seu grande empenho em ter acreditado nos objetivos deste projeto, pelo imenso suporte e incentivo, troca de ideias e orientações. Ter aberto as portas do Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR), me deu a oportunidade de conhecer e me apaixonar por um trabalho na qual eu sempre tive vontade de realizar, os testes biológicos.

Ao **Dr. Diego**, ou melhor, “CORTES, D.”, referência tão presente nos artigos que li como base para a escrita desta tese que tornou-se, viva e presente. Agradeço imensamente por aceitar-me em seu laboratório de Farmacognosia da Universidad de Valencia-Espanha, por conduzir com maestria esta pesquisa, por sua colossal atenção e orientação diária, e por dividir parte de seu inesgotável conhecimento atrelado a sua experiência

científica sobre acetogeninas. Minha eterna gratidão e admiração. Muchas Gracias!

À minha família, em especial meus pais **Alba** e **Moacyr**, e meus irmãos **Bruno** e **Liana** pelo incentivo aos estudos, compreensão e paciência em meus momentos de ausência.

Aos alunos **Tháís Rigueti**, **Franz Viana**, **William Freitas** e as técnicas **Rita Escocard** e **Juliana Azevedo**. Pessoas que representaram de forma mais sincera o pensamento de Galileu: “o que eu sei passo adiante”. Todos os conhecimentos básicos e avançados tanto práticos como teóricos de cultura celular e testes de apoptose que tenho devo a vocês, que com todo saber e uma imensurável paciência me transmitiram.

Ao professor **Dr. Rodrigo Rodrigues** que acompanhou desde o início a minha trajetória na UENF, por transmitir seus conhecimentos sobre a cromatografia contracorrente e por me dar a credibilidade de ser colaboradora de seu grupo de alunos.

As amigas **Dra. Virgínia Freitas** e **Dra. Lara Fonseca** pelo e ensinamentos nos estudos e estímulo, meus afetivos agradecimentos.

Aos alunos do LBR, **Laura** e **Jacques**, minhas “sombras”, pela companhia amiga mega agradável, super força e suporte.

Aos meus colegas de laboratório: **Tatiana Ventura**, **Dona Marina**, **Núbia**, **Sanderson**, **Fernando**, **Verônica**, **Queitilane**, **Adriana**, **Laísa**, **Anaína**, **Laís** pelo companheirismo, conversas e boas risadas.

Aos companheiros de Laboratório da Universidad de Valencia-Espanha **Abraham Galán** e **Patrice Marques** pela maravilhosa recepção, ensinamentos, paciência e agradável convívio. A **Maria Jesus Sanz** pela colaboração de me aceitar em seu laboratório da Universidad de Valencia.

Ao carinho familiar e suporte de **Conchi e família** durante minha estada na Espanha.

A **Gizela** e **Cristina** pela eficiência e sempre dispostas a ajudarem nas questões relativas e burocráticas da pós-graduação.

A UENF e a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

PAES, Marina Meirelles Paes; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março, 2016. Potencial da bioatividade de espécies da família Annonaceae e investigação do efeito antineoplásico das acetogeninas isoladas de *Annona dioica*. Professor orientador: Prof. Milton Masahiko Kanashiro. Professor co-orientador: Profa. Maria Raquel Garcia Vega.

As acetogeninas (ACGs), uma importante classe de substâncias encontradas exclusivamente na família Annonaceae, vem sendo estudada nos últimos anos como moléculas promissoras dos protótipos de agentes antitumorais. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antineoplásica nas linhagens U-937 e THP-1 das frações das espécies de Annonaceae *Annona dioica* (raízes), *A. acutiflora* (folhas) e *A. dolabripetala* (folhas) e, a identificação e avaliação da atividade antineoplásica nas linhagens U-937, THP-1, COLO 205 e NCI-H460 das ACGs citotóxicas isoladas (motrilina, esquamocina, annonacina, isoannonacina, cherimolina-1, isocherimolina-1, paraguaína e paraguaína acetilada) da fração em clorofórmio das raízes de *A. dioica*, assim como, a investigação do mecanismo de morte celular induzido pelas mesmas na linhagem U-937. O isolamento destas substâncias foi realizado por cromatografia em coluna sob pressão normal. A determinação estrutural das substâncias isoladas foi feita com base nos dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C , incluindo experimentos bidimensionais (^1H - ^1H -COSY, HSQC), espectrometria de massas e comparação com dados de literatura. O ensaio de viabilidade por MTT mostrou que as frações CHCl_3 e AcOEt de *A. dioica*, e as frações hexânica, CHCl_3 e MeOH de *A. acutiflora* foram capazes de diminuir expressivamente a viabilidade da linhagem U-937. Além disso, mostrou o grande potencial citotóxico das substâncias: a bis-THF adjacente esquamocina ($\text{IC}_{50} = 6,39 \pm 1,12 \mu\text{mol/L}$, U-937; $\text{IC}_{50} = 8,48 \pm 1,10 \mu\text{mol/L}$, THP-1), mono-THF annonacina ($\text{IC}_{50} = 6,00 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$, U-937; $\text{IC}_{50} = 6,22 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$, THP-1), bis-THF não adjacente cherimolina-1 ($\text{IC}_{50} = 6,09 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$, U-937; $\text{IC}_{50} = 10,07 \pm 1,19 \mu\text{mol/L}$, THP-1) e a bis-THF adjacente paraguaína ($\text{IC}_{50} = 2,30 \pm 1,22 \mu\text{mol/L}$, U-937; $\text{IC}_{50} = 3,63 \pm 1,21$

$\mu\text{mol/L}$, THP-1; $\text{IC}_{50} = 6,61 \pm 1,18 \mu\text{mol/L}$, NCI-H460). No geral, as ACGs exibiram um bom índice de seletividade por serem mais ativas nas células neoplásicas do que nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Também foi investigado a confirmação da apoptose induzida pelas substâncias, desmostrado pela dupla marcação com Anexina-FITC e Iodeto de Propídio (IP), análise do ciclo celular (sub-G1) e perda do potencial de membrana mitocondrial, por todas as ACGs, particularmente, melhor inferida pela paraguaína em razão do seu substancial potencial farmacológico e, exceção a motrilina que induziu alterações de pequena magnitude. Na avaliação da atividade da paraguaína, foi possível observar a ativação de caspase-3 e -9 após 7 horas de tratamento. Em síntese, os resultados apontam o potencial de ACGs pertencentes a três diferentes grupos de esqueletos básicos aqui abordados (mono-THF, bis-THF adjacentes, e bis-THF não adjacentes) como promissores agentes antineoplásicos.

Palavras-chave: Annonaceae, acetogeninas, citotoxicidade, apoptose.

ABSTRACT

PAES, Marina Meirelles Paes; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2016. Bioactivity potential of Annonaceae family and investigation of the antineoplastic effect of acetogenins isolated of *Annona dioica*. Prof. advisor: Prof. Milton Masahiko Kanashiro. Professor co-advisor: Profa. Maria Raquel Garcia Vega.

Acetogenins (ACGs), an important class of compounds found exclusively in the Annonaceae family, has been studied in recent years as a promising prototype molecules of antitumor agents. Thus, this study aimed to evaluate the activity of antineoplastic in the U-937 and THP-1 strains fractions of the Annonaceae species *Annona dioica* (roots), *A. acutiflora* (leaves) and *A. dolabripetala* (leaves) and the identification and evaluation of antineoplastic activity in U-937, THP-1, COLO 205 and NCI-H460 line cells of the ACGs isolated in chloroform fraction roots of *A. dioica* (motrilina, esquamocina, annonacina, isoannonacina, cherimolina-1, isocherimolina -1 paraguáína and acetylated paraguáína), as well as to investigate the mechanism of cell death induced by U-937. The isolation of these substances was performed by column chromatography under normal pressure. The structural determination of individual compounds was made based on spectroscopic data of ^1H and ^{13}C NMR, including two-dimensional experiments (1H-1H-COSY, HSQC), mass spectrometry and comparison with the literature data. The MTT viability assay showed that CHCl_3 and EtOAc of *A. dioica* fractions, and hexane, CHCl_3 and MeOH *A. acutiflora* fractions were able to significantly decrease the viability of the U-937 line. Moreover, it showed the great potential of cytotoxic substances: bis-THF adjacent esquamocin ($\text{IC}_{50} = 6,39 \pm 1,12 \mu\text{mol/L}$, U-937; $\text{IC}_{50} = 8,48 \pm 1,10 \mu\text{mol/L}$, THP-1), mono-THF annonacin ($\text{IC}_{50} = 6,00 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$, U-937; $\text{IC}_{50} = 6,22 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$, THP-1), bis-THF non-adjacent cherimolin-1 ($\text{IC}_{50} = 6,09 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$, U-937; $\text{IC}_{50} = 10,07 \pm 1,19 \mu\text{mol/L}$, THP-1) and bis-THF adjacent paraguáína ($\text{IC}_{50} = 2,30 \pm 1,22 \mu\text{mol/L}$, U-937; $\text{IC}_{50} = 3,63 \pm 1,21 \mu\text{mol/L}$, THP-1; $\text{IC}_{50} = 6,61 \pm 1,18 \mu\text{mol/L}$, NCI-H460). In general, the ACGs exhibited a good selectivity index to be more actives for neoplastic cells to peripheral blood

mononuclear cells (PBMC). Also investigated the apoptosis confirmation activated by substances by double staining with Annexin-FITC and Propidium iodide (PI), cell cycle analysis (sub-G1) and loss of mitochondrial membrane potential, for all ACGs particularly better inferred by paraguáína because of their substantial pharmacological potential and motrilin exception to that induced a magnitude of changes. In the evaluation of the paraguáína activity, we observed the activation of caspase-3 and -9 after 7 hours of treatment. In summary, the results indicate the potential of ACGs belonging to three different groups of basic skeletons covered here (mono-THF, THF bis-adjacent and non-adjacent bis-THF) as promising antineoplastic agents.

Key-words: Annonaceae, acetogenins, cytotoxic, apoptosis.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XXII
1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivos gerais	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1 A família Annonaceae	27
3.2 O gênero <i>Annona</i>	28
3.2.1 Espécies de <i>Annona</i> selecionadas para o estudo	32
3.3 Acetogeninas de Annonaceae.....	33
3.3.1 Histórico e hipótese biossintética	33
3.3.2 Estrutura química e classificação das acetogeninas de Annonaceae	35
3.3.3 Atividade biológica das acetogeninas	37
3.3.3.1 Potencial citotóxico das acetogeninas	38
3.4 O câncer	64
3.4.1 Morte celular e câncer	66
3.4.1.1 Apoptose	67
3.4.2 Acetogeninas como indutoras de apoptose	71
4 MATERIAIS E MÉTODOS	73
4.1 Materiais.....	73
4.1.1 Materiais usados no estudo fitoquímico	73
4.1.1.1 Material botânico	73
4.1.1.2 Equipamentos e materiais	73
4.1.1.3 Solventes e Reagentes	74
4.1.1.4 Preparo dos Reagentes	74
4.1.2 Materiais usados no estudo biológico	75
4.1.2.1 Equipamentos e materiais	75
4.1.2.2 Solventes, Reagentes e Kits de Reagentes	75

4.2 Métodos	76
4.2.1 Metodologia do estudo fitoquímico	76
4.2.1.1.1 Preparo e fracionamento do extrato bruto de <i>A. dioica</i>	76
4.2.1.1.2.1 Análise da fração clorofórmica ADR-C (2,97 g)	78
4.2.1.1.3 Extração com solução aquosa ácida da fração clorofórmica da raiz de <i>A. dioica</i>	90
4.2.1.2 Preparo e fracionamento do extrato bruto de <i>A. acutiflora</i>	91
4.2.1.3 Preparo e fracionamento do extrato bruto de <i>A. dolabripetala</i>	91
4.2.1.4 Avaliação do grau de pureza das substâncias isoladas	92
4.2.1.5 Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas ...	92
4.2.2 Metodologia do estudo biológico	93
4.2.2.1 Amostras de estudo	93
4.2.2.1.1 Diluição, concentrações de trabalho e armazenamento das frações e substâncias puras	93
4.2.2.2 Cultura das linhagens de células de origem neoplásica	94
4.2.2.3 Obtenção e cultura das linhagens de células normais	95
4.2.2.4 Quantificação celular adequada para os experimentos	95
4.2.2.5 Avaliação da viabilidade celular das amostras frente às células neoplásicas e normais (PBMC)	96
4.2.2.6 Testes de avaliação do tipo de morte celular induzido pelas frações e substâncias	97
4.2.2.6.1 Ensaio de dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (IP)	97
4.2.2.6.2 Avaliação de apoptose pela fragmentação do DNA em gel de agarose	98
4.2.2.6.3 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1)	98
4.2.2.6.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	99
4.2.2.6.5 Detecção da atividade das caspases	100
4.2.2.7 Análise estatística	100
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5.1 Determinação estrutural dos constituintes químicos isolados da espécie <i>Annona dioica</i>	101
5.1.1 Identificação da substância A1	101

5.1.2 Identificação da substância A2	112
5.1.3 Identificação da substância A3	122
5.1.4 Identificação da substância A4	134
5.1.5 Identificação da substância A5	144
5.1.6 Identificação da substância A6	157
5.2 Avaliação da atividade biológica das frações das espécies <i>A. dioica</i>, <i>A. acutiflora</i> e <i>A. dolabripetala</i>	168
5.2.1 Avaliação do efeito das frações na viabilidade celular de células neoplásicas e de origem não tumoral	168
5.2.2 Avaliação da apoptose pela análise da fragmentação do DNA	175
5.3 Avaliação da atividade biológica das acetogeninas	178
5.3.1 Avaliação do efeito das acetogeninas na viabilidade celular de células neoplásicas e de origem não tumoral	178
5.3.2 Avaliação do tipo de morte celular mediada pelas substâncias	192
5.3.2.1 Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo	192
5.3.2.2 Avaliação da Externalização de fosfatidilserina através da marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (IP)	198
5.3.2.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)	203
5.3.2.4 Detecção da atividade das caspases	209
6 CONCLUSÃO	214
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	215

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Atividades biológicas de espécies do gênero <i>Annona</i> (1976-2015).	30
Tabela 2. Espécies do gênero <i>Annona</i> selecionadas para o estudo	32
Tabela 3. Valores de IC ₅₀ (µg/mL) das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015).....	39
Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero <i>Annona</i> (1989-2015).	53
Tabela 5. Estudo cromatográfico da fração ADR-C.	79
Tabela 6. Estudo cromatográfico da fração ADR-C2.	80
Tabela 7. Estudo cromatográfico da fração ADR-C3.....	80
Tabela 8. Estudo cromatográfico da fração ADR-C3.2.	81
Tabela 9. Estudo cromatográfico da fração ADR-C3.2.2	81
Tabela 10. Estudo cromatográfico da fração ADR-C4	82
Tabela 11. Estudo cromatográfico da fração ADR-C4.2	82
Tabela 12. Estudo cromatográfico da fração ADR-C4.2.2	83
Tabela 13. Estudo cromatográfico da fração ADR-C5	84
Tabela 14. Estudo cromatográfico da fração ADR-C5.3	84
Tabela 15. Estudo cromatográfico da fração ADR-C5.3.2	85
Tabela 16. Estudo cromatográfico da fração ADR-C5.3.3	85
Tabela 17. Estudo cromatográfico da fração ADR-C5.3.3.3	86
Tabela 18. Estudo cromatográfico da fração ADR-C6.....	86
Tabela 19. Estudo cromatográfico da fração ADR-C6.2	87
Tabela 20. Estudo cromatográfico da fração ADR-C7	88
Tabela 21. Estudo cromatográfico da fração ADR-C7.3	88
Tabela 22. Estudo cromatográfico da fração ADR-C7.3.2	89
Tabela 23. Estudo cromatográfico da fração ADR-C8.....	89
Tabela 24. Dados de RMN ¹ H (300 MHz), ¹³ C (500 MHz) da acetogenina A1 , em CDCl ₃ (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a esquamocina em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (entre parêntesis) estão em Hz.....	107

Tabela 25. Dados de RMN ¹ H (300 MHz), ¹³ C- (500 MHz) da acetogenina A2 , em CDCl ₃ (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a motrilina em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (<i>J</i> entre parêntesis) estão em Hz	116
Tabela 26. Dados de RMN ¹ H (300 MHz), ¹³ C (500 MHz) da acetogenina A3 , em CDCl ₃ (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a cherimolina-1 em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (entre parêntesis) estão em Hz.....	128
Tabela 27. Dados de RMN ¹ H (300 MHz), ¹³ C (500 MHz) da acetogenina A4 , em CDCl ₃ (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a annonacina em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (entre parêntesis) estão em Hz.....	139
Tabela 28. Dados de RMN ¹ H (300 MHz), ¹³ C (500 MHz) da acetogenina A5 , em CDCl ₃ (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a isoannonacina em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (entre parêntesis) estão em Hz.....	148
Tabela 29. Dados de RMN ¹ H (300 MHz), ¹³ C (500 MHz) da acetogenina A6 , em CDCl ₃ (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a isocherimolina-1 em em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (entre parêntesis) estão em Hz.....	160
Tabela 30. IC ₅₀ (µg/mL) das frações sobre a viabilidade celular baseado no ensaio de citotoxicidade celular por MTT	172
Tabela 31. Índice de Seletividade das amostras estudadas nas linhagens neoplásicas U-937 e THP-1	174
Tabela 32. Avaliação da atividade citotóxica das ACGs em diferentes linhagens celulares. Resultados expressos em IC ₅₀ (µmol/L).....	186
Tabela 33. Índice de Seletividade das amostras estudadas entre as diferentes linhagens neoplásicas	191

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produtos naturais e seus análogos usados na terapia antineoplásica	24
Figura 2. Metabólitos secundários encontrados no gênero <i>Annona</i>	28
Figura 3. Estrutura das primeiras acetogeninas reportadas na literatura, a uvaricina (13) e cherimolina-1 (14).....	33
Figura 4. Classificação dos anéis THF e/ou THP e anéis epóxido em acetogeninas de Annonaceae	35
Figura 5. Classificação de anéis γ -lactônico em acetogeninas de Annonaceae	36
Figura 6. Classificação geral das acetogeninas	37
Figura 7. Distribuição das acetogeninas citotóxicas nas espécies do gênero <i>Annona</i> ...	63
Figura 8. Partes da planta usadas na investigação fitoquímica das espécies do gênero <i>Annona</i>	63
Figura 9. Acetogeninas indutoras de apoptose	72
Figura 10. Frações resultantes do extrato hidroalcolico das raízes de <i>A. dioica</i> (ADR)....	77
Figura 11. Resumo da análise cromatográfica da fração ADR-C.....	78
Figura 12. Extração de alcaloides com solução aquosa-ácida	90
Figura 13. Frações resultantes do extrato hidroalcolico das folhas de <i>A. acutiflora</i> (AAF) ..	91
Figura 14. Frações resultantes do extrato hidroalcolico das folhas de <i>A. dolabripetala</i> (ADF)	92
Figura 15. Espectro de infravermelho da esquamocina (A1).....	102
Figura 16. Deslocamentos químicos de RMN ^1H característicos do anel γ - lactônico α,β - insaturado sem hidroxila no átomo de carbono 4.	103
Figura 17. Configuração relativa dos sistemas bis-THF adjacentes observados em acetogeninas naturais	104
Figura 18. Deslocamentos químicos de RMN ^1H (entre parêntesis) de RMN ^{13}C da esquamocina (A1)	105
Figura 19. Proposta de fragmentação para os principais íons da esquamocina (A1)	106
Figura 20. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de A1	108
Figura 21. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de A1	109
Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz) em CDCl_3 de A1	109
Figura 23. Mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY em CDCl_3 de A1	110

Figura 24. Espectro de massas ESI-MS de A1	110
Figura 25. Ampliação do espectro de massas ESI-MS de A1	111
Figura 26. Espectro de infravermelho da motrilina (A2).....	112
Figura 27. Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C da cadeia dihidroxialquil da esquamocina (A1).....	114
Figura 28. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H (entre parêntesis) de RMN ¹³ C da motrilina (A2).....	115
Figura 29. Proposta de fragmentação para os principais íons da motrilina (A2).....	116
Figura 30. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A2	118
Figura 31. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A2	118
Figura 32. Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz) em CDCl ₃ de A2	119
Figura 33. Mapa de correlação ¹ H- ¹ H-COSY em CDCl ₃ de A2	119
Figura 34. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A2	120
Figura 35. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A2 ...	120
Figura 36. Espectro de massas ESI-MS de A2	121
Figura 37. Espectro de infravermelho da cherimolina-1 (A3)	122
Figura 38. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H do anel γ- lactônico α,β-insaturado com hidroxila no átomo de carbono 4.....	123
Figura 39. Características de um sistema bis-THF não-adjacente	125
Figura 40. Modelos de configurações encontrados com mais frequência na natureza para sistemas bis-THF não-adjacentes	126
Figura 41. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H (entre parêntesis) de RMN ¹³ C da cherimolina-1 A3	127
Figura 42. Proposta de fragmentação para os principais íons da cherimolina-1 (A3)	127
Figura 43. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A3	129
Figura 44. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A3	130
Figura 45. Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz) em CDCl ₃ de A3	130
Figura 46. Espectro DEPT 135 (500 MHz) em CDCl ₃ de A3	131
Figura 47. Mapa de correlação ¹ H- ¹ H-COSY em CDCl ₃ de A3	131
Figura 48. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A3	132
Figura 49. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A3	132
Figura 50. Espectro de massas ESI-MS de A3	133
Figura 51. Espectro de infravermelho da annonacina (A4)	134

Figura 52. Modelos de configurações encontrados com mais frequência na natureza para sistemas mono-THF	137
Figura 53. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H (entre parêntesis) de RMN ¹³ C da annonacina (A4)	138
Figura 54. Proposta de fragmentação para os principais íons da annonacina (A4)	138
Figura 55. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A4	140
Figura 56. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A4	141
Figura 57. Espectro DEPT 135 (500 MHz) em CDCl ₃ de A4	141
Figura 58. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A4	142
Figura 59. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A4	142
Figura 60. Espectro de massas ESI-MS de A4	143
Figura 61. Ampliação do espectro de massas ESI-MS de A4	143
Figura 62. Espectro de infravermelho da isoannonacina (A5)	144
Figura 63. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H do anel γ- lactônico da “isoacetogenina”	145
Figura 64. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H (entre parêntesis) de RMN ¹³ C da isoannonacina (A5).....	147
Figura 65. Proposta de fragmentação para os principais íons da isoannonacina (A5)	148
Figura 66. Mecanismo de translactonização das acetogeninas com hidroxila em C-4.....	150
Figura 67. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A5	151
Figura 68. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A5	152
Figura 69. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A5	152
Figura 70. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A5	153
Figura 71. Espectro DEPT 135 (500 MHz) em CDCl ₃ de A5	153
Figura 72. Mapa de correlação ¹ H- ¹ H-COSY em CDCl ₃ de A5	154
Figura 73. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A5	154
Figura 74. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A5	155
Figura 75. Espectro de massas ESI-MS de A5	155
Figura 76. Ampliação do espectro de massas ESI-MS de A5	156
Figura 77. Espectro de infravermelho da isocherimolina-1 (A6).....	157
Figura 78. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H (entre parêntesis) de RMN ¹³ C da isocherimolina-1 (A6).....	159

Figura 79. Proposta de fragmentação para os principais íons da isocherimolina-1 (A6).....	160
Figura 80. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A6	162
Figura 81. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A6	162
Figura 82. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A6	163
Figura 83. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ de A6	163
Figura 84. Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz) em CDCl ₃ de A6	164
Figura 85. Espectro DEPT 135 (500 MHz) em CDCl ₃ de A6	164
Figura 86. Mapa de correlação ¹ H- ¹ H-COSY em CDCl ₃ de A6	165
Figura 87. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A6	165
Figura 88. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A6	166
Figura 89. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl ₃ de A6	166
Figura 90. Espectro de massas ESI-MS de A6	167
Figura 91. Ampliação do espectro de massas ESI-MS de A6	167
Figura 92. Avaliação da viabilidade celular da linhagem U-937 pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as frações de <i>A. dioica</i> (A), <i>A. acutiflora</i> (B) e <i>A. dolabripetala</i> (C). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero)	170
Figura 93. Avaliação da viabilidade celular da linhagem THP-1, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as frações de <i>A. dioica</i> (A), <i>A. acutiflora</i> (B) e <i>A. dolabripetala</i> (C). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero)	171
Figura 94. Avaliação da viabilidade celular das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as frações de <i>A. dioica</i> (A) e <i>A. acutiflora</i> (B). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero)	172

Figura 95. Eletroforese em gel de agarose para detecção de fragmentação do DNA em oligonucleotídeos na linhagem U-937, após tratamento com 12,5 µg/mL das frações das raízes de *A. dioica* (CHCl₃, AcOEt, MeOH) e das folhas de *A. acutiflora* (Hexano, CHCl₃, MeOH) durante 24 horas. CTL= controle 176

Figura 96. Eletroforese em gel de agarose para detecção de fragmentação do DNA em oligonucleotídeos na linhagem THP-1, após tratamento com 25 µg/mL das frações das raízes de *A. dioica* (CHCl₃, AcOEt) e das folhas de *A. acutiflora* (Hexano, CHCl₃, MeOH) durante 24 horas. CTL= controle 177

Figura 97. Avaliação da viabilidade celular da linhagem U-937, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero) 179

Figura 98. Avaliação da viabilidade celular da linhagem THP-1, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero) 181

Figura 99. Avaliação da viabilidade celular da linhagem NCI-H460, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias. A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero) 182

Figura 100. Avaliação da viabilidade celular da linhagem COLO 205, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero) 183

Figura 101. Avaliação da viabilidade celular da linhagem de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero) 184

Figura 102. Acetogeninas isoladas de <i>A. dioica</i>	186
Figura 103. Estrutura da acetogenina citotóxica rolliniastatina-2 (18)	189
Figura 104. Histograma referente à distribuição da população de células da linhagem U-937 coradas com iodeto de propídeo por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias.....	194
Figura 105. Estruturas das acetogeninas desacetiluvacicina (19) e annomontacina (20).....	198
Figura 106. Avaliação da morte celular, através da marcação com Anexina VFITC e Iodeto de propídeo (IP), por citometria de fluxo na linhagem U-937, após 12 horas de incubação com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias	200
Figura 107. Requerimentos estruturais de acetogeninas com ação na mitocôndria	206
Figura 108. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial através da marcação com JC-1, por citometria de fluxo na linhagem U937, após a incubação de 12 horas com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias.....	206
Figura 109. Avaliação da atividade das caspases 3 e 9 em células U-937 após incubação com a paraguaína por 7 horas (n=2). A atividade das caspases foi avaliada utilizando o <i>Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)</i> . *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 valores estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento	210

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt - Acetato de etila
ACGs - Acetogeninas
ANOVA – Análise de Variância Entre Grupos
APAF-1 – Apoptotic protease activating factor 1
ATCC – American Type Culture Collection
ATP – Adenosina Tri-Fosfato
Bad – BCL2 antagonist of cell death
Bax – BCL2 associated X protein
Bcl-2 – B cell lymphoma 2
Bcl-w – BCL2 related protein W
Bcl-XL – B cell lymphoma Leukemia-2 related protein X large
Bid – Interacting domain death agonist
CC - Cromatografia em Coluna
CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl₃ - Clorofórmio deuterado
CHCl₃ - Clorofórmio
CH₂Cl₂ - Diclorometano
Co-A – Coenzima-A
COLO 205 - linhagem de adenocarcinoma de colon humano
COSY - Correlation Spectroscopy
 δ - Deslocamento químico em parte por milhão
d – Duplete
dd – Duplo duplete
dq - Duplo quadruplete
DD – Death Domain
DMEM/F-12 – Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO – Dimetilsufóxido
D.O. – Densidade Óptica
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM - Espectro de Massa
ESI-MS - Electrospray ionisation mass spectrometry
FADD – Fas-Associated Death Domain
FM – Fase móvel
HCl – Ácido clorídrico
Hex - Hexano
HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC₅₀ – Concentração inibitória necessária para matar 50% das células
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IS – Índice de seletividade
ISoP - Isopropanol
IV - Infravermelho
J - Constante de acoplamento medida em Hertz
JC-1 – Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina
m - Multiplete

MeOH - Metanol
MS - Mass Spectrometry
m/z - Relação massa/carga
MTT – [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NCI – National Cancer Institute
NCI-H460 - Linhagem celular humana de adenocarcinoma de pulmão
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS – Tampão Salina Fosfato
PI – Iodeto de propídio
PMM – Potencial de membrana mitocondrial
REA – Relação estrutura atividade
RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
RNAase – Ribonuclease A
s - Simpleto
SEB – Staphylococcal enterotoxin b
SMAC/DIABLO – Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI
t - Tripleto
THP-1 – Linhagem celular humana de leucemia monocítica aguda
THF- Tetrahydrofurano
THP- Tetrahidropirano
TNF – Tumor necrosis fator
rTNF – Tumor necrosis fator receptor
TRAIL – TNF-related apoptosis-inducing ligand
U-937 – Linhagem celular humana estabelecida de linfoma histiocítico
XIAP – X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
WHO - *World Health Organization*

1 INTRODUÇÃO

A magnitude da diversidade vegetal mundial é atualmente estimada em cerca de 500.000 espécies (SIMÕES et al., 2007). Essa fantástica variedade de espécies botânicas e por consequência a complexidade de metabólitos secundários produzidos pelas mesmas, é um desafio a ser explorado. Neste ponto, o Reino Vegetal tem sido pragmático, principalmente quando se relacionam estas moléculas, melhor conceituadas pelo professor Gottlieb de metabólitos especiais, como sendo substâncias com elevado potencial medicinal útil ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos.

A rigor, no início do século XIX, com desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de novos medicamentos. De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todos os novos fármacos (CRAGG et al., 1997). Isto reforça o interesse das indústrias farmacêuticas pela busca de substâncias, especialmente nas florestas tropicais, onde se concentra grande parte da biodiversidade e, principalmente no Brasil, onde a grande maioria das espécies continua sem qualquer estudo químico ou biológico (PINTO et al., 2002).

Com restrita atenção à terapia antineoplásica, a busca por medicamentos anticancerígenos tem aumentado com vistas a se encontrar tratamentos mais específicos e seletivos, ou que visem estratégias que evitam que haja o avanço do câncer, que é umas das principais causas de morte no mundo e se caracteriza pela presença de células em crescimento contínuo, com propriedades de invasão e destruição do tecido adjacente (ROBINS, 2005).

Enfaticamente, a maioria (60%) dos medicamentos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais. Dentre estes se destacam a vimblastina (1) e a vincristina (2) e os análogos vindesina (3) e vinorelbina (4); paclitaxel (5) e o análogo docetaxel (6); a podofilotoxina (7) e os análogos etoposídeo (8) e teniposídeo (9); e a campotecina (10) e os análogos topotecano (11) e irinotecano (12) (**Figura 1, p. 24**) (COSTA-LOTUFO et al., 2010). É importante ressaltar, que o

desenvolvimento de novos fármacos anticâncer de ocorrência natural depende fundamentalmente de um esforço multidisciplinar na descoberta de novas moléculas líderes em função da existência de um grande número de espécies disponíveis para investigação.

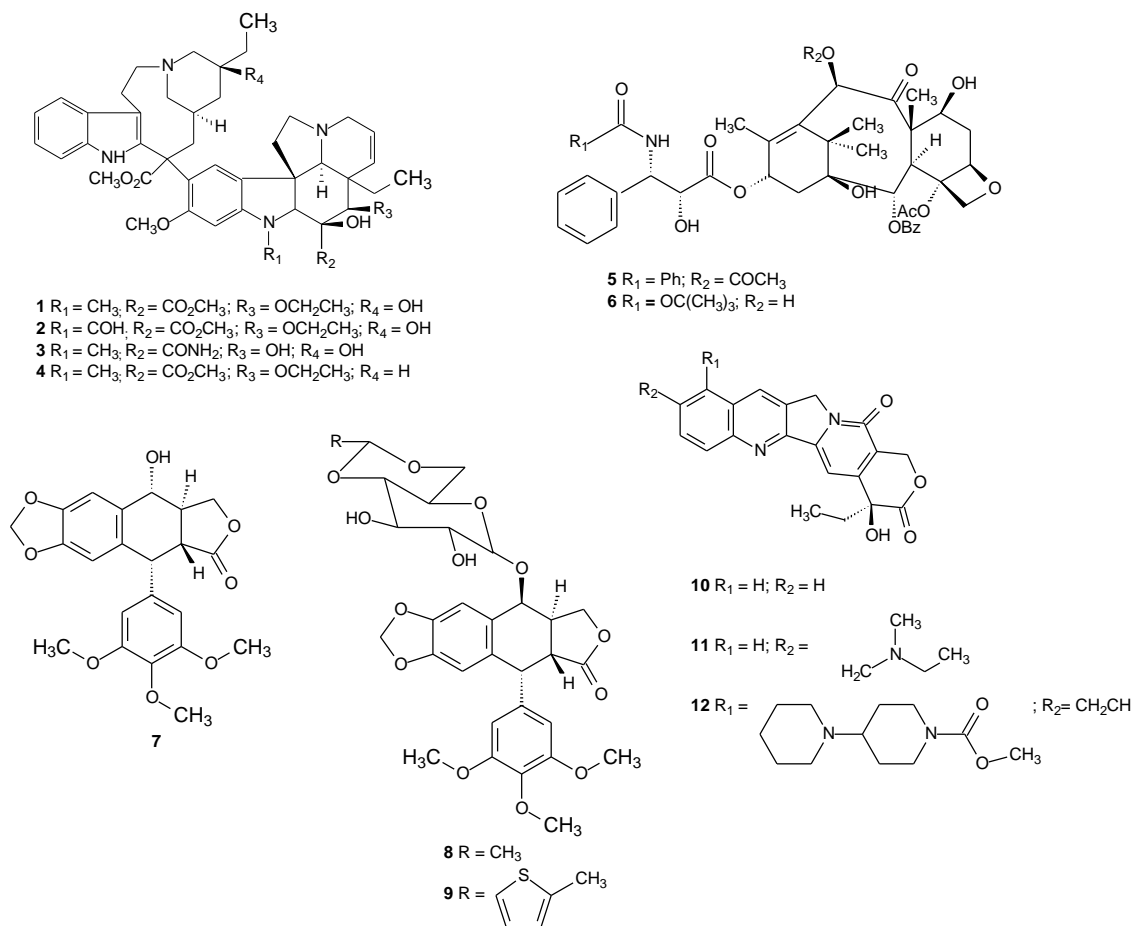


Figura 1. Produtos naturais e seus análogos usados na terapia antineoplásica.

Portanto, a busca por novas moléculas anticancerígenas é motivada devido ao sucesso no passado de serem encontrados produtos naturais clinicamente úteis e também, em consequência de solucionar problemas como aparecimento da resistência à quimioterapia. Neste contexto, as acetogeninas (ACGs), uma importante classe de substâncias encontradas exclusivamente na família Annonaceae, vem sendo estudada nos últimos anos como moléculas promissoras dos protótipos de agentes antitumorais.

Assim, este trabalho tem como base realizar o estudo fitoquímico guiado por bioensaios da atividade antineoplásica com linhagens de células humanas

neoplásicas em três espécies da família Annonaceae: *Annona dioica*, *A. acutiflora* e *A. dolabripetala*, pertencentes ao gênero *Annona*. Além, de identificar as acetogeninas citotóxicas e seu mecanismo de indução à morte celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo realizar a prospecção da atividade antineoplásica das espécies *Annona dioica*, *A. acutiflora* e *A. dolabripetala* da família Annonaceae e, identificar as substâncias citotóxicas, bem como o mecanismo de indução à morte celular das mesmas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar e purificar as substâncias oriundas das frações selecionadas e realizar a determinação estrutural das mesmas.
2. Avaliar os efeitos das frações e substâncias isoladas quanto viabilidade em células neoplásicas.
3. Determinar a toxicidade das frações e substâncias frente à células mononucleares do sangue periférico humano.
4. Verificar o tipo de morte celular induzida pelas frações e substâncias.
5. Identificar a via de morte celular por apoptose induzida pelas substâncias.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A família Annonaceae

A família Annonaceae estabelecida por Antoine Laurent de Jussieu em 1789 é sistematicamente colocada na classe Magnoliopsida e subclasse Magnolida, sendo umas das principais famílias de Angiospermas (MAAS et al., 2001; NASCIMENTO, 2008). É composta por 150 gêneros, com aproximadamente 2.500 espécies distribuídas. No Brasil, estão registrados 29 gêneros, compreendendo cerca de 260 espécies (CHATROU et al., 2004; JUDD et al., 1999).

As plantas desta família caracterizam-se por apresentarem folhas simples, dispostas alternadamente em um mesmo plano, ao longo dos ramos e pela semelhança entre seus frutos (ALMEIDA et al., 1998). Economicamente, a família é de apreciável importância como fonte de frutos comestíveis principalmente dos gêneros: *Annona*, *Asimina* e *Cananga*. As sementes de algumas espécies fornecem óleos comestíveis, enquanto as madeiras de outras são empregadas na construção civil e produção de álcool. Na fruticultura, o gênero de maior importância é o *Annona* (NASCIMENTO, 2008).

As espécies da família Annonaceae são largamente empregadas na etnofarmacologia devido às suas diferentes propriedades farmacológicas como, por exemplo, para o tratamento de diarreia, distúrbio gastrointestinal, câncer de pele e leucemia, diabetes, hipertensão entre outras (ADJANOHOUN et al., 1996; ABUBAKER et al., 2007; BURKIL, 1985). Essas atividades são atribuídas principalmente às acetogeninas (ACGs) e aos alcaloides, dois dos principais constituintes bioativos encontrados em gêneros específicos desta família (FAGUNDES et al., 2005). Porém, a maioria dos estudos da fitoquímica de Annonaceae não se concentra mais nos alcaloides, mas numa nova classe de substâncias extremamente bioativas que são referidas como acetogeninas de annonáceas, caracterizadas por suas atividades citotóxicas, especialmente, antitumoral, antiparasitária e pesticida (FANG et al., 1993; RUPPRECHT et al., 1990). No que compete a citotoxicidade, estas substâncias têm mostrado uma

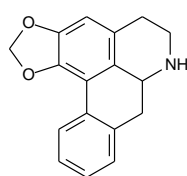
significativa atividade *in vitro* em linhagens de células humanas (CHEN et al., 2012c).

3.2 O gênero *Annona*

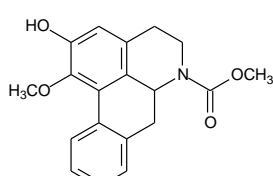
O gênero *Annona*, descrito por Lineu, em latim significa “farta colheita anual”, em analogia aos saborosos frutos que várias espécies deste gênero produzem, como a pinha (*Annona squamosa* L.), graviola (*Annona muricata* L.) e araticum (*Annona crassiflora* Mart.) (SANTOS, 2007). Este gênero está representado por 120 espécies (LEBOEUF et al., 1982).

Como parte do arsenal químico micromolecular, as classes de substâncias mais emblemáticas encontradas nesse gênero são os alcaloides, sobretudo, os isoquinoleínicos e as ACGs. Também são encontrados os esteroides, flavonoides, peptídeos e diterpenos, exemplificados na (Figura 2):

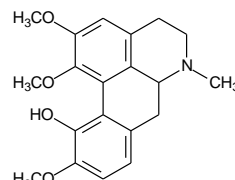
- **Alcaloides isoquinoleínicos** (CHEN et al., 1996; KUO et al., 2001; SONI et al., 2012)



Annonain
Annona reticulata

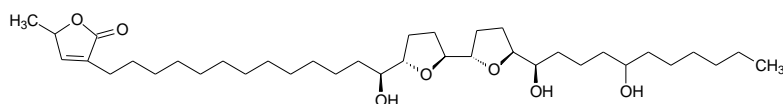


Rumococina A
Annona reticulata

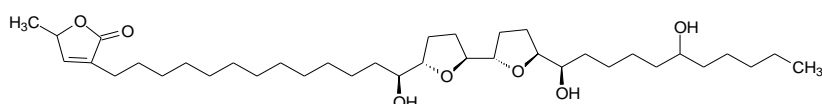


Isocoridina
Annona squamosa

- **Acetogeninas** (FUJIMOTO et al., 1988; CORTES et al., 1991)



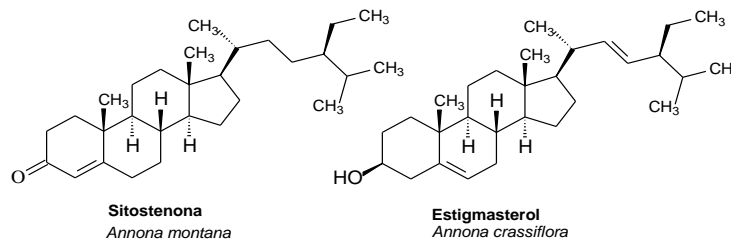
Esquamocina
Annona squamosa



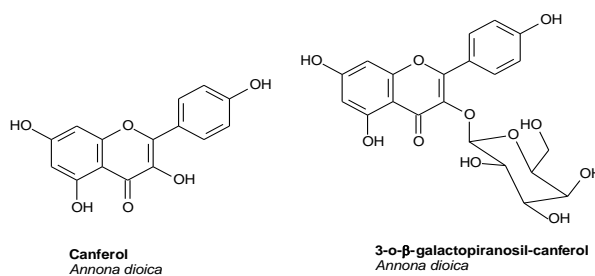
Motrilina
Annona cherimolia

Figura 2. Metabólitos secundários encontrados no gênero *Annona*.

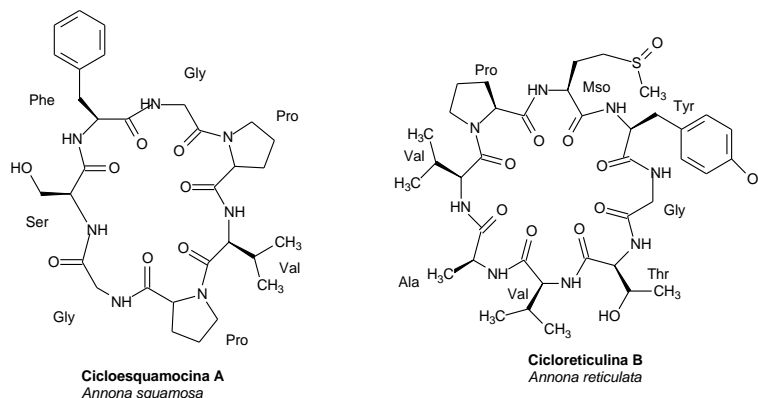
➤ **Esteroides** (WU et al., 1987; INOUE et al., 2010)



➤ **Flavonoides** (VEGA, 2006)



➤ **Peptídeos** (MORITA et al., 2006; WÉLÉ et al., 2008)



➤ **Diterpenos** (NASCIMENTO, 2008)

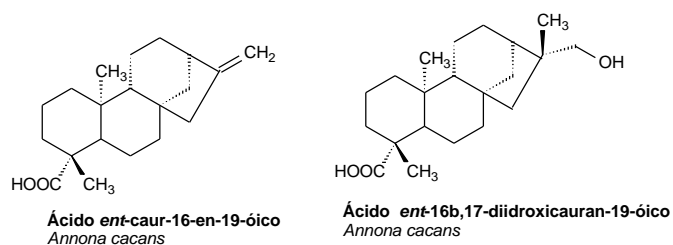


Figura 2. Metabólitos secundários encontrados no gênero *Annona* (Cont.).

Um fato relevante são as inúmeras atividades biológicas atribuídas às espécies deste gênero. Na **Tabela 1, p. 30**, encontram-se sumarizados

exemplos de bioatividades reveladas em vinte e seis espécies de *Annona* já estudadas até 2015, onde 69,23 % destas espécies estudadas possuem a atividade citotóxica. Destacando, que na maioria das espécies (15) a citotoxicidade está atribuída à presença das ACGs, e mostraram grande potencial quando testadas em linhagens de células tumorais.

Tabela 1. Atividades biológicas de espécies do gênero *Annona* (1976-2015).

Espécie	Atividade biológica	Referência
<i>Annona acutiflora</i> (folha e galho)	Pesticida	Ribeiro, 2014.
<i>Annona atemoya</i> * (sementes; frutas)	Citotóxica	Chang et al., 1999; Chih et al., 2001.
	Antilavricida	Seffrin et al., 2010.
<i>Annona bullata</i> * (casca)	Citotóxica	Gu et al., 1994; Gu et al., 1995; Gu et al., 1993; Landolt et al., 1995.
	Antitumoral	Hui et al., 1989; Ahammadsahib et al., 1993.
<i>Annona cherimolia</i> * (sementes; parte aérea; folhas; frutas; mesocarpo)	Pesticida	Ahammadsahib et al., 1993.
	Antidepressiva	Matinez-Vazquez et al., 2012.
	Larvicida	Pimenta et al., 2003.
	Anti-oxidante	Gupta-Elera et al., 2011; Barreca et al., 2011.
	Antiparasitária	Cortes et al., 1993.
	Ansiolítica	López-Rubalcava et al., 2006.
	Crioprotetora	Goñi et al., 2011.
	Antifúngica	García et al., 2003.
<i>Annona coriacea</i> * (semente; raiz)	Citotóxica	Sahpaz et al., 1996, Cortes et al., 1993; Cortes et al., 1991.
	Inseticida	Coelho et al., 2007.
	Citotóxica	Silva et al., 1996.
	Anti-inflamatória Antinociceptiva	De Sousa et al., 2012.
<i>Annona cornifolia</i> (sementes)	Anti-oxidante	Lima et al., 2010; Lima et al., 2012.
	Antifúngica	Lima et al., 2011.
	Citotóxica	Lima et al., 2012.
<i>Annona crassiflora</i> * (sementes; polpa; folhas)	Anti-oxidante	Roesler et al., 2007; Luzia & Jorge, 2012
	Citotóxica	Santos et al., 1996.
	Moluscida	Dos Santos & Sant'Ana, 2001.
	Larvicida	Pimenta et al., 2003.
<i>Annona densicoma</i> * (casca do caule)	Citotóxica	Xu et al., 1989.
<i>Annona diversifolia</i> (folhas; fruta)	Antinociceptiva	Carballo et al., 2010.
	Anti-oxidante	Julian-Loeza et al., 2011.
	Anticonvulsivante	González-Trujano et al., 2009.
	Larvicida	Gonzalez-Esquinca et al., 2012.
<i>Annona dioica</i> (folhas; raiz; madeira)	Citotóxica	Vega et al., 2007; Martins, 2014; Mahmoud et al., 2011.
	Anti-oxidante	Formagio et al., 2013.
	Anti-inflamatória	
	Hipoglicemiante	
	Inibidor de topoisomerase	Vega et al., 2007.
Toxico para carrapato bovino	Nazaro, 2013.	
<i>Annona dolabripetala</i> (folhas)	Bactericida	Campos, 2013.
	Antioxidante	
	Citotóxica	
<i>Annona foetida</i> (ramos)	Tripanocida	Costa et al., 2011b.
<i>Annona glabra</i> * (casca do caule; sementes; folhas)	Inseticida	Padmaja et al., 1995.
	Anti-helmintica	
	Antifúngica	
	Antibactericida	
	Citotóxica	Liu et al., 1999b; Liu et al., 1998a, Padmaja et al., 1995.
Moluscicida	Dos Santos & Sant'Ana, 2001.	
<i>Annona hypoglauca</i> (madeira)	Larvicida	Pimenta et al., 2003.

<i>Annona jahnii*</i> (galhos)	Citotóxica	Colman-Saizarbitoria et al., 1998.
<i>Annona montana*</i> (casca do caule)	Antimicrobiana	Wu et al., 1987.
	Citotóxica	Wu et al., 1987; Liaw et al., 2005.
<i>Annona muricata*</i> (pericarpo; sementes; folhas; casca do caule)	Citotóxica	Myint et al., 1991; Jaramillo et al., 2000; Landolt et al., 1995; Rieser, et al., 1991; Sun et al., 2014.
	Antileishmanicida	Jaramillo et al., 2000; Vila Nova, 2008.
	Antiplasmodica	Nguyen-Pouplin et al., 2007.
	Herpes vírus	Padma et al., 1998.
	Moluscicida	Dos Santos & Sant'Ana, 2001.
	Antiinflamatória	De Souza et al., 2010.
	Antinociceptiva	De Souza et al., 2010.
	Antimicrobiana	Pedroso et al., 2008.
<i>Annona nutans</i> (sementes)	Larvicida	Gonzalez-Esquinca et al., 2012.
<i>Annona pickelii</i> (folhas)	Larvicida	Pimenta et al., 2003.
	Antimicrobiana	Costa et al., 2011a.
	Antioxidante	
<i>Annona purpurea*</i> (sementes; raiz)	Citotóxica	Chávez & Mata, 1999.
	Ansiolítica	Rejon-Orantes et al., 2011.
<i>Annona reticulata*</i> (sementes; casca; folhas)	Antitumoral	Petit, 2012.
	Analgésica	Chavan et al., 2012.
	Antiinflamatória	
	Ansiolítica	Estrada-Reyes et al., 2010.
	Tripanocida	Muelas-Serrano et al., 2000.
	Inseticida	Haryadi & Yuniarti, 2003.
	Antioxidante	Jamkhande et al., 2015.
	Antimicrobiana	Jamkhande et al., 2015.
	Citotóxica	Yuan et al., 2003; Yuan et al., 2006; Saad et al., 1991; Shi et al., 1997; Shi et al., 1996a; Gu et al., 1997; Shi et al., 1995; Wu et al., 1992; Chávez et al., 1999; Shi et al., 1996b; Chang et al., 1993.
<i>Annona salzmanii*</i> (casca; raiz)	Antimicrobiana	Paulo et al., 1992; Costa et al., 2011a.
	Larvicida	Costa et al., 2011a.
	Antioxidante	
	Citotóxica	Queiroz et al., 2003.
<i>Annona senegalensis</i> (casca; folhas, casca do caule; casca da raiz)	Anti-helmintica	Alawa et al., 2003.
	Tripanocida	Ogbadoyi et al., 2007.
	Antidiarréica	Suleiman et al., 2008.
	Anticonvulsivante	Okoye et al., 2010.
	Relaxante muscular	Okoye et al., 2010.
	Antiparasitária	Sahpaz et al., 1996.
	Antimicrobiana	Okoye et al., 2012.
	Antiinflamatória	Yeo et al., 2011.
	Antioxidante	Ajboye et al., 2010.
	Antibacteriana	Adesogan & Durodola, 1976.
Antitumoral	Adesogan & Durodola, 1976.	
<i>Annona spinescens*</i> (sementes)	Citotóxica	Queiroz et al., 1998.
<i>Annona squamosa*</i> (sementes; galho; casca; folhas; polpada fruta)	Antimicrobiana	Rahman et al., 2005.
	Citotóxica	Rahman et al., 2005; Nguyen-Pouplin et al., 2007; Chen et al., 2012b; Hopp et al., 1998; Vivek et al., 2010; Miao et al., 2015; Yuan et al., 2015.
	Antiúlceras	Yadav et al., 2011.
	Modificador da resposta imune	Soni et al., 2012.
	Vasodilatadora	Morita et al., 2006.
	Analgésica	Chavan et al., 2010.
	Antiinflamatória	Chavan et al., 2010.
	Antioxidante	Nandhakumar & Indumathi et al., 2012.; Gupta et al., 2008; El-Chaghaby et al., 2011.
	Antitumoral	Chen et al., 2012b; Chen et al., 2012c.
	Antidiabetes	Shirwaikar et al., 2004; Gupta et al., 2005.
	Antiplasmodica	Nguyen-Pouplin et al., 2007.
Antilipidémica	Gupta et al., 2008.	
Acaricida	Roopan et al., 2012.	

	Larvicida	Roopan et al., 2012.; Seffrin et al., 2010.
	Inseticida	Roopan et al., 2012.
	Regulador de hipertireoidismo	Panda et al., 2007.
	Antibacteriana	El-Chaghaby et al., 2011.
	Hipoglicemiante	Gupta et al., 2005.; Davis et al., 2012.
	Antileishmanicida	Vila Nova, 2008.
	Nematicida	Le Dang et al., 2011.
	Antifúngica	
<i>Annona vepretorum</i> (folhas)	Tripanocida	Costa et al., 2012.
	Antimicrobiana	

* espécies cuja a atividade citotóxica está atribuída a presença de acetogeninas

3.2.1 Espécies de *Annona* selecionadas para o estudo

Com a perspectiva de contribuir com a fitoquímica e a bioatividade do gênero *Annona*, foram selecionadas três espécies deste gênero para serem estudadas: *Annona acutiflora*, *Annona dolabripetala* e *Annona dioica*. A **Tabela 2, p. 32**, resumidamente, mostra o que já se tem descrito na literatura sobre elas. As espécies *A. acutiflora* e *A. dolabripetala* não apresentam estudos químicos prévios. Já a espécie *A. dioica*, apresenta estudos químicos e biológicos.

Tabela 2. Espécies do gênero *Annona* selecionadas para o estudo.

Espécies (nome científico/popular)	Parte da planta a ser estudada	Uso popular	Estudos preliminares (partes da planta/ classe de compostos)	Atividades	Ref.
<i>Annona acutiflora</i> /guiné e guiné caboclo	Folhas	Inflamação e dor estomacal (Brasil)	Folhas e galhos	Pesticida (extrato de folhas)	Maas et al., 2015; Ribeiro, 2014; Ferreira et al., 2015.
<i>Annona dioica</i> ; <i>A. cuyabaensis</i> ; <i>A. mattogrossensis</i> / aratikú-ñu	Raízes	Reumatismo e diarreia (Brasil); sedativo, inseticida e anticatarral (Paraguai)	Madeira, folhas, raízes/ Alcaloide (1-aza-4-Metiltraquinona; lasiodiplodina; liriodenina; geovanina; anomontina; 1,2-metilenodioxo-6 α ,7-desidro aporfina-4(S)-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2(1H)-piridinona); 5,6,7-trimetóxi-1-(4-metóxi-benzil)-2-metil-tetra-hidroisoquinolína; 5,6,7-trimetóxi-1-(4-metóxi-benzil)-2-óxido-3,4-di-hidroisoquinolína) flavonoide (kaempferol, 3-O-[3",6"-di-O-p-hidroxicinamoil]- β -galactopiranosil-kaempferol, 6"-O-p-hidroxicinamoil- β -galactopiranosil-kaempferol e 3-O- β -galactopiranosil-kaempferol), acetogenina (motrilina e paraguaiína)	Citotóxico para células tumorais (extratos e frações de folhas, madeira e raízes e, flavonoide); inibidor da topoisomerase I e II (flavonoide); tóxico para carrapato bovino (frações de raiz) Hipoglicemiante, anti-inflamatória e antioxidante (extrato de folhas)	Pavetti et al., 1983; Maas et al., 2015; Pott & Pott, 1994; Basualdo & Soria, 1996; Santos et al., 2003; Vega, 2006; Vega et al., 2007; Formagio et al., 2013; Martins, 2014; Nazaro, 2013; Mahmoud et al., 2011.
<i>Annona dolabripetala</i> ; <i>A. minensis</i> ; <i>Rollinia longifolia</i> ; <i>Rollinia minensis</i> ; <i>Rollinia dolabripetala</i>	Folhas	-	Folhas	Bactericida, antioxidante, citotóxica em melanoma murino (extrato de folhas)	Maas et al., 2015; Campos, 2013.

3.3 Acetogeninas de Annonaceae

3.3.1 Histórico e hipótese biossintética

Em 1982, foi reportada na literatura a primeira acetogenina (ACG) isolada na natureza, a uvaricina (**13**), que foi isolada das raízes de *Uvaria acuminata* e descrita a sua atividade citotóxica (**Figura 3**) (JOLAD et al., 1982). No princípio do seu isolamento, esta substância teria uma série de características estruturais duvidosas, particularmente por ter um sistema bis-tetrahidrofurânico (THF) adjacente situado em uma cadeia hidrocarbônica, entre uma hidroxila e uma acetoxila, e ainda um anel γ -lactônico α,β -insaturado terminal. Porém, a partir do seu descobrimento, uma série de substâncias parecidas foram isoladas das espécies da família Annonaceae. Dois anos depois da descoberta da uvaricina (**13**), ou seja, em 1984, foi isolada a primeira ACG do gênero *Annona* das sementes da espécie *Annona cherimolia*, a cherimolina-1(**14**) (**Figura 3**) (CORTES et al., 1984).

O crescente número de substâncias com características estruturais semelhantes extraídas das espécies desta família levou a denominar comumente este grupo de produtos naturais de “acetogeninas de Annonáceas” (FANG et al., 1993; CAVÉ et al., 1997). Em mais de 30 anos de estudo, o número de ACGs isoladas nesta família já passa de 500 (LIAW et al., 2010).

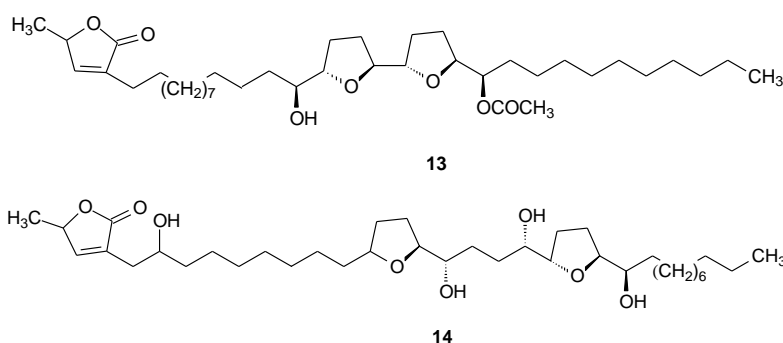


Figura 3. Estrutura das primeiras acetogeninas reportadas na literatura, a uvaricina (**13**) e cherimolina-1 (**14**).

De forma sucinta, as ACGs são caracterizadas por apresentarem uma cadeia longa alifática com 32 a 34 átomos de carbono, um anel γ -lactônico α,β -insaturado ou saturado terminal, que pode algumas vezes sofrer rearranjo para cetolactona. Ao longo da cadeia alifática podem ser encontrados um, dois, ou três anéis tetrahydrofurano (THF) ou tetrahidropirano (THP) e, grupos funcionais oxigenados (hidroxilas, cetonas ou epóxidos) (ALALI et al., 1999).

As ACGs estão presentes em praticamente todas as partes da planta e têm sido encontradas até agora em cerca de 13 gêneros da família Annonaceae, principalmente nas espécies dos gêneros *Annona*, *Asimina*, *Uvaria*, *Rollinia* e *Goniothalamus* (BERMEJO et al., 2005; ALALI et al., 1999). Contudo, é no gênero *Annona* onde está registrado o maior número destas substâncias (cerca de 289 ACGs, correspondendo a aproximadamente 65% das descritas na literatura) em 20 espécies estudadas (NASCIMENTO, 2008).

Em termos biossintéticos, é importante deixar claro que ainda não foi possível ser demonstrado por completo a biossíntese das ACGs. Mas devido ao isolamento de novos precursores e intermediários foi possível estabelecer algumas hipóteses. Assim, postulou-se que as ACGs são biossintetizadas através de combinações lineares de duas ou três unidades de carbonos (ácido acético e propanóico) via acetil Co-A, e malonil-CoA através de mecanismos semelhantes à rota para a biossíntese de ácidos graxos, que se condensariam com um álcool de três átomos de carbonos para dar origem ao anel γ -lactônico α,β -insaturado (RUPRECHT et al., 1990). Provavelmente, este anel lactônico terminal forma-se antes dos anéis THF, visto que, foram isoladas ACGs lineares e com anéis epóxidos (CAVÉ et al., 1997).

Posteriormente, a formação dos anéis tetrahydrofuranos (THF) se inicia mediante a epoxidação das cadeias poli-insaturadas, seguida de diversos processos químicos que implicariam em sucessivas reações de desidrogenação, oxidação e reordenamento da molécula, que explicariam as diferentes formas de substituição das ACGs (CAVÉ et al., 1997).

3.3.2 Estrutura química e classificação das acetogeninas de Annonaceae

A grande diversidade estrutural das ACGs permitiu classificá-las de acordo com a quantidade e/ou tipos de anéis THF, THP ou anéis epóxido e, quanto à natureza do anel γ -lactônico terminal. Esta classificação foi primeiramente proposta por ZAFRA-POLO e colaboradores (1996) e foi ampliada no artigo de revisão publicado sobre ACGs por BERMEJO e colaboradores (2005) (**Figura 4 e 5, p. 36**).

Dessa forma, os anéis THF e/ou THP podem ser α,α -hidroxilados ou α -hidroxilado sendo classificado como: mono-THF e/ou THP (T-A, T-B, T-G3), bis-THF e/ou THP adjacentes (T-C, T-E, T-G2), bis-THP e/ou THP não adjacentes (T-D, T-H, T-G1), e tri-THF (T-F). Os anéis epóxido são do tipo E-A, E-B e E-C (**Figura 4**).

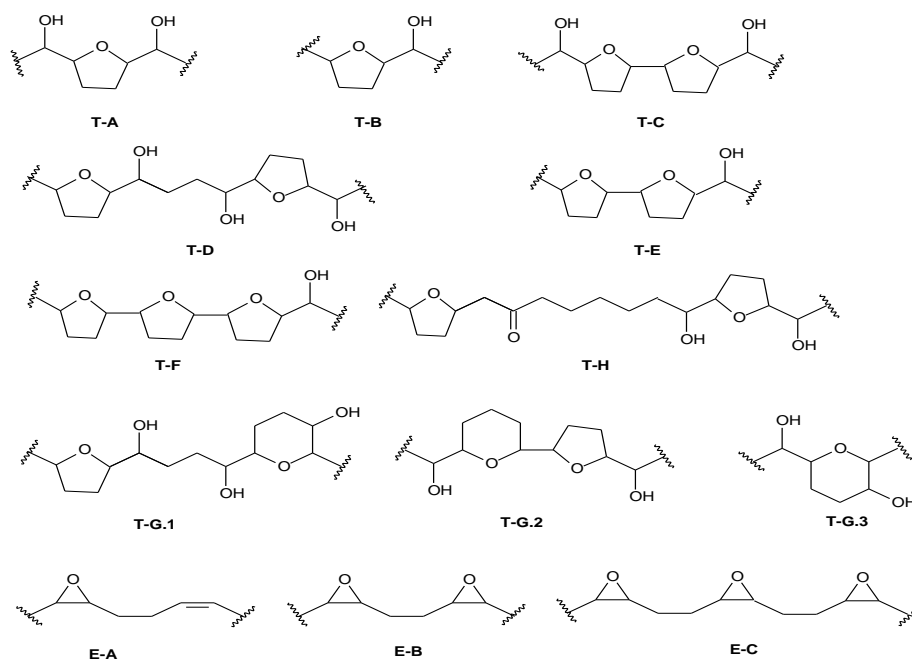


Figura 4. Classificação dos anéis THF e/ou THP e anéis epóxido em acetogeninas de Annonaceae.

O anel lactônico pode ser classificado como: γ -lactônico substituído, cetolactonas ou hidroxilados. Os tipos descritos na literatura até o momento são: L-A, L-B1, L-B2, L-C, L-D, L-E, L-F, L-G (**Figura 5, p. 36**).

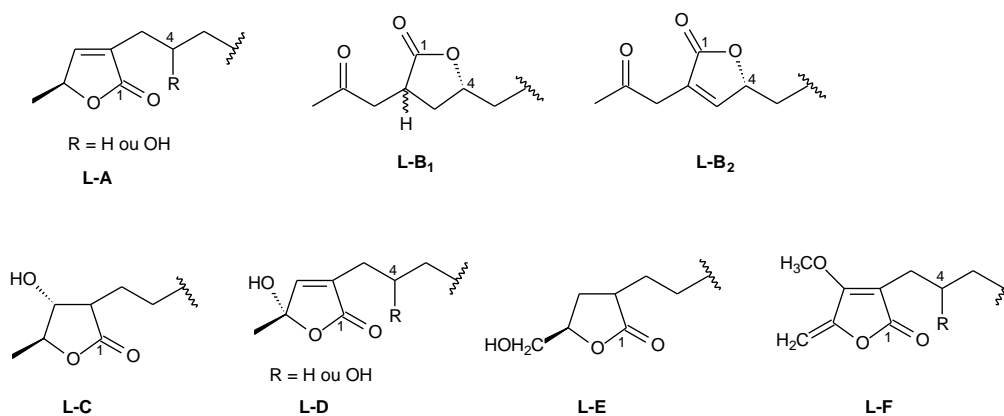


Figura 5. Classificação de anéis γ -lactônico em acetogeninas de Annonaceae.

Apesar desse sistema de classificação ser mais informativo, leva a várias subclasses. Outro sistema de classificação, porém, mais geral, é usado em outros trabalhos a fim de facilitar a classificação das ACGs (ALALI et al., 1999; SCHLIE-GUZMÁN et al., 2009). Neste, as ACGs são divididas em seis grandes grupos: acetogeninas lineares, mono-THF, bis-THF adjacente, bis-THF não adjacentes, não THF e THP, e não clássicas. Na **Figura 6, p. 37**, podem ser observados exemplos desta classificação.

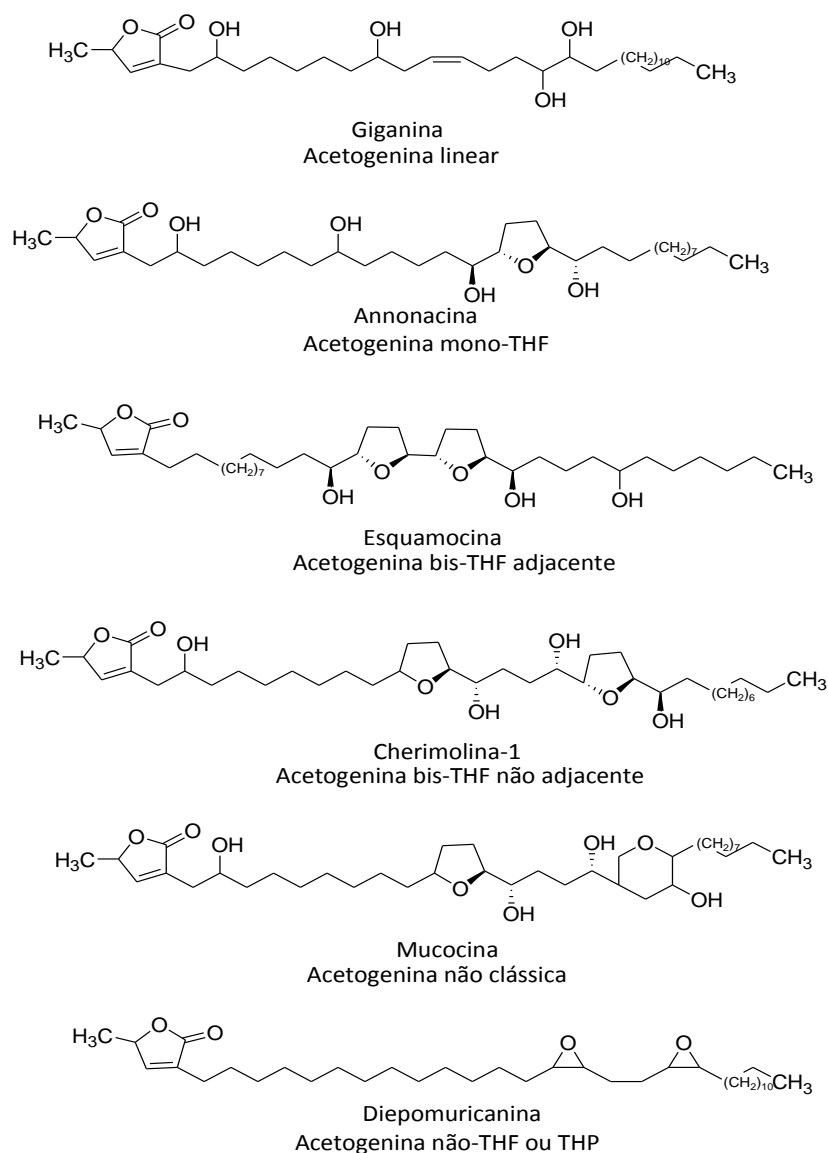


Figura 6. Classificação geral das acetogeninas.

3.3.3 Atividade biológica das acetogeninas

Desde quando a primeira ACG citotóxica foi isolada, a uvaricina (13) (Figura 3, p. 33), o interesse por estas substâncias vem crescendo devido a grande variedade de atividades biológicas encontradas (JOLAD et al., 1982). Depois de anos de estudos, as ACGs são conhecidas por suas propriedades citotóxica, antitumoral, antiparasitária, imunossupressora e pesticida (ZENG et al., 1996b). Desde então, os esforços têm sido feitos em várias direções para elucidar o modo de ação.

3.3.3.1 Potencial citotóxico das acetogeninas

Nas últimas três décadas, muitas publicações que se dedicaram a uma abordagem fitoquímica das ACGs, em que na maioria dos casos o processo de elucidação estrutural foi o principal foco, também foram realizados testes de atividade citotóxica *in vitro* como parte adicional dos estudos experimentais. Afinal, como principal abordagem na busca de potentes agentes antitumorais ao longo dos últimos 50 anos, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células neoplásicas são considerados um parâmetro inicial, porém, importante, uma vez que a maioria dos quimioterápicos utilizados na terapia do câncer são citotóxicos (DE ALMEIDA et al., 2005; HOUGHTON et al., 2007).

Com base nessa premissa e limitada disposição dos dados, na **Tabela 3, p. 39**, é apresentada uma revisão sobre as pesquisas relacionadas à citotoxicidade das ACGs do gênero *Annona* em linhagens neoplásicas humanas, desde o ano 1989 até 2015. Estes dados foram relatados até o presente momento em quinze espécies do gênero: *A. atemoya*, *A. bullata*, *A. cherimolia*, *A. coriaceae*, *A. crassiflora*, *A. densicoma*, *A. glabra*, *A. jahnii*, *A. muricata*, *A. montana*, *A. purpurea*, *A. reticulata*, *A. salzmanii*, *A. spinescens* e *A. squamosa*.

Tabela 3. Valores de IC₅₀ (µg/mL) das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015).

CITOTOXIDADE (IC ₅₀ µg/mL)													
ACETOGENINAS LINEARES													
ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens VERO (1.50 x 10 ⁻¹)	Espécie	Referência
Coriadienina*	-	-	-	-	-	-	1.90 x 10 ⁻⁶	-	-	-	-	<i>A. coriaceae</i>	Silva et al., 1996
Annojahnina	1.50	2.80	5.90 x 10 ⁻²	4.90	1.60 x 10 ⁻²	2.30 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	<i>A. jahmii</i>	Colman-Saizarbitoria et al., 1998
(+)-Monhexocina	-	9.60	-	-	31.00	-	9.60	-	-	44.00	HCT-8 ¹¹ / KB-VIN ¹² / PTX10 ¹³ / U-87-MG ¹⁴	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
(-)-Monhexocina	2.64	10	-	-	-	-	46.00	-	-	43.00	/HCT-8 ¹¹ / KB-VIN ¹² / PTX10 ¹³	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
Muricatacina	16.52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Hep 3B ¹⁵	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
	23.30	9.80	14.00	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1991
Rollicosina	-	-	-	-	-	-	-	1.00 x 10 ⁻¹	2.10 x 10 ⁻²	-	-	<i>A. reticulata</i>	Liaw et al., 2003
ACETOGENINAS MONO-THF													
Annomolona A e 34-epi-annomolona A	1.26	3.03 x 10 ⁻¹	1.93 x 10 ⁻¹	9.30 x 10 ⁻¹	1.98 x 10 ⁻¹	3.12 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	<i>A. cherimolia</i>	Son et al., 2003
Annomolona B e 34-epi-annomolona B	1.37	4.70 x 10 ⁻²	7.19 x 10 ⁻²	3.77 x 10 ⁻¹	5.53 x 10 ⁻²	7.48 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	<i>A. cherimolia</i>	Son et al., 2003
Annomolona	2.37	1.15 x 10 ⁻⁴	8.92 x 10 ⁻⁵	6.88 x 10 ⁻⁴	5.39 x 10 ⁻⁶	2.18	-	-	-	-	-	<i>A. cherimolia</i>	Kim et al., 2001.
Annocherimolina	1.56	4.06 10 ⁻⁶	2.49 x 10 ⁻⁶	1.53 x10 ⁻¹	1.02	1.20 x 10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	<i>A. cherimolia</i>	Kim et al., 2001.
Annocherina	1.67	3.08 x 10 ⁻¹	3.54	2.20 x 10 ⁻²	8.62 x 10 ⁻¹	2.88	-	-	-	-	-	<i>A. cherimolia</i>	Woo et al., 1999.
2,4-cis e trans-annocherinona	1.55	1.55	1.59	3.16 x 10 ⁻²	4.50	5.15	-	-	-	-	-	<i>A. cherimolia</i>	Woo et al., 1999.
Jeteína*	-	-	-	-	-	-	10 ⁻⁵	-	-	-	VERO (10 ⁻²)	<i>A. cherimolia</i>	Cortes et al., 1991
Coriacina*	-	-	-	-	-	-	<3.00 x 10 ⁻⁷	-	-	-	VERO (5.70 x 10 ⁻³)	<i>A. coriaceae</i>	Silva et al., 1996
4-desoxicoriacina*	-	-	-	-	-	-	6.00 x 10 ⁻⁴	-	-	-	VERO (5.00 x 10 ⁻²)	<i>A. coriaceae</i>	Silva et al., 1996
Gigantetronenina*	-	-	-	-	-	-	<3.00 x 10 ⁻⁷	-	-	-	VERO (5.70 x 10 ⁻³)	<i>A. coriaceae</i>	Silva et al., 1996

Tabela 3. Valores de IC₅₀ (µg/mL) das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015).

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens	Espécie	Referência
	-	-	-	-	-	-	-	8.60 x 10 ⁻²	-	-	Hep 3B ¹⁵	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Annonacinona*	1 x 10 ⁻¹	-	1.00 x 10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. densicomona</i>	Xu et al., 1989
	-	3.01 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	MDA-MB231 ¹⁶	<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1991
	-	-	-	-	-	-	1.00 x 10 ⁻²	-	-	-	VERO (10 ⁻¹)	<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
Isoannonacina	2.00 x 10 ⁻²	-	2.00 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. densicomona</i>	Xu et al., 1989
Isoannonacina-10-ona	7.00 x 10 ⁻²	-	9.00 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. densicomona</i>	Xu et al., 1989
Glacina A	1.53	4.42 x 10 ⁻³	2.30	1.25	9.81 x 10 ⁻³	8.57 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1998b
Glacina B	1.29	5.20 x 10 ⁻²	8.68 x 10 ⁻²	2.61	5.59 x 10 ⁻²	2.74 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1998b
Annoglaxina	1.10 x 10 ⁰	4.30 x 10 ⁻⁴	1.80 x 10 ⁻¹	1.80 x 10 ⁰	8.70 x 10 ⁻¹	1.60 x 10 ⁰	-	-	-	-	-	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1999
Annoglacina A	5.30 x 10 ⁻³	9.60 x 10 ⁻⁴	5.30 x 10 ⁻³	9.00 x 10 ⁻¹	2.00 x 10 ⁻³	5.10 x 10 ⁻⁷	-	-	-	-	-	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1999b
Annoglacina B	2.80 x 10 ⁻³	6.20 x 10 ⁻⁴	5.30 x 10 ⁻³	4.00 x 10 ⁻¹	8.40 x 10 ⁻⁴	1.20 x 10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1999b
4-desoxi-18/21-trans-annonontacina-10-ona	1.20	3.80	1.19 x 10 ⁻³	5.90	1.10 x 10 ⁻²	1.10 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	<i>A. jahmii</i>	Colman-Saizarbitoria et al., 1998
4-desoxi-18/21-cis-annonontacina-10-ona	2.00 x 10 ⁻¹	3.60	1.20 x 10 ⁻¹	1.50	1.10 x 10 ⁻¹	1.8 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	<i>A. jahmii</i>	Colman-Saizarbitoria et al., 1998
Montalicina G	6.55	4.80	-	-	9.20	-	5.80	-	-	2.00	Hep 3B ¹⁵ / U-87-MG ¹⁴ / HCT-8 ¹¹ / KB-VIN ¹² / PTX10 ¹³	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
Montalicina H	6.38	30.00	-	-	27.00	-	41.00	-	-	45.00	Hep 3B ¹⁵ / U-87-MG ¹⁴ / HCT-8 ¹¹ / KB-VIN ¹² / PTX10 ¹³	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
Molicina A	4.37	6.90	-	-	15.60	-	9.50	-	-	5.20	Hep 3B ¹⁵ / U-87-MG ¹⁴ / HCT-8 ¹¹ / KB-VIN ¹² / PTX10 ¹³	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
Molicina B	5.61	4.90	-	-	-	-	5.10	-	-	3.00 x 10 ⁻²	Hep 3B ¹⁵	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
4-desoxi-annonontacina	14.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005

Tabela 3. Valores de IC₅₀ (µg/mL) das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens	Espécie	Referência
Annomontacina	-	4.50 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	MDA-MB231 ¹⁶ U-87-MG ¹⁴ /HCT-8 ¹¹	<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1991
Montacina	12.90	10.00	-	-	>20.00	-	16.60	-	-	>10.00	/KB-VIN ¹² / PTX10 ¹³ / SK-MEL-2 ¹⁷ /CAKI ¹⁸ U-87-MG ¹⁴ /HCT-8 ¹¹	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004a
Cis-montacina	6.00	6.70	-	-	11.90	-	7.70	-	-	3.60	/KB-VIN ¹² / PTX10 ¹³	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004a
Montanacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MDA-MB231 ¹⁶	<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1990
Montalicina A	-	-	-	-	-	-	-	1.00 x 10 ⁻²	-	-	Hep 3B ¹⁵	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina B	-	-	-	-	-	-	-	5.30 x 10 ⁻¹	-	-	Hep 3B ¹⁵	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina C	4.30	5.30	-	-	8.00	-	5.50	2.20 x 10 ⁻²	-	1.60	Hep 3B ¹⁵ / KB-VIN ¹² / HCT-8 ¹¹ / U-87-MG ¹⁴ /PTX10 ¹³	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina D	-	-	-	-	-	-	-	1.99	-	-	-	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina E	1.60	3.40	-	-	-	-	3.30	1.30 x 10 ⁻¹	-	0.10	KB-VIN ¹²	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina F	-	-	-	-	-	-	-	< 1.00 x 10 ⁻²	-	-	-	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina I	0.80	2.80	-	-	-	-	2.50	1.10 x 10 ⁻¹	-	2.00 x 10 ⁻²	KB-VIN ¹²	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina J	-	-	-	-	-	-	-	< 1.00 x 10 ⁻²	-	-	Hep 3B ¹⁵	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Xylopiantina	7.10	9.10	-	-	12.80	-	9.70	-	-	3.80	KB-VIN ¹² / HCT-8 ¹¹ / U-87-MG ¹⁴ / PTX10 ¹³	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Annopentocina A	1.71 x 10 ⁻¹	17.93	1.63	6.07 x 10 ⁻¹	1.14	3.58 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1996a
Annopentocina B	2.74x 10 ⁻²	3.56	1.64	3.79 x 10 ⁻¹	2.12 x 10 ⁻¹	1.62 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1996a
Annopentocina C	2.06 x 10 ⁻²	2.97	1.24	2.58 x 10 ⁻¹	2.28 x 10 ⁻¹	4.28 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1996a
cis- e trans-annomuricina-D-ona	<10 ⁻²	6.11 x 10 ⁻¹	<10 ⁻²	1.22 x 10 ⁻¹	1.32	<10 ⁻²	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1996a
Annomuricina E	1.12 x 10 ⁻¹	1.45	6.68 x 10 ⁻²	1.41	1.46 x 10 ⁻¹	2.42 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Kim et al., 1998a
Muricapentocina	1.93 x 10 ⁻¹	1.90	7.10 x 10 ⁻²	1.72	4.50 x 10 ⁻¹	5.03 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Kim et al., 1998a

Tabela 3. Valores de IC₅₀ das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens	Espécie	Referência
Muricoeacina	2.30 x 10 ⁻¹	1.30	5.70 x 10 ⁻¹	7.10 x 10 ⁻¹	2.50 x 10 ⁻²	2.3	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Kim et al., 1998b
Murihexocina C	1.10	3.80	1.30	2.50	8.60 x 10 ⁻¹	4.90 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Kim et al., 1998b
Murisolina*	-	-	-	-	-	-	1 x 10 ⁻¹	-	-	-	VERO (10 ⁻¹)	<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
Corossolona*	-	-	-	-	-	-	1 x 10 ⁻¹	-	-	-	VERO (3.00 x 10 ⁻¹)	<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
	-	-	-	-	-	-	-	4.80 x 10 ⁻¹	2.84 x 10 ⁻¹	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Corossolina*	-	-	-	-	-	-	3.00 x 10 ⁻³	-	-	-	VERO (3.00 x 10 ⁻²)	<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
	-	-	-	-	-	-	-	3.53 x 10 ⁻¹	2.34 x 10 ⁻¹	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricina H	-	-	-	-	-	-	-	9.51 x 10 ⁻²	1.18 x 10 ⁻²	-	-	<i>A. muricata</i>	Liaw et al., 2002
Muricina I	-	-	-	-	-	-	-	5.09 x 10 ⁻²	2.22 x 10 ⁻¹	-	-	<i>A. muricata</i>	Liaw et al., 2002
Cis-annonontacina	-	-	-	-	-	-	-	2.98 x 10 ⁻¹	1.62 x 10 ⁻²	-	-	<i>A. muricata</i>	Liaw et al., 2002
Cis-corossolona	-	-	-	-	-	-	-	1.65 x 10 ⁻¹	4.76 x 10 ⁻²	-	-	<i>A. muricata</i>	Liaw et al., 2002
Annocatalina	-	-	-	-	-	-	-	5.70	3.48 x 10 ⁻³	-	-	<i>A. muricata</i>	Liaw et al., 2002
Muricina A	-	-	-	-	-	-	-	5.04	5.13 x 10 ⁻³	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricina B	-	-	-	-	-	-	-	1.78	4.29 x 10 ⁻³	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricina C	-	-	-	-	-	-	-	4.99 x 10 ⁻¹	3.87 x 10 ⁻³	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricina D	-	-	-	-	-	-	-	6.60 x 10 ⁻⁴	4.80 x 10 ⁻²	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricina F	-	-	-	-	-	-	-	4.28 x 10 ⁻²	3.86 x 10 ⁻³	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricatrocina A e B	-	-	-	-	-	-	-	4.95 x 10 ⁻²	4.83 x 10 ⁻³	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Longifolicina	-	-	-	-	-	-	-	4.04 x 10 ⁻⁴	4.90 x 10 ⁻³	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricatocina A	7.55 x 10 ⁻²	1.23 x 10 ⁻¹	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995a
Muricatocina B	3.34 x 10 ⁻¹	1.03 x 10 ⁻¹	1.66	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995a
Annomicina C	3.08 x 10 ⁻¹	2.28 x 10 ⁻¹	1.54	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995b
Muricatocina C	9.09 x 10 ⁻²	6.45 x 10 ⁻²	1.48	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995b
Annomicina A	3.30 x 10 ⁻¹	>1.0	>1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995c

Tabela 3. Valores de IC₅₀ das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens	Espécie	Referência
Annomuricina B	1.59 x 10 ⁻¹	>1.0	4.35 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995c
Annomutacina	1.57 x 10 ⁻²	>1.0	>1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995d
2,4-trans e cis-10R-annonacin-A-ona	1.74 x 10 ⁻¹	5.70 x 10 ⁻¹	>1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995d
Cis-annonacina	2.30 x 10 ⁻¹	1.18	1.00 x 10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
Cis-annonacin-10-ona	3.50 x 10 ⁻¹	2.90 x 10 ⁻¹	9.00 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
	9.40	10.50	-	-	12.50	-	7.90	-	-	4.50	KB-VIN ¹² / HCT-8 ¹¹ / U-87-MG ¹⁴ / PTX10 ¹³	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Cis-goniothalamicina	1.30 x 10 ⁻¹	1.05	5.30 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
Arianacina	4.70 x 10 ⁻³	4.00 x 10 ⁻¹	4.40	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
Javoricina	1.70 x 10 ⁻²	2.30 x 10 ⁻¹	1.80	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
Goniothalamicina	8.00 x 10 ⁻³	5.70 x 10 ⁻²	1.10 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MDA-MB231 ¹⁶ / Hep 3B ¹⁵ / KB-VIN ¹² / HCT-8 ¹¹ / U-87-MG ¹⁴ / PTX10 ¹³	<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1990
	3.90	4.40	-	-	6.30	-	4.80	2.02 x 10 ⁻¹	-	0.38		<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Murihexocina A	1.32	12.54	3.00	2.51	1.71 x 10 ⁻²	9.73 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1995
Murihexocina B	1.08	6.95	2.30	4.92	1.26 x 10 ⁻¹	4.13 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1995
Annonacina A	1.32	1.96	1.18	1.16	1.33	1.90	-	-	-	-	-	<i>A. purpurea</i>	Chávez & Mata, 1998
Parisina*	-	-	-	-	-	-	1.00 x 10 ⁻⁴	-	-	-	VERO (10 ⁻²)	<i>A. salzmanii</i>	Queiroz et al., 2003
4-desoxiannoreticuína	3.87	2.23	1.69	2.23	2.66	2.88	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998b
Cis-4-desoxiannoreticuína	1.99	1.74	1.42	1.84	2.08	1.09	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998b
2,4-cis- e trans-esquamoxinona	1.89	1.71	1.44	1.48	2.22	4.50 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998b
2,4-cis- e trans-esquamoxinona B	3.80 x 10 ⁻³	1.40 x 10 ⁻³	2.70 x 10 ⁻³	4.00 x 10 ⁻³	5.00 x 10 ⁻²	8.30 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1999
2,4-cis- e trans-esquamoxinona C	2.10 x 10 ⁻¹	1.10 x 10 ⁻³	3.50 x 10 ⁻¹	6.70 x 10 ⁻³	2.24	9.50 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1999

Tabela 3. Valores de IC₅₀ das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens	Espécie	Referência
2,4-cis- e trans-mosinona A	>1	>1	>1	>1	3.20 x 10 ⁻²	2.20 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al.,1997
Mosina B	9.40 x 10 ⁻¹	>1	>1	>1	3.50 x 10 ⁻¹	2.50 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al.,1997
Mosina C	6.00 x 10 ⁻¹	>1	>1	>1	>1	1.20 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al.,1997
Annoreticuina-9-ona	2.70 x 10 ⁻¹	>1	>1	>1	9.60 x 10 ⁻³	2.40 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al.,1997
	10 ⁻²	-	1.32	-	-	-	4.66	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
	-	-	-	-	-	-	3.10	9.10 x 10 ⁻⁴	5.40 x 10 ⁻³	-	CCM ₂ ¹⁹	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1998
Esquafosacina B	4.11 x 10 ¹	5.90 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	4.43 x 10 ⁻¹	-	-	Hep 3B ¹⁵ /MDA-MB231 ¹⁶	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquafosacina C	12.16	15.28	-	-	-	-	-	10.99	-	-	Hep 3B ¹⁵ /MDA-MB231 ¹⁶	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquafosacina F	-	19.77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquafosacina G	-	17.61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquadiolina A	< 1,28 x 10 ⁻¹	1.81	-	-	-	-	-	3.58 x 10 ⁻³	-	-	Hep 3B ¹⁵ /MDA-MB231 ¹⁶	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquadiolina B	1.76	3.50	-	-	-	-	-	7.04 x 10 ⁻³	-	-	Hep 3B ¹⁵ /MDA-MB231 ¹⁶	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquadiolina C	5.06	2.25	-	-	-	-	-	2.17	-	-	Hep 3B ¹⁵ /MDA-MB231 ¹⁶	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Cis-annotemoyina-1	-	17.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Uvariamicina I	-	16.77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Uvariamicina III	-	1.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Muricatetrocina C	5.55 x 10 ⁻⁶	3.19	1.98	3.39 x 10 ⁻²	1.35 x 10 ⁻⁷	5.69 x 10 ⁻⁷	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1996a
Reticulatacina	3.49	2.91	4.66	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Saad et al., 1991
	-	4.80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Liaw et al., 2008
Rollinecina A	1.14 x 10 ⁻⁴	1.44	1.60	7.25 x 10 ⁻⁴	2.62 x 10 ⁻⁴	3.47 x 10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1996c
Rollinecina B	4.23 x 10 ⁻⁴	2.72	1.44	2.29 x 10 ⁻⁴	3.62 x 10 ⁻⁴	2.53 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1996c

Tabela 3. Valores de IC₅₀ das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens PA-1 ²⁰ /SKOV3 ²¹ /HeLaS3 ²² /HeLa ²³ /T24 ²⁴ /BCC-1 ²⁵	Espécie	Referência
Annonacina*	-	4.33 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Yuan et al., 2003
	1.00 x 10 ⁻³	-	3.00 x 10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. densicoma</i>	Xu et al., 1989
	-	-	-	-	-	-	1.00 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
	-	1.47 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1991
Annoretiçuina	5.60	5.20	-	-	8.20	-	5.70	-	-	6.50 x 10 ⁻¹	-	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
	4.00 x 10 ⁻¹	-	2.28	-	-	-	3.37	-	-	-	-	<i>A. montana</i>	Chang et al., 1993
	-	-	-	-	-	-	-	6.40 x 10 ⁻³	-	-	-	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. montana</i>	Chang et al., 1993
Isoannoretocuina	4.00 x 10 ⁻¹	-	3.06	-	-	-	6.96	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
	6.40 x 10 ⁻³	1.60 x 10 ⁻⁷	1.80 x 10 ⁻¹	1.00 x 10 ⁻⁶	1.70 x 10 ⁻⁷	1.10 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1999
Esquamona	1.34	2.14	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
	1.34	2.14	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Li et al., 1990
Solamina*	-	-	-	-	-	-	3.00 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
	-	-	-	-	-	-	3.00 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
	-	-	-	-	-	-	3.00 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	<i>A. muricata</i>	Roblot et al., 1993
	-	-	-	-	-	-	1.73	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
Annomonícina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1990
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. montana</i>	Chang et al., 1998
Cis-/trans-isomurisolina	-	-	-	-	-	-	1.00	4.70 x 10 ⁻²	1.38 x 10 ⁻¹	-	MDA-MB231 ¹⁶	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1998
Cis-/trans-murisolinona	-	-	-	-	-	-	1.00	4.70 x 10 ⁻²	1.38 x 10 ⁻¹	-	CCM ₂ ¹⁹	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1998
Annotemoina-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A548 ³⁵ /Taxol	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
Annoesquamina B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A548 ³⁵ /Taxol	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
Annoesquamina A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A548 ³⁵ /Taxol	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
ACETOGENINAS BIS-THF ADJACENTES													
Esquamocina*	-	-	-	-	-	-	2.7 x 10 ⁻¹	8.80 x 10 ⁻⁴	1.50 x 10 ⁻³	-	CCM ₂ ¹⁹ /CEM ³⁴	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
	1.91 x 10 ⁻⁹	3.16 x 10 ⁻²	> 10	-	-	-	-	-	-	-	SK-MEL-5 ²⁶ /MALME-3M ²⁷	<i>A. bullata</i>	Hui et al., 1991

Tabela 3. Valores de IC₅₀ das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens PA-1 ²⁰ /SKOV3 ²¹ /HeLaS3 ²² /HeLa ²³ /T24 ²⁴ /BCC-1 ²⁵	Espécie	Referência
	-	4.34 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Yuan et al., 2006
	-	-	-	-	-	-	4.00 x 10 ⁻⁴	-	-	VERO (10 ⁻²)	-	<i>A. spinescens</i>	Queiroz et al., 1998
Neoannonina	-	-	-	-	-	-	1.46 x 10 ⁻⁴	1.10 x 10 ⁻⁴	1.26 x 10 ⁻⁴	-	CCM ₂ ¹⁹ /CEM ³⁴	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
Bullatacina	-	-	-	-	-	-	1.17 x 10 ⁻⁴	9.70 x 10 ⁻⁵	1.11 x 10 ⁻⁴	-	CCM ₂ ¹⁹ /CEM ³⁴	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
	< 1.00 x10 ⁻⁸	< 1.00 x10 ⁻⁸	1.06	< 1.00 x10 ⁻⁸	1.62 x 10 ⁻²	< 1.00 x10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
	1.25 x 10 ⁻¹³	-	10 ⁻¹²	-	-	-	6.18 x 10 ⁻¹⁴	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Hui et al., 1989.
	8.99 x 10 ⁻¹²	>10	>10 ⁻¹²	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Li et al., 1990
	3.30 x 10 ⁻²	-	4.30 x 10 ⁻²	-	-	-	-	3.20 x 10 ⁻²	-	-	Hela ²³ /SMMC-7721 ²⁸ /MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Desacetilivaricina	-	-	-	-	-	-	1.35 x 10 ⁻⁴	1.02 x 10 ⁻⁴	1.18 x 10 ⁻⁴	-	CCM ₂ ¹⁹ /CEM ³⁴	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
	6.96 x 10 ⁻⁴	>10	<10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
	4.70 x10 ⁻¹	1.35	1.69	<10 ⁻³	<10 ⁻³	1.92	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Chávez et al., 1999
4-desoxiasimicina	1.83 x 10 ⁻⁴	>10	<10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
2,4-cis- e trans-bulladecinona	3.37 x 10 ⁻⁵	1.07 x 10 ⁻³	2.29 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1994
32-hidroxibullatacina	< 1.00 x10 ⁻⁸	< 1.00 x10 ⁻⁸	1.48	< 1.00 x10 ⁻⁸	1.62 x 10 ⁻²	< 1.00 x10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
31-hidroxibullatacina	< 1.00 x10 ⁻⁸	< 1.00 x10 ⁻⁸	1.21	< 1.00 x10 ⁻⁸	3.16 x 10 ⁻¹	< 1.00 x10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
30-hidroxibullatacina	< 1.00 x10 ⁻⁸	< 1.00 x10 ⁻⁸	1.17	< 1.00 x10 ⁻⁸	4.33 x 10 ⁻³	< 1.00 x10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995,
2,4-cis-28-hidroxi bullatacinona	4.38 x 10 ⁻⁴	4.46 x 10 ⁻⁴	6.90 x 10 ⁻⁴	4.35	2.33	1.02 x 10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
2,4-trans-28-hidroxi bullatacinona	3.18 x 10 ⁻²	1.71	1.45	1.00 x 10 ⁻³	9.04	1.19 x 10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
2,4-cis e trans-32-hidroxibullatacinona	1.25 x 10 ⁻³	1.61 x 10 ⁻¹	<10 ⁻¹²	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993b
2,4-cis e trans-31-hidroxibullatacinona	3.29 x 10 ⁻¹¹	7.63 x 10 ⁻⁴	1.09 x 10 ⁻¹²	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993b
2,4-cis e trans-30-hidroxibullatacinona	1.66 x 10 ⁻⁹	1.05 x 10 ⁻¹	<10 ⁻¹²	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993b
2,4-cis e trans-bullatacinona	2.18 x 10 ⁻³	12.16	1.19 x 10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993b
Bullatacinona	< 10 ⁻³	-	5 x 10 ⁻¹²	-	-	-	< 10 ⁻¹²	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Hui et al., 1989.

Tabela 3. Valores de IC₅₀ das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens	Espécie	Referência
	-	-	-	-	-	-	4.80 x 10 ⁻¹	7.90 x 10 ⁻²	1.38 x 10 ⁻¹	-	CCM ₂ ¹⁹	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1998
	1.44 x 10 ⁻⁴	<10 ⁻⁷	<10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Li et al., 1990
Itrabina*	-	-	-	-	-	-	10 ⁻⁵	-	-	-	VERO (10 ⁻²)	<i>A. cherimolia</i>	Cortes et al., 1991
Laerradurina*	-	-	-	-	-	-	10 ⁻⁵	-	-	-	VERO (10 ⁻²)	<i>A. cherimolia</i>	Cortes et al., 1991
Araticulina	6.00 x 10 ⁻³	4.00 x 10 ⁻³	6.00 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	RPMI-7951 ³⁰ / U-251 ³¹	<i>A. crassiflora</i>	Santos et al., 1996
Glabracina A	2.8 x 10 ⁻⁶	4.2 x 10 ⁻⁶	5.7 x 10 ⁻⁶	1.00	1.10	1.80	-	-	-	-	-	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1998a
Glabracina B	1.6 x 10 ⁻⁶	1.8 x 10 ⁻³	1.9 x 10 ⁻²	1.40	1.20	2.8 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1998a
27-hidroxi-bullatacina	2.10 x 10 ⁻³	7.80 x 10 ⁻⁴	1.80 x 10 ⁻⁵	3.10 x 10 ⁻⁸	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	-	-	-	-	-	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1999a
Annocatacina A	-	-	-	-	-	-	-	12.11	8.17 x 10 ⁻¹	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang et al., 2003
Annocatacina B	-	-	-	-	-	-	-	3.35 x 10 ⁻²	2.22 x 10 ⁻¹	-	-	<i>A. muricata</i>	Chang et al., 2003
Purpurediolina	4.43 x 10 ⁻¹	9.16 x 10 ⁻¹	<10 ⁻⁷	1.36	3.53 x 10 ⁻¹	1.44	-	-	-	-	-	<i>A. purpurea</i>	Chávez & Mata, 1998
Purpurenina	1.29	1.67	3.16 x 10 ⁻¹	1.25	1.07	1.98	-	-	-	-	-	<i>A. purpurea</i>	Chávez & Mata, 1998
Annoglaucina	1.08	1.56	<10 ⁻⁷	1.01	3.56 x 10 ⁻¹	1.45	-	-	-	-	-	<i>A. purpurea</i>	Chávez & Mata, 1998
Purpuracina	4.80 x 10 ⁻²	>10	>10	<10 ⁻³	<10 ⁻³	>10	-	-	-	-	-	<i>A. purpurea</i>	Chávez & Mata, 1999
Salzmanolina*	-	-	-	-	-	-	1.00 x 10 ⁻³	-	-	-	VERO (> 10 ⁻²)	<i>A. salzmanii</i>	Queiroz et al., 2003
Salzmanina*	-	-	-	-	-	-	10 ⁻⁵	-	-	-	VERO (>10 ⁻²)	<i>A. salzmanii</i>	Queiroz et al., 1999
Carolina A*	-	-	-	-	-	-	10 ⁻⁷	-	-	-	VERO (2.00 x 10 ⁻³)	<i>A. spinescens</i>	Queiroz et al., 1998
Carolina B*	-	-	-	-	-	-	5.00 x 10 ⁻⁶	-	-	-	VERO (3.70 x 10 ⁻³)	<i>A. spinescens</i>	Queiroz et al., 1998
Carolina C*	-	-	-	-	-	-	2.00 x 10 ⁻⁴	-	-	-	VERO (5.00 x 10 ⁻²)	<i>A. spinescens</i>	Queiroz et al., 1998
Espinencina*	-	-	-	-	-	-	1.00 x 10 ⁻⁵	-	-	-	VERO (6.00 x 10 ⁻³)	<i>A. spinescens</i>	Queiroz et al., 1998
2,4-cis- e trans-esquamolinona	1.85	1.76	1.70	1.80	2.62	1.10	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998a
2,4-cis e trans-9-oxo-asimicinona	5.71 x 10 ⁻³	2.59 x 10 ⁻¹	4.03 x 10 ⁻³	4.55 x 10 ⁻¹	1.12	1.22	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998a
Bullacina B	8.98 x 10 ⁻⁷	2.47 x 10 ⁻⁷	4,51 x 10 ⁻³	>1	>1	4.11 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998a

Tabela 3. Valores de IC₅₀ das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens	Espécie	Referência
Annoesquacina A	2.40	4.10 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	2.90	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
Annoesquacina B	8.50 x 10 ⁻¹	3.00 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	1.20	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
Annoesquacina C	1.60 x 10 ⁻¹	8.80 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	3.10 x 10 ⁻¹	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
Annoesquacina D	4.80	3.00 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	4.60	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
2,4-cis- e trans-9-hidroxi asimicinona	7.70 x 10 ⁻²	1.20 x 10 ⁻³	1.40	3.60 x 10 ⁻²	1.60 x 10 ⁻¹	1.70 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1999
Rollidecina A	1.40 x 10 ⁻²	1.78	1.42	5.40 x 10 ⁻¹	1.65 x 10 ⁻⁴	1.41 x 10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Shi et al., 1996a
Rollidecina B	3.73 x 10 ⁻⁵	1.32	1.69	2.28 x 10 ⁻⁵	1.73 x 10 ⁻⁵	3.44 x 10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Shi et al., 1996a
Annoesquacina I	1.20 x 10 ⁻²	5.20 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	2.20 x 10 ⁻²	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Uvarigrandina A	8.00 x 10 ⁻²	9.60 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	7.80 x 10 ⁻¹	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Esquamotacina	2.77 x 10 ⁻²	>1	1.00 x 10 ⁻³	>1	1.72 x 10 ⁻⁹	1.33 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1996
Molvizarina	6.30 x 10 ⁻²	>1	7.32 x 10 ⁻³	7.09 x 10 ⁻¹	4.47 x 10 ⁻⁸	7.66 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1996
Esquamocina-O₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K562 ³² / HLE ³³	<i>A. squamosa</i>	Araya et al., 2002
Esquamocina-O₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K562 ³² / HLE ³³	<i>A. squamosa</i>	Araya et al., 2002
Rollidecina C	1.32	1.07	5.26 x 10 ⁻²	1.44	2.86 x 10 ⁻¹	1.08 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Gu et al., 1997
Rollidecina D	5.87	5.05	5.39	3.99	1.90	1.03	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Gu et al., 1997
Mucoxina	3.60 x 10 ⁻²	3.70 x 10 ⁻³	6.10 x 10 ⁻¹	8.40 x 10 ⁻¹	3.10 x 10 ⁻¹	3.30 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1996b
Membranacina	4.00 x 10 ⁻¹	2.18	3.04	<10 ⁻³	<10 ⁻³	2.10	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Chávez et al., 1999
Rollitacina	1.60	2.50 x 10 ⁻⁴	4.60 x 10 ⁻³	1.50	1.10	3.00	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1997
Rollinacina	4.60 x 10 ⁻²	1.60 x 10 ⁻¹	2.10	1.60	2.50	2.00	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1997

Tabela 3. Valores de IC₅₀ das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens	Espécie	Referência
Rolliniastatina 2	<10 ⁻³	-	6.40 x 10 ⁻¹	-	-	-	2.29	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
Motrilina	71.8	25.3	68.6	-	-	-	-	22.3	-	-	-	<i>A. cherimolia</i>	Tormo et al., 2005
ACETOGENINAS BIS-THF NÃO ADJACENTES													
12,15-cis-esquamostatina-D	-	-	-	-	-	-	4.05 x 10 ⁻⁴	2.20 x 10 ⁻⁴	3.10 x 10 ⁻³	-	-	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
Esquamostatina D	-	-	-	-	-	-	3.90 x 10 ⁻⁴	1.50 x 10 ⁻⁴	1.50 x 10 ⁻³	-	-	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
Bullatanocina	<10 ⁻⁸	6.09 x 10 ⁻¹	<10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
	8.00 x 10 ⁻³	3.00 x 10 ⁻³	2.00 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	RPMI-7951 ³⁰ / U-251 ³¹	<i>A. crassiflora</i>	Santos et al., 1994
cis- bullatanocinona	1.26	4.41 x 10 ⁻²	7.32 x 10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
trans- bullatanocinona	1.65	5.31 x 10 ⁻⁴	5.67 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
Bullatalicina	<10 ⁻⁸	3.22 x 10 ⁻¹	<10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
Bullatalicinona	1.63 x 10 ⁻²	8.51 x 10 ⁻⁴	5.03 x 10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-	-	SK-MEL-5 ²⁶ / MALME-3M ²⁷	<i>A. bullata</i>	Hui et al., 1991
Otivarina*	-	-	-	-	-	-	10 ⁻⁵	-	-	-	VERO (10 ⁻²)	<i>A. cherimolia</i>	Cortes et al., 1991
Annoesquatina A	4.90 x 10 ⁻¹	6.63 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	4.50 x 10 ⁻¹	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
Annoesquatina B	8.40 x 10 ⁻²	1.50 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	2.00	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
Annoesquatina-I	3.10 x 10 ⁻¹	5.00 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	1.70 x 10 ⁻¹	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Annoesquatina – II	6.80 x 10 ⁻¹	7.50 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	8.00 x 10 ⁻¹	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Esquamostatina A	2.10 x 10 ⁻¹	1.50 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	8.30 x 10 ⁻¹	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Esquamostatina D	-	1.10 x 10 ⁻¹	-	-	-	-	-	5.60 x 10 ⁻¹	-	-	Hela ²³ / SMMC-7721 ²⁸ / MNK-45 ²⁹	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011

Tabela 3. Valores de IC₅₀ das acetogeninas testadas em linhagens de células neoplásicas humanas e VERO (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	A-549 ¹	MCF-7 ²	HT-29 ³	A-498 ⁴	PC-3 ⁵	PaCa-2 ⁶	KB ⁷	Hep G2 ⁸	Hep 2,2,15 ⁹	1A9 ¹⁰	Outras linhagens	Espécie	Referência
Cherimolina-1	-	-	-	-	-	-	10 ⁻⁴	-	-	-	HeLa ²³	<i>A. cherimolia</i>	Duret et al., 1994
Isocherimolina-1	-	-	-	-	-	-	3 x 10 ⁻⁴	-	-	-	HeLa ²³	<i>A. cherimolia</i>	Duret et al., 1994
12,15-cis esquamostatina A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A549 ³⁵ /Taxol	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
Esquamostanina B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A549 ³⁵ /Taxol	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
Esquamostanina A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A549 ³⁵ /Taxol	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
Esquamostatina E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A549 ³⁵ /Taxol	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
ACETOGENINAS NÃO CLÁSSICAS													
Jimenezina	1.64 x 10 ⁻²	>10 ⁻¹	4.25 x 10 ⁻³	4.94 x 10 ⁻²	2.77 x 10 ⁻⁴	1.69 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Chávez et al., 1998
Muconina	4.50 x 10 ⁻³	2.40 x 10 ⁻⁴	3.90 x 10 ⁻¹	1.80 x 10 ⁻¹	5.80 x 10 ⁻¹	5.40 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1996b
ACETOGENINAS NÃO THF OU THP													
Epomuricenina A e B*	-	-	-	-	-	-	2.00	-	-	-	VERO (>10)	<i>A. muricata</i>	Roblot et al., 1993
Diepomuricanina A*	-	-	-	-	-	-	3,00 x 10 ⁻²	-	-	-	VERO (2.40)	<i>A. muricata</i>	Roblot et al., 1993

¹Carcinoma de pulmão humano, ²Carcinoma de mama humano, ³Adenocarcinoma de colon humano, ⁴Carcinoma de rins humano, ⁵Adenocarcinoma de próstata humano, ⁶Carcinoma pancreático humano, ⁷Carcinoma epidermoide nasofaríngeo humano, ⁸Carcinoma hepatocelular humano [HBsAg] [-], ⁹Hepatoma HBV tranfectado humano, ¹⁰Câncer de ovário humano, ¹¹Câncer ileocecal humano, ¹²Carcinoma epidermoide nasofaríngeo humano resistente a vincristina, ¹³Câncer de ovário humano com mutação β-tubulina, ¹⁴Glioblastoma humano, ¹⁵Carcinoma hepatocelular humano [HBsAg] [+], ¹⁶Adenocarcinoma de mama humano, ¹⁷Melanoma humano, ¹⁸Câncer renal humano, ¹⁹Tumor de colon humano, ²⁰Câncer de ovário humano, ²¹Câncer de ovário humano, ²²Câncer cervical humano, ²³Carcinoma cervical humano, ²⁴Câncer de bexiga humano, ²⁵Câncer de pele humano, ²⁶Melanoma maligno humano derivado de metástase do gânglio axilar, ²⁷Melanoma maligno humano derivado de metástase do pulmão, ²⁸Hepatoma humano, ²⁹Adenocarcinoma gástrico humano, ³⁰Melanoma humano derivado de metástase do linfonodo, ³¹Glioblastoma humano, ³²Leucemia mieloide crônica humana, ³³Hepatoma humano; ³⁴Leucemia linfoblástica humana, ³⁵Carcinoma de pulmão humano resistente a Taxol* substâncias testadas em células de origem não tumoral de rins de macaco verde africano (VERO)

Nessas diretrizes, reuniram-se dados de citotoxicidade para 201 ACGs com esqueletos diferentes, que foram organizadas e classificadas de acordo com o sistema de classificação geral das ACGs, como exemplificado na **Figura 6, p. 37**. A **Tabela 3, p. 39**, elenca valores de IC_{50} (concentração inibitória necessária para a morte de 50% das células) obtidos para estas ACGs em linhagens neoplásicas humanas. No total, trinta e cinco linhagens de células diferentes foram usadas para avaliar o efeito citotóxico das ACGs. As linhagens de tumores sólidos foram as mais selecionadas, destacando-se as linhagens de carcinoma de pulmão humano (A-549), carcinoma de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma de colon humano (HT-29), carcinoma de rim humano (A-498), adenocarcinoma de próstata humano (PC-3), carcinoma pancreático humano (PaCa-2), carcinoma epidermoide nasofaríngeo humano (KB), carcinoma hepatocelular humano (Hep G2), hepatoma humano transfectado com HBV (Hep 2,2,15), câncer de ovário humano (1-A9). A seleção destas linhagens celulares está associada com a maior incidência de câncer nestes tecidos/órgãos: pulmão, fígado, estômago, colo-retal e mama, segundo dados da World Health Organization (WHO), em 2012 (WHO, 2014).

Nos trabalhos que serviram como apoio para a reunião dos dados expostos na **Tabela 3, p. 39**, observa-se que a atividade citotóxica das ACGs foi avaliada em diferentes linhagens, métodos e condições experimentais. Portanto, é imprescindível enfatizar que, pelo fato dos estudos terem sido realizados sob condições distintas, é difícil estabelecer comparações entre todos os resultados obtidos avaliando-se todas as substâncias. Porém, de modo geral, 183 das ACGs testadas, de um total de 201, mostraram bioatividade para pelo menos uma das linhagens avaliadas. De acordo com o National Cancer Institute (NCI), substâncias puras com o valor da $IC_{50} \leq 4$ $\mu\text{g/mL}$, são consideradas ativas (SUFFNESS & PEZZUTO, 1990).

Numa análise abrangente da **Tabela 3, p. 39**, os dados mostram uma considerável heterogeneidade na potência e atividade entre as diferentes substâncias testadas. É evidente que as ACGs, possuem, em graus variados, citotoxicidade *in vitro* em uma grande variedade de linhagens de células cancerígenas. Essas avaliações apresentam valores de IC_{50} basicamente entre 10^{-1} e 10^{-12} $\mu\text{g/mL}$ de acordo com a ACG e o tipo de linhagem celular.

Contudo, almejando buscar uma relação estrutura atividade e salvando as numerosas exceções, em evidência quanto ao potencial citotóxico, no painel das 10 linhagens mais testadas, as ACGs mais ativas são as bis-THF adjacentes. Este dado corrobora com outras avaliações de citotoxicidade com relação à estrutura-atividade das ACGs para várias linhagens tumorais humanas, ressaltando este grupo como o de maior potencial biológico entre todas as ACGs (RUPPRECHT et al., 1990; FANG et al., 1993; ZENG et al., 1996b; TORMO et al., 1999). Já a potência das ACGs mono-THF em diferentes linhagens de tumores sólidos é em torno de 10^{-1} a 10^{-6} $\mu\text{g/mL}$, não sendo, portanto, tão ativas quando comparadas com as ACGs bis-THF adjacentes.

Sendo quantitativamente pouco isoladas, as ACGs lineares, não-clássicas e não-THF ou -THP, não se mostraram tão promissoras quanto as mono-THF e as bis-THF, em relação à citotoxicidade.

Com base nos exemplos das ACGs citotóxicas mencionadas na **Tabela 3, p. 39**, a **Tabela 4, p. 53**, mostra a distribuição destas ACGs bioativas isoladas das espécies do gênero *Annona* em associação com a parte da planta estudada, processo de extração e fórmula molecular. A **Figura 7, p. 63**, e a **Figura 8, p. 63**, resumizam as informações da **Tabela 4, p. 53**, quantificando as ACGs citotóxicas nas espécies e, quanto a parte da planta usada na investigação fitoquímica, respectivamente.

Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero *Annona* (1989-2015).

ACETOGENINAS LINEARES								
ACETOGENINA	Número total de carbonos	Massa molecular	Fórmula molecular	Parte da planta	Extração	Posição da OH	Espécie	Referência
Coriadienina	37	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	Raiz	EtOH	4, 10, 21, 22	<i>A. coriaceae</i>	Silva et al., 1996
Annojahnina	37	590	C ₃₇ H ₆₆ O ₅	Galhos	EtOH	17, 18	<i>A. jahmii</i>	Colman-Saizarbitoria et al., 1998
(+)-Monhexocina	35	614	C ₃₅ H ₆₆ O ₈	Sementes	MeOH	4, 9, 15, 16, 19, 20	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
(-)-Monhexocina	35	614	C ₃₅ H ₆₆ O ₈	Sementes	MeOH	4, 15, 16, 19, 20	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
Muricatacina	17	284	C ₁₇ H ₃₂ O ₃	Sementes	MeOH	5	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
				Sementes	EtOH		<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1991
Rollicosina	22	396	C ₂₂ H ₃₆ O ₆	Frutos	AcOEt	4,15	<i>A. reticulata</i>	Liaw et al., 2003
ACETOGENINAS MONO-THF								
Annomolona A e 34- <i>epi</i> -annomolona A	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Sementes	EtOH	15, 20, 34	<i>A. cherimolia</i>	Son et al., 2003
Annomolona B e 34- <i>epi</i> -annomolona B	35	610	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Sementes	EtOH	4, 15, 20, 34	<i>A. cherimolia</i>	Son et al., 2003
Annomolina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	EtOH	4, 7, 8, 18	<i>A. cherimolia</i>	Kim et al., 2001.
Annocherimolina	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	EtOH	4, 9, 13, 18	<i>A. cherimolia</i>	Kim et al., 2001.
Annocherina	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Sementes	EtOH	4, 15, 20	<i>A. cherimolia</i>	Woo et al., 1999.
2,4- <i>cis</i> e <i>trans</i> -annocherinona	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Sementes	EtOH	15, 20	<i>A. cherimolia</i>	Woo et al., 1999.
Jeteína	35	598	C ₃₅ H ₆₆ O ₇	Sementes	MeOH	10,15,20	<i>A. cherimolia</i>	Cortes et al., 1991
Coriacina	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Raiz	EtOH	4, 14, 21, 22	<i>A. coriaceae</i>	Silva et al., 1996
4-desoxicoriacina	37	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	Raiz	EtOH	14, 21, 22	<i>A. coriaceae</i>	Silva et al., 1996
Gigantetronenina	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Raiz	EtOH	4, 14, 17, 18	<i>A. coriaceae</i>	Silva et al., 1996
				Sementes	MeOH		<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Annonacinona	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Casca do caule	EtOH	4,15,20	<i>A. densicoma</i>	Xu et al., 1989
				Sementes	Éter de petróleo		<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1991

Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero *Annona* (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	Número total de carbonos	Massa molecular	Fórmula molecular	Parte da planta	Extração	Posição da OH	Espécie	Referência
				Sementes	Éter de petróleo		<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
Isoannonacina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Casca do caule	EtOH	10,15,20	<i>A. densicoma</i>	Xu et al., 1989
Isoannonacin-10-ona	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Casca do caule	EtOH	15,20	<i>A. densicoma</i>	Xu et al., 1989
Glacina A	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Folhas	EtOH	4, 12, 17, 22	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1998b
Glacina B	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Folhas	EtOH	4, 12, 15, 20	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1998b
Annogloxina	35	610	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Folhas	EtOH	8, 15, 20, 22	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1999
Annoglacina A	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Folhas	EtOH	4, 12, 17, 22	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1999b
Annoglacina B	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Folhas	EtOH	4, 12, 17, 22	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1999b
4-desoxi-18/21-trans-annomontacina-10-ona	37	620	C ₃₇ H ₆₄ O ₇	Galhos	EtOH	17, 22	<i>A. jahni</i>	Colman-Saizarbitoria et al., 1998
4-desoxi-18/21-cis-annomontacina-10-ona	37	620	C ₃₇ H ₆₄ O ₇	Galhos	EtOH	17, 22	<i>A. jahni</i>	Colman-Saizarbitoria et al., 1998
Montalicina G	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Sementes	MeOH	4, 7, 9, 15, 20	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
Montalicina H	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Sementes	MeOH	4, 7, 9, 15, 20	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
Molicina A	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4, 7, 8, 18	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
Molicina B	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4, 7, 8, 18	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
4-deoxy Annomontacina	37	608	C ₃₇ H ₆₈ O ₆	Sementes	MeOH	10, 17, 22	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2005
Annomontacina	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	Éter de petróleo	4,10,17,22	<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1991
Montacina	35	610	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Sementes	MeOH	4,9,20,25	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004a
Cis-montacina	35	610	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Sementes	MeOH	4,9,20,25	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004a
Montanacina	37	640	C ₃₇ H ₆₈ O ₈	Sementes	Éter de petróleo	4, 8, 13, 19, 24	<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1990
Montalicina A	33	552	C ₃₃ H ₆₀ O ₆	Sementes	MeOH	4, 13, 18	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina B	35	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Sementes	MeOH	4, 13, 18	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina C	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4,7,13,18	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina D	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4,11,13,18	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina E	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	MeOH	4,7,13,18	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b

Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero *Annona* (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	Número total de carbonos	Massa molecular	Fórmula molecular	Parte da planta	Extração	Posição da OH	Espécie	Referência
Montalicina F	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4,9,15,20	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina I	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	MeOH	4,9,15,20	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Montalicina J	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	MeOH	4,11,17,22	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Xylopiantina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4,8,15,20	<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Annopentocina A	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,16,19,20	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1996a
Annopentocina B	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,16,19,20	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1996a
Annopentocina C	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,16,19,20	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1996a
<i>cis- e trans-annomuricina-D-ona</i>	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	10,11,15,20	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1996a
Annomuricina E	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,11,15,20	<i>A. muricata</i>	Kim et al., 1998a
Muricapentocina	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,8,12,15,20	<i>A. muricata</i>	Kim et al., 1998a
Muricoreacina	35	628	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	Folhas	EtOH	4,8,10,16,19,20	<i>A. muricata</i>	Kim et al., 1998b
Murihexocina C	35	628	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	Folhas	EtOH	4,7,8,16,19,20	<i>A. muricata</i>	Kim et al., 1998b
Murisolina	35	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Sementes	Éter de petróleo	4,15,20	<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
Corossolona	35	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	Sementes	Éter de petróleo	15,20	<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
				Sementes	MeOH		<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Corossolina	35	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Sementes	Éter de petróleo	10,15,20	<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
				Sementes	MeOH		<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricina H	35	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Sementes	MeOH	19,24,25	<i>A. muricata</i>	Liaw et al., 2002
Muricina I	37	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	Sementes	MeOH	19,24,25	<i>A. muricata</i>	Liaw et al., 2002
<i>Cis-annomontacina</i>	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	MeOH	4,10,17,22	<i>A. muricata</i>	Liaw et al., 2002
<i>Cis-corossolona</i>	35	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	Sementes	MeOH	15,20	<i>A. muricata</i>	Liaw et al., 2002
Annocatalina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4, 19, 28, 29	<i>A. muricata</i>	Liaw et al., 2002
Muricina A	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4,19,26,27	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricina B	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4,19,26,27	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001

Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero *Annona* (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	Número total de carbonos	Massa molecular	Fórmula molecular	Parte da planta	Extração	Posição da OH	Espécie	Referência
Muricina C	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4,21,24,25	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricina D	33	568	C ₃₃ H ₆₀ O ₇	Sementes	MeOH	4,19,22,23	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricina F	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Sementes	MeOH	4,21,27,28	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricatetrocina A e B	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	4,16,19,20	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Longifolicina	35	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Sementes	MeOH	10,13,18	<i>A. muricata</i>	Chang & Wu, 2001
Muricatocina A	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,12,15,20	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995a
Muricatocina B	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,12,15,20	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995a
Annomuricina C	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,11,15,20	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995b
Muricatocina C	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,12,15,20	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995b
Annomuricina A	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,11,15,20	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995c
Annomuricina B	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,11,15,20	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995c
Annomutacina	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Folhas	EtOH	4,10,17,22	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995d
2,4-trans e cis-10R-annonacin-A-ona	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Folhas	EtOH	10, 15, 20	<i>A. muricata</i>	Wu et al., 1995d
Cis-annonacina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	Hexano	4,10,15,20	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
Cis-annonacin-10-ona	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Sementes	Hexano	4,15,20	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
				Sementes	MeOH		<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Cis-goniothalamicina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	Hexano	4,10,13,18	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
Arianacina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	Hexano	4,12,15,20	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
Javoricina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	Hexano	4,12,15,20	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
Goniothalamicina	35	595	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	Hexano	4,10,13,18	<i>A. muricata</i>	Rieser et al., 1996
				Sementes	Éter de petróleo		<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1990.
				Sementes	MeOH		<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Murihexocina A	35	628	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	Folhas	EtOH	4, 7, 8, 16, 19, 20	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1995
Murihexocina B	35	628	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	Folhas	EtOH	4, 7, 8, 16, 19, 20	<i>A. muricata</i>	Zeng et al., 1995
Annonacina A	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	CHCl ₃ :MeOH	4,10,15,20	<i>A. purpurea</i>	Chávez & Mata, 1998

Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero *Annona* (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	Número total de carbonos	Massa molecular	Fórmula molecular	Parte da planta	Extração	Posição da OH	Espécie	Referência
Parisina	37	656	C ₃₇ H ₆₈ O ₉	Raiz	MeOH	4,15,20,23,24,36	<i>A. salzmanii</i>	Queiroz et al., 2003
4-desoxi annoreticuina	35	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Casca	EtOH	9,15,20	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998b
Cis-4-desoxi Annoreticuina	35	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Casca	EtOH	9,15,20	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998b
2,4-cis- e trans-esquamoxinona	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Casca	EtOH	11,17,22	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998b
2,4-cis- e trans-esquamoxinona B	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Casca	EtOH	11,17,22	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1999
2,4-cis- e trans-esquamoxinona C	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Casca	EtOH	11,17,22	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1999
2,4-cis- e trans- mosinona A	37	620	C ₃₇ H ₆₄ O ₇	Casca	EtOH	15,20	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1997
Mosina B	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Casca	EtOH	4,15,20	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1997
Mosina C	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Casca	EtOH	4,15,20	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1997
Annoreticuina-9-ona	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Casca	EtOH	4,15,20	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1997
				Folhas	MeOH		<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
				Sementes	AcOEt		<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1998
Esquafosacina B	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	MeOH	15, 20, 27, 28	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquafosacina C	35	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Sementes	MeOH	11, 17, 22	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquafosacina F	35	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	Sementes	MeOH	15, 20	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquafosacina G	37	592	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	Sementes	MeOH	19, 24	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquadiolina A	37	640	C ₃₇ H ₆₈ O ₈	Sementes	MeOH	15, 16, 19, 24, 28	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquadiolina B	37	640	C ₃₇ H ₆₈ O ₈	Sementes	MeOH	16, 19, 20, 23, 24	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Esquadiolina C	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	MeOH	4, 16, 21,22	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Cis-annotemoyina-1	35	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	Sementes	MeOH	17, 22	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Uvariamicina I	37	592	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	Sementes	MeOH	15,20	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Uvariamicina III	37	592	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	Sementes	MeOH	19, 24	<i>A. squamosa</i>	Liaw et al., 2008
Muricatetrocina C	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Folhas	EtOH:CH ₂ Cl ₂	4,16,19,20	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1996a
Reticulatacina	37	592	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	Casca	EtOH	17,22	<i>A. reticulata</i>	Saad et al., 1991

Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero *Annona* (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	Número total de carbonos	Massa molecular	Fórmula molecular	Parte da planta	Extração	Posição da OH	Espécie	Referência
				Sementes	MeOH		<i>A. reticulata</i>	Liaw et al., 2008
Rollinecina A	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Folhas	EtOH	4, 14, 17, 22	<i>A. reticulata</i>	Shi et al. 1996c
Rollinecina B	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Folhas	EtOH	4, 14, 17, 22	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1996c
Annonacina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Folhas	MeOH	4,10,15,20	<i>A. reticulata</i>	Yuan et al., 2003
				Casca do caule	EtOH		<i>A. densicoma</i>	Xuet al., 1989
				Sementes	Éter de petróleo		<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
				Sementes	Éter de petróleo		<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1991
				Sementes	MeOH		<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Annoretiucina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Folhas	MeOH	4,9,15,20	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
				Sementes	MeOH		<i>A. montana</i>	Liaw et al., 2004b
Isoannoretiucina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Folhas	MeOH	9, 15,20	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Casca	EtOH	9,15,20	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1999
Esquamona	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Folhas	MeOH	15,20	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
				Casca	EtOH		<i>A. squamosa</i>	Li et al., 1990
Solamina	35	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	Folhas	MeOH	15,20	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
				Sementes	Éter de petróleo		<i>A. muricata</i>	Myint et al., 1991
				Sementes	MeOH		<i>A. muricata</i>	Roblot et al., 1993
Annomonicina	35	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	MeOH	4,8,13,15,20	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
				Sementes	Éter de petróleo		<i>A. montana</i>	Jossang et al., 1990.
Cis-/trans-isomurisolina	35	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	Sementes	AcOEt	15, 20	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1998
Cis-/trans-murisolinona	35	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Sementes	AcOEt	4, 15, 20	<i>A. reticulata</i>	Chang et 1998
Annotemoina-1	35	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	Sementes	EtOH	17,22	<i>A. squamosa</i>	Yuan et. 2015
Annoesquamina B	35	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	Sementes	EtOH	11,16	<i>A. squamosa</i>	Yuan et. 2015
Annoesquamina A	35	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	Sementes	EtOH	9,14	<i>A. squamosa</i>	Yuan et. 2015
ACETOGENINAS BIS-THF ADJACENTES								
Esquamocina	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	AcOEt	15,24,28	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
				Casca	EtOH		<i>A. bullata</i>	Hui et al. 1991

Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero *Annona* (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	Número total de carbonos	Massa molecular	Fórmula molecular	Parte da planta	Extração	Posição da OH	Espécie	Referência
				Sementes	AcOEt		<i>A. reticulata</i>	Yuan et al., 2006
				Sementes	MeOH		<i>A. spinescens</i>	Queiroz et al., 1998
Neoannonina	35	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	Sementes	AcOEt	13,22	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
Bullatacina	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	AcOEt	4,15,24	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
				Casca	EtOH		<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
				Casca	EtOH		<i>A. bullata</i>	Hui et al., 1989.
				Casca	EtOH		<i>A. squamosa</i>	Li et al., 1990
				Sementes	EtOH		<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Desacetiluaricina	37	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	Sementes	AcOEt	15,24	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
				Casca	EtOH		<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
				Sementes	CHCl ₃ :MeOH (1:1)		<i>A. reticulata</i>	Chávez et al., 1999
4-desoxiasimicina	37	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	Casca	EtOH	15,24	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
2,4-cis- e trans-bulladecina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	20,23,24	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1994
32-hidroxi-bullatacina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	4,15,24,32	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
31-hidroxi-bullatacina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	4,15,24,31	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
30-hidroxi-bullatacina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	4,15,24,30	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
2,4-cis-28-hidroxi Bullatacinona	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	15,24,28	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
2,4-trans-28-hidroxi Bullatacinona	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	15,24,28	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1995
2,4-cis e trans-32-hydroxybullatacinona	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	15, 24, 32	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993b
2,4-cis e trans-31-hydroxybullatacinona	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	15, 24, 31	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993b
2,4-cis e trans-30-hydroxybullatacinona	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	15, 24, 30	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993b
2,4- cis e trans-bullatacinona	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Casca	EtOH	15, 24	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993b
Bullatacinona	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Casca	EtOH	15,24	<i>A. bullata</i>	Hui et al., 1989.
				Sementes	EtOH		<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1998
				Casca do caule	EtOH		<i>A. squamosa</i>	Li et al., 1990

Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero *Annona* (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	Número total de carbonos	Massa molecular	Fórmula molecular	Parte da planta	Extração	Posição da OH	Espécie	Referência
Itrabina	35	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	MeOH	13,22,33	<i>A. cherimolia</i>	Cortes et al., 1991
Laerradurina	37	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	Éter de petróleo	15,24,35	<i>A. cherimolia</i>	Cortes et al., 1991
Araticulina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	EtOH	4,12,15,24	<i>A. crassiflora</i>	Santos et al., 1996
Glabracina A	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,23,24	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1998a
Glabracina B	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Folhas	EtOH	4,10,23,24	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1998a
27- hidroxibullatacina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Folhas	EtOH	4,15,24,27	<i>A. glabra</i>	Liu et al., 1999a
Annocatacina A	35	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	Sementes	MeOH	4, 23	<i>A. muricata</i>	Chang et al., 2003
Annocatacina B	35	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	Folhas	MeOH	4, 23	<i>A. muricata</i>	Chang et al., 2003
Purpurediolina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	CHCl ₃ :MeOH (1:1)	15,24,28,29	<i>A. purpurea</i>	Chávez & Mata, 1998
Purpurenina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	CHCl ₃ :MeOH (1:1)	10,15,24,29	<i>A. purpurea</i>	Chávez & Mata, 1998
Annoglaucina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	CHCl ₃ :MeOH (1:1)	4,10,15,24	<i>A. purpurea</i>	Chávez & Mata, 1998
Purpuracina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	CHCl ₃ :MeOH (1:1)	4,10,15,24	<i>A. purpurea</i>	Chávez & Mata, 1999
Salzmanolina	37	654	C ₃₇ H ₆₆ O ₉	Raiz	MeOH	15,17,24,28,29	<i>A. salzmanii</i>	Queiroz et al., 2002
Salzmanina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Raiz	MeOH	12,15,24,28	<i>A. salzmanii</i>	Queiroz et al., 1999
Carolina A	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	MeOH	15,24,28	<i>A. spinescens</i>	Queiroz et al., 1998
Carolina B	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	MeOH	15,24,29	<i>A. spinescens</i>	Queiroz et al., 1998
Carolina C	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Sementes	MeOH	13,22,26	<i>A. spinescens</i>	Queiroz et al., 1998
Espinencina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	MeOH	15,24,28,29	<i>A. spinescens</i>	Queiroz et al., 1998
2,4-cis- e trans-esquamolinona	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Casca	EtOH	15,24	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998a
2,4-cis e trans-9-oxo-asimicinona	37	636	C ₃₇ H ₆₄ O ₈	Casca	EtOH	15,24	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998a
Bullacina B	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Casca	EtOH	6,15,24	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1998a
Annoesquacina A	35	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	Sementes	CHCl ₃	11,20	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
Annoesquacina B	37	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	Sementes	CHCl ₃	11,22	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
Annoesquacina C	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	CHCl ₃	11,22,25	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
Annoesquacina D	37	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	Sementes	CHCl ₃	13,20	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a

Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero *Annona* (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	Número total de carbonos	Massa molecular	Fórmula molecular	Parte da planta	Extração	Posição da OH	Espécie	Referência
2,4-cis- e trans-9-hidroxi asimicinona	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	9,15,24	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1999
Rollidecina A	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Folhas	EtOH:CH ₂ Cl ₂	4,20,23,24	<i>A. squamosa</i>	Shi et al., 1996a
Rollidecina B	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Folhas	EtOH:CH ₂ Cl ₂	4,20,23,24	<i>A. squamosa</i>	Shi et al., 1996a
Annoesquacina I	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	EtOH	10, 19, 23	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Uvarigrandina A	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	EtOH	5,15,24	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Esquamotacina	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Casca do caule	EtOH	4, 13, 22	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1996
Molvizarina	35	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Casca do caule	EtOH	4,13,22	<i>A. squamosa</i>	Hopp et al., 1996
Esquamocina-O₁	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	MeOH	12,15,24,28	<i>A. squamosa</i>	Araya et al., 2002
Esquamocina-O₂	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	MeOH	12,15,24,28	<i>A. squamosa</i>	Araya et al., 2002
Rollidecina C	35	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	Folhas	EtOH	4,20	<i>A. reticulata</i>	Gu et al., 1997
Rollidecina D	37	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	Folhas	EtOH	4,22	<i>A. reticulata</i>	Gu et al., 1997
Mucoxina	37	622	C ₃₇ H ₆₇ O ₇	Folhas	EtOH	8,14,17	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1996b
Membranacina	37	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	Sementes	CHCl ₃ :MeOH (1:1)	15,24	<i>A. reticulata</i>	Chávez et al., 1999
Rollitacina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Folhas	EtOH	15,24,28,29	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1997
Rollinacina	37	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Folhas	EtOH	4,10,20	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1997
Rolliniastatina 2	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Folhas	MeOH	4, 15, 24	<i>A. reticulata</i>	Chang et al., 1993
Motrilina	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	Éter de petróleo	15, 24, 29	<i>A. cherimolia</i>	Tormo et al., 2005
ACETOGENINAS BIS-THF NÃO ADJACENTES								
12,15-cis-esquamostatina-D	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	AcOEt	16, 19, 24	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
Esquamostatina D	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	AcOEt	16, 19, 24	<i>A. atemoya</i>	Chang et al., 1999
Bullatanocina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	4, 16, 19, 24	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
				Sementes	Éter de petróleo		<i>A. crassiflora</i>	Santos et al., 1994
cis- bullatanocinona	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	16, 19, 24	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
trans- bullatanocinona	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	16, 19, 24	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a
Bullatalicina	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	4, 16, 19, 24	<i>A. bullata</i>	Gu et al., 1993a

Tabela 4. Acetogeninas bioativas isoladas de diferentes espécies do gênero *Annona* (1989-2015). (Cont.)

ACETOGENINA	Número total de carbonos	Massa molecular	Fórmula molecular	Parte da planta	Extração	Posição da OH	Espécie	Referência
Bullatalicinona	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Casca	EtOH	16, 19, 24	<i>A. bullata</i>	Hui et al., 1991
Otivarina	37	640	C ₃₇ H ₆₈ O ₈	Sementes	Éter de petróleo	16, 19, 24, 35	<i>A. cherimolia</i>	Cortes et al., 1991
Annoesquatina A	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	CHCl ₃	13, 16, 21	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
Annoesquatina B	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	CHCl ₃	13, 16, 21, 29	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2012a
Annoesquatina-I	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	EtOH	21, 24, 29, 30	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Annoesquatina-II	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	EtOH	5, 21, 24, 29	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Esquamostatina A	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	EtOH	16,19,24,28	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Esquamostatina D	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	EtOH	16,19,24	<i>A. squamosa</i>	Chen et al., 2011
Cherimolina-1	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Raizes	MeOH	4, 16, 19, 24	<i>A. cherimolia</i>	Duret et al., 1994
Isocherimolina-1	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Raizes	MeOH	16, 19, 24	<i>A. cherimolia</i>	Duret et al., 1994
12,15-cis esquamostatina A	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	EtOH	16,19,24,28	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
Esquamostanina B	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	EtOH	15,18,23,27	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
Esquamostanina A	37	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Sementes	EtOH	15,18,23,27	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
Esquamostatina E	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	EtOH	16,19,24	<i>A. squamosa</i>	Yuan et al., 2015
ACETOGENINAS NÃO CLÁSSICAS								
Jimenezina	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	CHCl ₃ :MeOH (1:1)	4,15,23	<i>A. reticulata</i>	Chávez et al., 1998
Muconina	37	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Folhas	EtOH	4,12,22	<i>A. reticulata</i>	Shi et al., 1996b
ACETOGENINAS NÃO THF OU THP								
Epomuricenina A e B	35	530	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	Sementes	MeOH	15,16/ 13,14	<i>A. muricata</i>	Roblot et al., 1993
Diepomuricanina	35	546	C ₃₅ H ₆₂ O ₄	Sementes	MeOH	15,16,19,20	<i>A. muricata</i>	Roblot et al., 1993

Solventes utilizados no preparo dos extratos: EtOH (etanol), MeOH (metanol), AcOEt (acetato de etila), CH₂Cl₂ (diclorometano) e CHCl₃(clorofórmio)

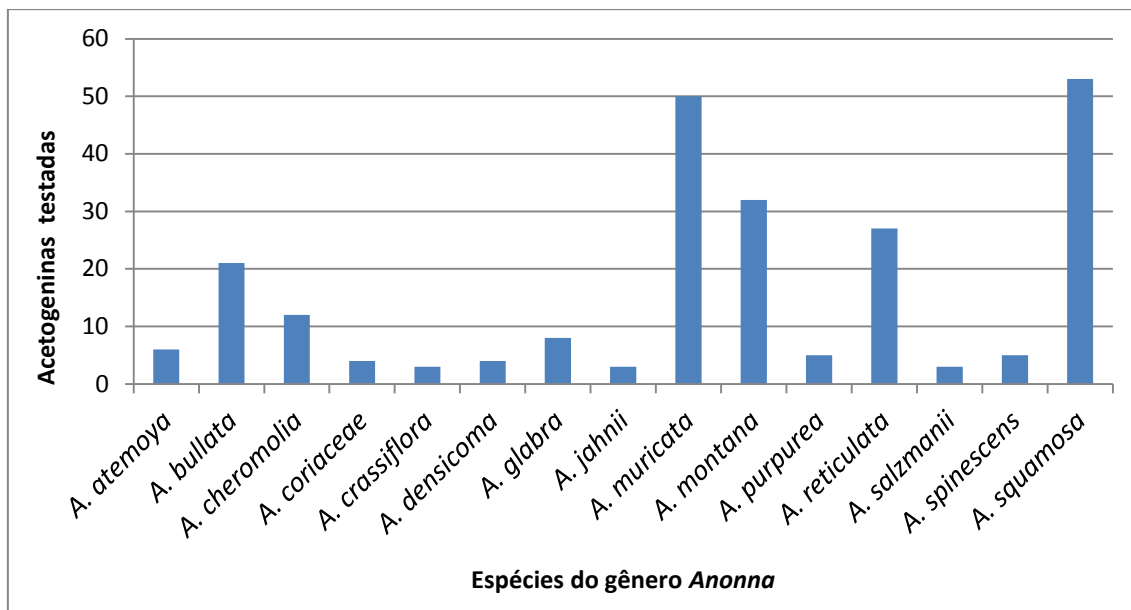


Figura 7. Distribuição das acetogeninas citotóxicas nas espécies do gênero *Annona*.

Como pode ser visto na **Figura 8**, pode-se observar que as ACGs estão presentes em várias partes da planta das espécies do gênero *Annona*. Porém, é notável que a maior parte das ACGs isoladas e testadas quanto a citotoxicidade foi encontrada nas sementes, seguidas das folhas.

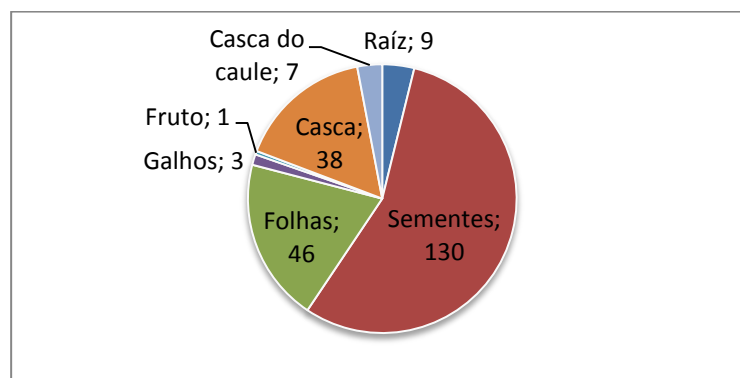


Figura 8. Partes da planta usadas na investigação fitoquímica das espécies do gênero *Annona*.

Diante do exposto, além de estabelecerem a importância citotóxica das ACGs, outros estudos focaram em elucidar o seu modo de ação. Londershausen e colaboradores (1991) presumiram que o mecanismo de ação

citotóxica das ACGs consistia, principalmente, pela forte capacidade inibitória do transporte de elétrons na mitocôndria com específica ação no complexo I (ZAFRA-POLO et al.,1998). Esta atividade foi confirmada por outros grupos de pesquisa (AHAMMADSAHIB et al., 1993; LEWIS et al., 1993; MIYOSHI et al., 1998; TAKADA et al., 2000). Depois, as ACGs foram consideradas como as substâncias mais potentes entre os diversos inibidores existentes do complexo I (BERMEJO et al., 2005).

O transporte de elétrons ao longo da cadeia mitocondrial segue uma ordem de complexos que vai do I ao IV (LEHNINGER et al., 1995). O complexo I, que é o sítio de ação das ACGs, envolve a transferência de elétrons do NADH até a ubiquinona (ZAFRA-POLO et al.,1998). Este complexo, também chamado de NADH: ubiquinona oxidoreductase, é o passo limitante na produção de energia pelas mitocôndrias. Esta enzima é a via principal para a produção de energia na célula, logo sua inibição interfere na produção de ATP, podendo induzir a morte celular programada, apoptose (ZENG et al.,1996).

Também, foi constatado que as ACGs são poderosas inibidoras das NADH oxidases na membrana plasmática das células cancerosas. Essa enzima permite que a célula tumoral produza ATP em condições anaeróbicas por restaurar os níveis de NAD, permitir a glicólise e a continuação da fosforilação ao nível de substrato (LONDERSHAUSEN et al., 1991). Em ambos os mecanismos, a ação das ACGs resulta na inibição da produção de ATP (OBERLIES et al., 1995). Isso, vinculado ao fato da alta demanda de ATP pelas células tumorais poderia explicar a sensibilidade das linhagens de células neoplásicas aos inibidores do complexo I (JEWESS, 1994).

Portanto, as ACGs são substâncias promissoras para se tornarem uma nova geração de fármacos anti-tumorais. No entanto, seu mecanismo de citotoxicidade seletiva e os fatores que modulam a eficácia contra as células cancerosas ainda não são bem conhecidos (BERMEJO et al., 2005).

3.4 O câncer

Câncer, neoplasia ou tumor maligno são sinônimos usados para denominar um conjunto de doenças caracterizado pelo crescimento

descontrolado de células que atinge milhares de indivíduos a cada ano. (ROBBINS, 2005).

Organização Mundial de Saúde (OMS) relacionou cerca de 100 fatores físicos, químicos e biológicos como carcinogênicos. Entre os fatores físicos, a exposição à radiação ultravioleta está associada, por exemplo, ao desenvolvimento de câncer de pele (MASSARI et al., 2007). Hidrocarbonetos aromáticos e tabaco representam importantes fatores químicos de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão (VEGLIA et al., 2007). Além dos fatores ambientais citados acima, que são responsáveis por 95% dos carcinomas, fatores genéticos estão associados a 5% dos cânceres em humanos (SONNENSCHNEIN & SOTO, 2008).

A origem da célula cancerosa é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, os chamados carcinógenos (SIEBER et al., 2003).

O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplos passos envolvendo mutação e seleção de células com capacidade progressivamente aumentada para proliferação, sobrevivência, invasão e metástase (COOPER, 2001; DEVLIN, 2007; RANG et al., 2004). Uma vez que adquirem essa habilidade, as células cancerígenas atingem a circulação linfática e sanguínea e se estabelecem em tecidos distintos daquele de origem, dando início a novos tumores (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

As alterações genéticas presentes em neoplasias resultam em diferentes graus de alteração fenotípica. Como exemplo, pode haver aumento da expressão de receptores para fatores de crescimento, favorecendo a proliferação celular (ADRIAENSSENS et al., 2008; DAWOOD et al., 2008). Outra alteração fenotípica importante em células tumorais é a redução da apoptose e o desenvolvimento de mecanismos que tornam possíveis a sobrevivência e a proliferação de células com DNA danificado (WENDT et al., 2006; TOILLON et al., 2007). Outras características também são de grande relevância, como: angiogênese sustentada, evasão do sistema imune; uma elevada resposta de danos no DNA causada por elevadas taxas de replicação

e defeitos no mecanismo de reparo do DNA; estresse proteotóxico - um aumento na quantidade de tóxicos desnovele proteínas nas células; estresse mitótico / instabilidade cromossômica; estresse metabólico - o aumento da utilização de glicólise, em vez de fosforilação oxidativa, como meio de produção de ATP; e estresse oxidativo - um aumento no nível de espécies reativas de oxigênio em células tumorais (LUO et al., 2009).

Em termos epidemiológicos, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até 2030 sejam previstos 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, convivendo com esta doença. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixas e médias rendas (WHO, 2012).

Seguindo tendência mundial, no Brasil, as estimativas para o biênio 2016-2017 apontam a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), figurarão entre os principais (INCA, 2016).

3.4.1 Morte celular e câncer

Uma das primeiras classificações para diferenciar os tipos de morte celular foi proposta por Schweichel e Merker, que separou em três classes nomeadas como: apoptose, autofagia e necrose (SCHWEICHEL & MERKER, 1973). Estes eventos de morte celular são os mecanismos melhor compreendidos. De modo geral, a necrose é considerada como um tipo de morte celular não fisiológica e durante este processo o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004). A autofagia é um processo catabólico de degradação e reciclagem de componentes celulares (LEVINE & YUAN, 2005).

Já a apoptose é um mecanismo de morte celular programada central para vários processos biológicos (HANNUN, 1997).

Porém, com o aparecimento de métodos bioquímicos que possibilitaram quantificar a expressão, atividade e localização celular de proteínas envolvidas nos processos de morte celular, pode-se distinguir fenômenos até então similares, quando levado em conta apenas os aspectos morfológicos. Assim, novas nomenclaturas para os eventos de morte celular surgiram, a exemplos: entosis, piroptose, necroptose e cornificação. Mas pouca informação está disponível até o momento sobre estes eventos e, apesar de muitos esforços na área, ainda alguns autores divergem quanto a esta classificação (GALLUZZI et al., 2012).

Frente a todos esses conhecimentos, a morte celular é uma resposta fundamental na formação do organismo vivo durante o desenvolvimento e na regulação da homeostase do tecido através da eliminação de células não desejadas. Além disso, a regulação da morte celular desempenha um papel importante no crescimento e progressão do câncer, e defeitos nas vias de morte celular são a marca registrada da doença (OKADA & MAK, 2004).

O desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer é embasado na indução da morte nas células tumorais e em uma maior resposta aos tratamentos com radiação e agentes citotóxicos. Além disso, a apoptose na prática clínica vem sendo considerada alvo para um potencial uso terapêutico (GRIVICICH, 2007).

3.4.1.1 Apoptose

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental (LOCKSHIN & WILLIAMS, 1964). Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar este fenômeno (KERR et al., 1972).

Sendo um processo altamente seletivo, a apoptose é importante tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas, ocorrendo nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na

atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (WONG, 2011; RANGANATH & NAGASHREE, 2001).

Diariamente, mais de 30 milhões de células somáticas sofrem morte celular e são repostas em um organismo saudável, e a apoptose é responsável por aproximadamente 90% destas mortes, eliminando células velhas, com funcionalidade diminuída ou com algum dano potencialmente prejudicial à homeostase do organismo, entre as quais estão as células iniciadoras de tumores (ELMORE, 2007).

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral, é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta durante todo o processo. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear, que são acompanhados por arredondamento da célula, redução do volume celular (picnose) e retração de pseudópodes. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório. As células fagocíticas normalmente engolfam as células apoptóticas antes da ocorrência de corpos apoptóticos, mas em situações especiais, tais como em cultivo *in vitro* de células, as células em apoptose são submetidas à degradação que se assemelha a necrose, condição denominada necrose secundária (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

Além de alterações morfológicas, a apoptose apresenta algumas alterações bioquímicas como a externalização de fosfatidilserina, que permite o reconhecimento por fagócitos sem a liberação de componentes pró-inflamatórios, clivagem do DNA realizado por endonucleases promovendo a

fragmentação do DNA, e ativação das caspases. As caspases ativadas clivam muitas proteínas vitais e acabam com a integridade do núcleo e do citoesqueleto (HENGARTNER, 2000; MC CARTHY & EVAN, 1998).

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (GRIVICICH et al., 2007).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes de morte específicos a um receptor de morte do grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Embora vários receptores de morte tenham sido descritos, os mais conhecidos desta família são os receptores de fatores de necrose tumoral tipo 1 (rTNF1) e a proteína Fas (CD95) e os seus ligantes são chamados de TNF e Fas ligante (FasL), respectivamente (HENGARTNER, 2000).

Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular" (NAISMITH & SPRANG, 1998). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/ MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (DANIEL et al., 2001).

A via intrínseca (ou mitocondrial) da apoptose é ativada quando a célula sinaliza algum dano ao DNA e estresses celulares como hipóxia, concentrações elevadas de cálcio citosólico, radiação, drogas quimioterapêuticas (ADAMS & CORY, 1998). Esta via é modulada por uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que

participam ativamente da regulação da apoptose, a família Bcl-2 (domínio BH3) (BORNER, 2003).

A família Bcl-2 é dividida em dois grupos de proteínas, as anti-apoptóticas (tendo como principais componentes Bcl-2- o primeiro membro descrito e que deu origem ao nome da família de proteínas, além de Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1) e as pró-apoptóticas (por exemplo, Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Bcl-2L1, Bcl-2L2, Bcl-2L3, Bcl-2L4, Bcl-2L5, Bcl-2L6, Bcl-2L7, Bcl-2L8, Bcl-2L9, Bcl-2L10, Bcl-2L11, Bcl-2L12, Bcl-2L13, Bcl-2L14, Bcl-2L15, Bcl-2L16, Bcl-2L17, Bcl-2L18, Bcl-2L19, Bcl-2L20, Bcl-2L21, Bcl-2L22, Bcl-2L23, Bcl-2L24, Bcl-2L25, Bcl-2L26, Bcl-2L27, Bcl-2L28, Bcl-2L29, Bcl-2L30, Bcl-2L31, Bcl-2L32, Bcl-2L33, Bcl-2L34, Bcl-2L35, Bcl-2L36, Bcl-2L37, Bcl-2L38, Bcl-2L39, Bcl-2L40, Bcl-2L41, Bcl-2L42, Bcl-2L43, Bcl-2L44, Bcl-2L45, Bcl-2L46, Bcl-2L47, Bcl-2L48, Bcl-2L49, Bcl-2L50, Bcl-2L51, Bcl-2L52, Bcl-2L53, Bcl-2L54, Bcl-2L55, Bcl-2L56, Bcl-2L57, Bcl-2L58, Bcl-2L59, Bcl-2L60, Bcl-2L61, Bcl-2L62, Bcl-2L63, Bcl-2L64, Bcl-2L65, Bcl-2L66, Bcl-2L67, Bcl-2L68, Bcl-2L69, Bcl-2L70, Bcl-2L71, Bcl-2L72, Bcl-2L73, Bcl-2L74, Bcl-2L75, Bcl-2L76, Bcl-2L77, Bcl-2L78, Bcl-2L79, Bcl-2L80, Bcl-2L81, Bcl-2L82, Bcl-2L83, Bcl-2L84, Bcl-2L85, Bcl-2L86, Bcl-2L87, Bcl-2L88, Bcl-2L89, Bcl-2L90, Bcl-2L91, Bcl-2L92, Bcl-2L93, Bcl-2L94, Bcl-2L95, Bcl-2L96, Bcl-2L97, Bcl-2L98, Bcl-2L99, Bcl-2L100). Todas as proteínas têm como principal função modular a permeabilidade da membrana mitocondrial: os membros anti-apoptóticos interagem com os membros pró-apoptóticos, impedindo que formem complexos na superfície da mitocôndria e, assim, a liberação de moléculas mitocondriais (CORY & ADAMS, 2002). Embora as proteínas anti-apoptóticas regulem a apoptose através do bloqueio da liberação de citocromo *c* mitocondrial, as proteínas pró-apoptóticas atuam através da promoção desta liberação (REED, 1997).

A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas (PETROS et al., 2004). Isto é desfeito quando um sinal de ativação da via intrínseca é disparado na célula, e há a dissociação destas interações e ocorre um desequilíbrio entre as proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas (ELMORE, 2007).

Uma vez que ocorre o desbalanço entre as proteínas anti e pró-apoptóticas, as pró-apoptóticas levam a formação de poros (cujo principais componentes são as proteínas Bax e Bak) na membrana da mitocôndria (ELMORE, 2007). Também, quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna, bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM) (LOEFFLER & KREMER, 2000). Conseqüentemente, ocorre a liberação de moléculas para o citoplasma da célula, entre as quais a mais conhecida é o citocromo *c*. Quando no citosol, o citocromo *c* ativa a proteína citosólica Apaf-1, formando um complexo chamado de apoptossomo, que cliva e ativa a caspase-9, que por sua vez ativa as caspases 3, 6 e 7, executoras do processo apoptótico (ELMORE, 2007; RIEDL & SHI, 2004).

Juntamente com citocromo *c*, as proteínas SMAC/DIABLO e Omi/ HtrA2 localizadas nas mitocôndrias também são liberadas no citoplasma. Quando liberadas, essas duas proteínas se ligam a uma proteína inibidora de caspases conhecida como XIAP, essa ligação ajuda a ativar os mecanismos de apoptose por neutralizar a função inibitória dessa proteína (FISCHER & SCHULZE-OSTHOFF, 2005).

A apoptose na prática clínica é um alvo para um potencial uso terapêutico ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia, pois defeitos ou anormalidades ao longo das vias apoptóticas é considerado interessante para tratamento do câncer. Diversos fármacos com diferentes mecanismos de ação induzem morte celular por apoptose. Com o desenvolvimento de compostos promissores, particularmente se tratando dos derivados de produtos naturais, a busca por novos protótipos se intensifica. Além disso, vários estudos clínicos e pré-clínicos com fármacos que têm por alvo membros da família Bcl-2 estão em andamento. A redução na atividade da Bcl-2 e Bcl-XL é suficiente para induzir a célula a entrar em apoptose (KIM et al., 2006).

3.4.2 Acetogeninas como indutoras de apoptose

Pelo fato das ACGs serem conhecidas pelo poder citotóxico em linhagens celulares tumorais em virtude da sua inibição no complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, o despertado interesse foi de investigar o mecanismo de ação das ACGs sobre os processos envolvidos na morte de células tumorais (LIAW et al., 2010). E assim, depois que a ligação entre a cadeia respiratória mitocondrial e a morte celular por apoptose foi esclarecida, muitas pesquisas se direcionaram a isso (WOLVETANG et al., 1994).

Um estudo realizado por Chih e colaboradores (2001) demonstrou pela primeira vez a indução de apoptose em células tumorais pelas acetogeninas. Esse estudo comprovou que a bullatacina (**15**) (**Figura 9, p. 72**) induz a morte celular por apoptose na linhagem Hep 2.2.15 (hepatocarcinoma), conforme determinado pela dupla marcação de anexina V e iodeto de propídeo.

A fim de apurar este processo de morte celular induzido pelas ACGs, Yuan e colaboradores (2003) ao testarem a annonacina (**16**) (**Figura 9**) em células de câncer de bexiga (T24) constataram a presença de Bax e caspase-3 e que as células paralisam na fase G1 do ciclo celular. Além disso, a esquamocina (**17**) (**Figura 9**) inibiu a proliferação células de leucemia mieloide crônica paralisando as células em G2/M (LU et al., 2006). Na linhagem leucêmica HL-60 tratadas com esquamocina (**17**), foi observado ativação de caspase-3 (ZHU et al., 2002). Esses são alguns exemplos de trabalhos que associam as ACGs com apoptose, fazendo com o que os membros desta classe de compostos naturais sejam considerados objetos de futuras gerações de fármacos anticâncer (LIAW et al., 2010).

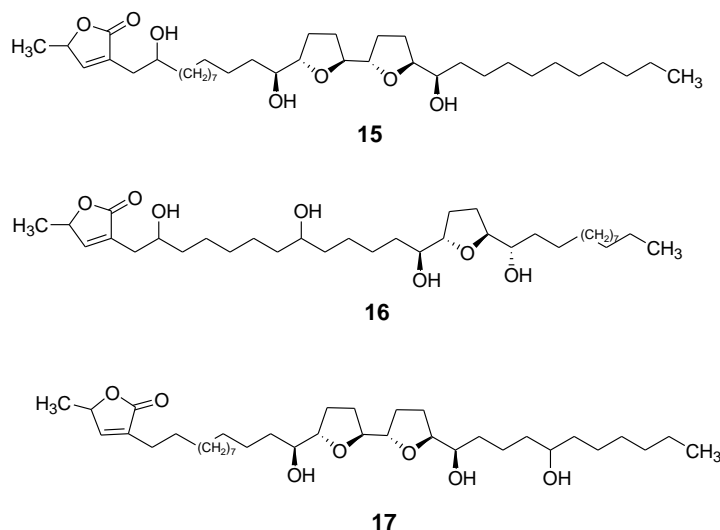


Figura 9. Acetogeninas indutoras de apoptose.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais usados no estudo fitoquímico

4.1.1.1 Material botânico

- Raízes de *Annona dioica*: os exemplares da espécie *A. dioica* foram coletados no cerrado de Horqueta-Concepción (Paraguai) em abril de 2003. A classificação botânica da espécie foi realizada pelas professoras Rosa Degen e Nélida Sória do departamento de botânica da Universidad Nacional de Asunción (UNA) e exsicata da planta se encontra depositada no Herbário UENF (HUENF) sob o número de registro 8567.
- Folhas de *Annona acutiflora*: os exemplares da espécie *A. acutiflora* foram coletados na Reserva de Pacotuba-Cachoeiro de Itapemirim – ES (Brasil) em junho de 2012. A classificação botânica da espécie foi realizada por Adriana Lobão e exsicata da planta se encontra depositada no Herbário UENF (HUENF) sob o número de registro H9482.
- Folhas de *Annona dolabripetala*: os exemplares da espécie *Annona dolabripetala* foram coletados na Reserva de Pacotuba- Cachoeiro de Itapemirim – ES (Brasil) junho de 2012. A classificação botânica da espécie foi realizada por Adriana Lobão e exsicata da planta se encontra depositada no Herbário UENF (HUENF) sob o número de registro H9480.

4.1.1.2 Equipamentos e Materiais

- Evaporador rotativo Büchi Waterbath B-480.
- Espectrofotômetro Infravermelho, CARY 630 FTIR, Agilent Technologies.
- Espectrômetros Ressonância Magnética Nuclear BRUKER, modelo DPX-500 (^1H -300 MHz e ^{13}C -500 MHz), utilizando como padrão CHCl_3 (δ_{H} 7.26)
- Espectrômetro de massas ESI-MS, aparelho ESQUIRE 3000 PLUS- Bruker.
- Sílica gel 60 (0,200-0,063 mm) e sílica gel 60 (0,040-0,063 mm)- Merck.

- Cromatofolha de sílica gel 60 F₂₅₄ (20X20 cm) – Merck.
- Radiação ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 360 nm.
- Balança analítica (Shimadzu)

4.1.1.3 Solventes e Reagentes

- Hexano P.A. Labsynth e Scharlau
- Acetato de etila P.A.- Labsynth e Scharlau
- Diclorometano P.A. - Labsynth e Scharlau
- Clorofórmio P.A. - Labsynth e Scharlau
- Metanol P.A. - Labsynth e Scharlau
- Etanol P.A. - Labsynth e Scharlau
- Isopropanol P.A. - Labsynth e Scharlau
- Clorofórmio deuterado – Sigma Aldrich
- Ácido Sulfúrico - MERCK
- Anisaldeído- MERCK

4.1.1.4 Preparo dos Reagentes

- Solução reveladora de anisaldeído: foram adicionados aos 6,25 mL de anisaldeído, 12,5 mL de ácido acético, 106,25 mL de metanol e 6,26 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Solução reveladora de vanilina: 3,0 g de vanilina foram dissolvidos em uma solução contendo: 135 mL de água destilada, 135 mL de metanol e 30mL de ácido sulfúrico concentrado. A solução foi estocada em um frasco escuro.
- Reagente de Kedde: 5,6 g de hidróxido de potássio foram diluídos em água destilada para 50 mL de solução. A outra solução é preparada com 1 g de ácido 3,5-dinitrobenzóico diluídos em 50 mL de metanol.
- Reagente de Mayer: 5 g de iodeto de potássio foram diluídos em 50 mL de água destilada. A esta solução foram adicionados 12 g de iodeto de mercúrio e completou-se com água destilada para um volume de 100 mL.

4.1.2 Materiais usados no estudo biológico

4.1.2.1 Equipamentos e Materiais

- Estufa para cultura celular – Forma Scientific Inc., modelo 3159
- Fluxo laminar – Veco
- Garrafa de cultivo celular de 25 cm², 75 cm² e 150 cm²- TPP
- Centrifuga - IEC CENTRA-7R
- Centrifuga – FANEM Baby I Mod. 206
- Tubo falcon de 20 mL e 50 mL - TPP
- Pipetas - Lapmater soft
- Ponteiras - Axygen
- Espectrofotometro - Epoch™, BioTek® Instruments, Inc
- Citômetro de fluxo - FACS Calibur
- Transiluminador UV - Bio-Rad, Gel Doc™ XR +
- Placas de cultura 96 poços, 24 poços e 6 poços- TPP
- Criotubos -Corning
- Microscópio- Axionplan – Carl Zeiss
- Vacutainer de heparina - BD
- Agulha – BD
- Vortex - Gehaka
- pHmetro – Biomixer
- Balança analítica (Shimadzu)
- Agitador magnético – IKA Ret basic
- Autoclave vertical - Primatec

4.1.2.2 Solventes, Reagentes e Kits de Reagentes

- Dimetilsulfóxido (DMSO)- SIGMA
- Isopropanol P.A. - Labsynth e Scharlau
- Ácido clorídrico P.A. - Labsynth
- Trypan Blue - SIGMA (T6146)
- Doxorrubicina- SIGMA
- GelRed – Biotium
- Meio de cultura DMEM/F-12 – Gibco (BRL)

- Enterotoxina B de *Staphilococcus* (SEB) -Sigma (S0812).
- Gentamicina – Gibco
- RNase A – SIGMA
- Iodeto de propídio - SIGMA
- Soro fetal bovino – Gibco
- AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit - SIGMA-ALDRICH
- Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro- 1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) – SIGMA
- Colorimeter Sampler Kit - Invitrogen

4.2 Métodos

4.2.1 Metodologia do estudo fitoquímico

4.2.1.1 Preparo e fracionamento do extrato bruto de *A. dioica*

As raízes de *A. dioica* foram secas ao ar livre, em ambiente sombreado, e pulverizadas em moinhos de martelo (760 g).

A extração dos constituintes químicos foi realizada por maceração a frio utilizando uma solução hidroalcolica (etanol:água; 9:1). As soluções obtidas foram concentradas a pressão reduzida em evaporador rotativo fornecendo o extrato bruto, codificado como ADR (8,62 g).

Partição do extrato hidroalcolico da raiz de *A. dioica*

O extrato bruto hidroalcolico da raiz foi submetido a um fracionamento colocando a amostra em pastilha com sílica gel 60 (0,200-0,063 mm) em um funil de Büchner, com sistema de filtração a vácuo, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade CHCl₃, AcOEt e MeOH e assim, dando origem as respectivas frações: ADR-C, ADR-A e ADR-M (**Figura 10, p. 77**).

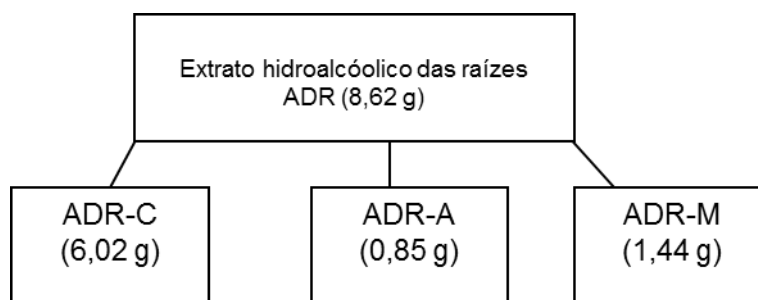


Figura 10. Frações resultantes do extrato hidroalcoólico das raízes de *A. dioica* (ADR).

De acordo com o perfil de cada uma destas frações observado através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) com o uso de reveladores como a vanilina sulfúrica, solução de anisaldeído, reagente de Kedde e luz ultravioleta (254 nm) e, sobretudo, em função da atividade citotóxica avaliada, o trabalho se focou na fração ADR-C. As frações não trabalhadas, resultantes das posteriores cromatografias em coluna, são justificadas por não apresentarem acetogeninas mediante a aplicação reagente específico Kedde ou pouca massa *versus* complexidade. O resumo da análise cromatográfica desta fração é apresentado na **Figura 11, p. 78**.

4.2.1.1.2.1 Análise da fração clorofórmica ADR-C (2,97 g)

Resumo dos constituintes isolados da fração em clorofórmio das raízes de *Annona dioica*

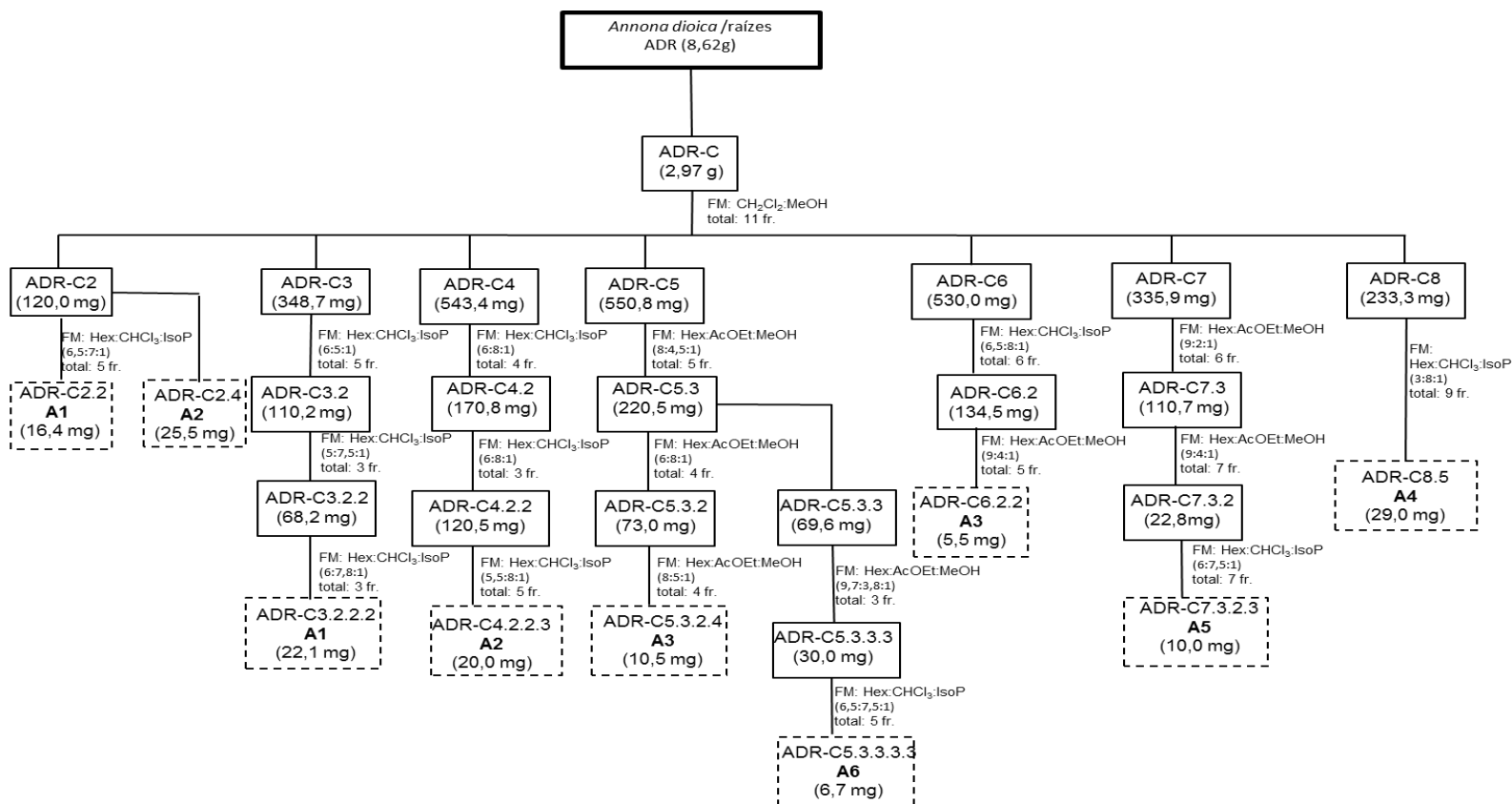


Figura 11. Resumo da análise cromatográfica da fração ADR-C.

Inicialmente uma parte (2,97 g) da fração ADR-C foi submetida a uma cromatografia em coluna a pressão normal empacotada com gel de sílica (0,200-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por uma mistura de diclorometano:metanol em gradiente crescente de polaridade até 100 % (v/v) de metanol. Desse fracionamento foram coletadas 48 frações, que posteriormente foram reunidas em 11 frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 5**.

Tabela 5. Estudo cromatográfico da fração ADR-C.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-24	ADR-C0	115,4	
25-26	ADR-C1	35,3	
27	ADR-C2	120,0	Trabalhada
28-29	ADR-C3	348,7	Trabalhada
30-31	ADR-C4	543,4	Trabalhada
32-37	ADR-C5	550,8	Trabalhada
38-39	ADR-C6	530,9	Trabalhada
40	ADR-C7	335,9	Trabalhada
41-42	ADR-C8	233,3	Trabalhada
43-44	ADR-C9	35,8	
45-48	ADR-C10	20,4	

Análise da fração ADR-C2 (120,0 mg)

A fração ADR-C2 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:clorofórmio:isopropanol (6,5:7:1), sendo coletadas 50 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Desse fracionamento foram isoladas a acetogenina **A1** na fração ADR-C2.2 e a acetogenina **A2** na fração ADR-C2.4. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 6, p. 80**.

Tabela 6. Estudo cromatográfico da fração ADR-C2.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-12	ADR-C2.1	20,3	
13-26	ADR-C2.2	16,4	A1
27-39	ADR-C2.3	35,7	
40-46	ADR-C2.4	25,5	A2
47-50	ADR-C2.5	14,7	

Análise da fração ADR-C3 (348,7 mg)

A fração ADR-C3 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:clorofórmio:isopropanol (6:5:1), sendo coletadas 67 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 7**.

Tabela 7. Estudo cromatográfico da fração ADR-C3.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-7	ADR-C3.1	27,5	
8-39	ADR-C3.2	110,2	Trabalhada
40-45	ADR-C3.3	30,6	
46-52	ADR-C3.4	40,2	
53-67	ADR-C3.5	126,0	

Análise da fração ADR-C3.2 (110,2 mg)

A fração ADR-C3.2 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema

hexano:clorofórmio:isopropanol (5:7,5:1), sendo coletadas 45 frações, que posteriormente foram reunidas em 3 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 8**.

Tabela 8. Estudo cromatográfico da fração ADR-C3.2.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-10	ADR-C3.2.1	12,4	
11-25	ADR-C3.2.2	68,2	Trabalhada
26-45	ADR-C3.2.3	22,1	

Análise da fração ADR-C3.2.2 (68,2 mg)

A fração ADR-C3.2.2 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:clorofórmio:isopropanol (6:7,8:1), sendo coletadas 33 frações, que posteriormente foram reunidas em 3 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolada a acetogenina **A1** na fração ADR-C3.2.2.2. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 9**.

Tabela 9. Estudo cromatográfico da fração ADR-C3.2.2.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-7	ADR-C3.2.2.1	10,0	
8-17	ADR-C3.2.2.2	22,1	A1
18-33	ADR-C3.2.2.3	30,4	

Análise da fração ADR-C4 (543,4 mg)

A fração ADR-C4 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi

constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:clorofórmio:isopropanol (6:8:1), sendo coletadas 54 frações, que posteriormente foram reunidas em 4 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 10**.

Tabela 10. Estudo cromatográfico da fração ADR-C4.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-12	ADR-C4.1	54,9	
13-18	ADR-C4.2	170,8	Trabalhada
19-32	ADR-C4.3	177,5	
33-54	ADR-C4.4	133,4	

Análise da fração ADR-C4.2 (170,8 mg)

A fração ADR-C4.2 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:clorofórmio:isopropanol (6:8:1), sendo coletadas 30 frações, que posteriormente foram reunidas em 3 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 11**.

Tabela 11. Estudo cromatográfico da fração ADR-C4.2.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-6	ADR-C4.2.1	22,6	
7-15	ADR-C4.2.2	120,5	Trabalhada
16-30	ADR-C4.2.3	20,5	

Análise da fração ADR-C4.2.2 (120,5 mg)

A fração ADR-C4.2.2 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:clorofórmio:isopropanol (5,5:8:1), sendo coletadas 67 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolada a acetogenina **A2** na fração ADR-C4.2.2.3. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 12**.

Tabela 12. Estudo cromatográfico da fração ADR-C4.2.2.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-15	ADR-C4.2.2.1	5,3	
16-22	ADR-C4.2.2.2	15,7	
23-35	ADR-C4.2.2.3	20,0	A2
36-46	ADR-C4.2.2.4	14,2	
47-67	ADRC4.2.2.5	50,7	

Análise da fração ADR-C5 (550,8 mg)

A fração ADR-C5 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:acetato de etila:metanol (8:4,5:1), sendo coletadas 60 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 13, p. 84**.

Tabela 13. Estudo cromatográfico da fração ADR-C5.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-15	ADR-C5.1	40,3	
16-24	ADR-C5.2	115,7	
25-38	ADR-C5.3	220,5	Trabalhada
39-49	ADR-C5.4	50,6	
50-60	ADR-C5.5	115,8	

Análise da fração ADR-C5.3 (220,5 mg)

A fração ADR-C5.3 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:acetato de etila:metanol (6:8:1), sendo coletadas 60 frações, que posteriormente foram reunidas em 4 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 14**.

Tabela 14. Estudo cromatográfico da fração ADR-C5.3.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-15	ADR-C5.3.1	15,6	
16-24	ADR-C5.3.2	73,0	Trabalhada
25-38	ADR-C5.3.3	69,6	Trabalhada
39-60	ADR-C5.3.4	54,3	

Análise da fração ADR-C5.3.2 (73,0 mg)

A fração ADR-C5.3.2 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:acetato de etila:metanol (8:5:1), sendo coletadas 46 frações, que posteriormente foram reunidas em 4 novas frações, através de comparação por

cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolada a acetogenina **A3** na fração ADR-C5.3.2.4. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 15**.

Tabela 15. Estudo cromatográfico da fração ADR-C5.3.2.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-15	ADRC5.3.2.1	16,1	
16-23	ADRC5.3.2.2	20,0	
24-34	ADRC5.3.2.3	9,3	
35-46	ADRC5.3.2.4	10,5	A3

Análise da fração ADR-C5.3.3 (69,6 mg)

A fração ADR-C5.3.3 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:acetato de etila:metanol (9,7:3,8:1), sendo coletadas 44 frações, que posteriormente foram reunidas em 3 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 16**.

Tabela 16. Estudo cromatográfico da fração ADR-C5.3.3.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-17	ADR-C5.3.3.1	13,6	
18-29	ADR-C5.3.3.2	23,0	
30-44	ADR-C5.3.3.3	30,0	Trabalhada

Análise da fração ADR-C5.3.3.3 (30,0 mg)

A fração ADR-C5.3.3.3 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:clorofórmio:isopropanol (6,5:7,5:1), sendo coletadas 48 frações, que

posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolada a acetogenina **A6** na fração ADR-C5.3.3.3.3. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 17**.

Tabela 17. Estudo cromatográfico da fração ADR-C5.3.3.3.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-7	ADR-C5.3.3.3.1	3,0	
8-12	ADR-C5.3.3.3.2	10,5	
13-20	ADR-C5.3.3.3.3	6,7	A6
21-26	ADR-C5.3.3.3.4	3,0	
27-48	ADR-C5.3.3.3.5	2,0	

Análise da fração ADR-C6 (530,0 mg)

A fração ADR-C6 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:clorofórmio:isorpopanol (6,5:8:1), sendo coletadas 77 frações, que posteriormente foram reunidas em 6 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 18**.

Tabela 18. Estudo cromatográfico da fração ADR-C6.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-12	ADR-C6.1	30,5	
13-17	ADR-C6.2	134,5	Trabalhada
18-30	ADR-C6.3	37,8	
31-44	ADR-C6.4	35,7	
45-54	ADR-C6.5	145,8	
55-77	ADR-C6.6	135,4	

Análise da fração ADR-C6.2 (134,5 mg)

A fração ADR-C6.2 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:acetato de etila:metanol (9:4:1), sendo coletadas 60 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolada a acetogenina **A3** na fração ADR-C6.2.2. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 19**.

Tabela 19. Estudo cromatográfico da fração ADR-C6.2.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-16	ADR-C6.2.1	10,3	
17-20	ADR-C6.2.2	5,5	A3
21-25	ADR-C6.2.3	15,3	
26-41	ADR-C6.2.4	43,5	
42-60	ADR-C6.2.5	41,2	

Análise da fração ADR-C7 (335,9 mg)

A fração ADR-C7 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:acetato de etila:metanol (9:2:1), sendo coletadas 100 frações, que posteriormente foram reunidas em 6 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 20, p. 88**.

Tabela 20. Estudo cromatográfico da fração ADR-C7.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-20	ADR-C7.1	43,2	
21-36	ADR-C7.2	30,5	
37-44	ADR-C7.3	110,7	Trabalhada
45-59	ADR-C7.4	38,5	
60-74	ADR-C7.5	95,8	
75-100	ADR-C7.6	10,2	

Análise da fração ADR-C7.3 (110,7 mg)

A fração ADR-C7.3 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:acetato de etila:metanol (9:4:1), sendo coletadas 63 frações, que posteriormente foram reunidas em 7 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 21**.

Tabela 21. Estudo cromatográfico da fração ADR-C7.3.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-9	ADR-C7.3.1	30,2	
10-13	ADR-C7.3.2	22,8	Trabalhada
14-17	ADR-C7.3.3	17,0	
18-23	ADR-C7.3.4	1,1	
24-35	ADR-C7.3.5	2,8	
36-50	ADR-C7.3.6	14,6	
51-63	ADR-C7.3.7	15,5	

Análise da fração ADR-C7.3.2 (22,8 mg)

A fração ADR-C7.3.2 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da

amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:clorofórmio:isopropanol (6:7,5:1), sendo coletadas 81 frações, que posteriormente foram reunidas em 7 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolada a acetogenina **A5** na fração ADR-C7.3.2.3. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 22**.

Tabela 22. Estudo cromatográfico da fração ADR-C7.3.2.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-11	ADR-C7.3.2.1	1,0	
12-13	ADR-C7.3.2.2	1,0	
14-23	ADR-C7.3.2.3	10,0	A5
24-34	ADR-C7.3.2.4	2,1	
35-43	ADR-C7.3.2.5	1,8	
44-60	ADR-C7.3.2.6	2,6	
61-81	ADR-C7.3.2.7	1,5	

Análise da fração ADR-C8 (233,3 mg)

A fração ADRC8 foi submetida a cromatografia em coluna a pressão normal utilizando gel de sílica (0,040-0,063 mm) como suporte para a fase estacionária. A fase móvel, selecionada conforme a polaridade da amostra, foi constituída por gradiente isocrático formado pelo sistema hexano:clorofórmio:isopropanol (3:8:1), sendo coletadas 114 frações, que posteriormente foram reunidas em 9 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolado a acetogenina **A4** na fração ADR-C8.5. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 23**.

Tabela 23. Estudo cromatográfico da fração ADR-C8.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observações
1-24	ADR-C8.1	21,7	
25-34	ADR-C8.2	26,6	
35-48	ADR-C8.3	40,3	

49-54	ADR-C8.4	28,3
55-65	ADR-C8.5	29,0
66-74	ADR-C8.6	30,0
75-109	ADR-C8.7	15,3
110-113	ADR-C8.8	10,0
114	ADR-C8.9	8,0

A4

4.2.1.1.3 Extração com solução aquosa ácida da fração clorofórmica da raiz de *A. dioica*

Uma parte da fração clorofórmica da raiz de *A. dioica* foi submetida a uma extração aquosa-ácida, a fim de verificar a presença de alcaloides. A

Figura 12, detalha este procedimento.

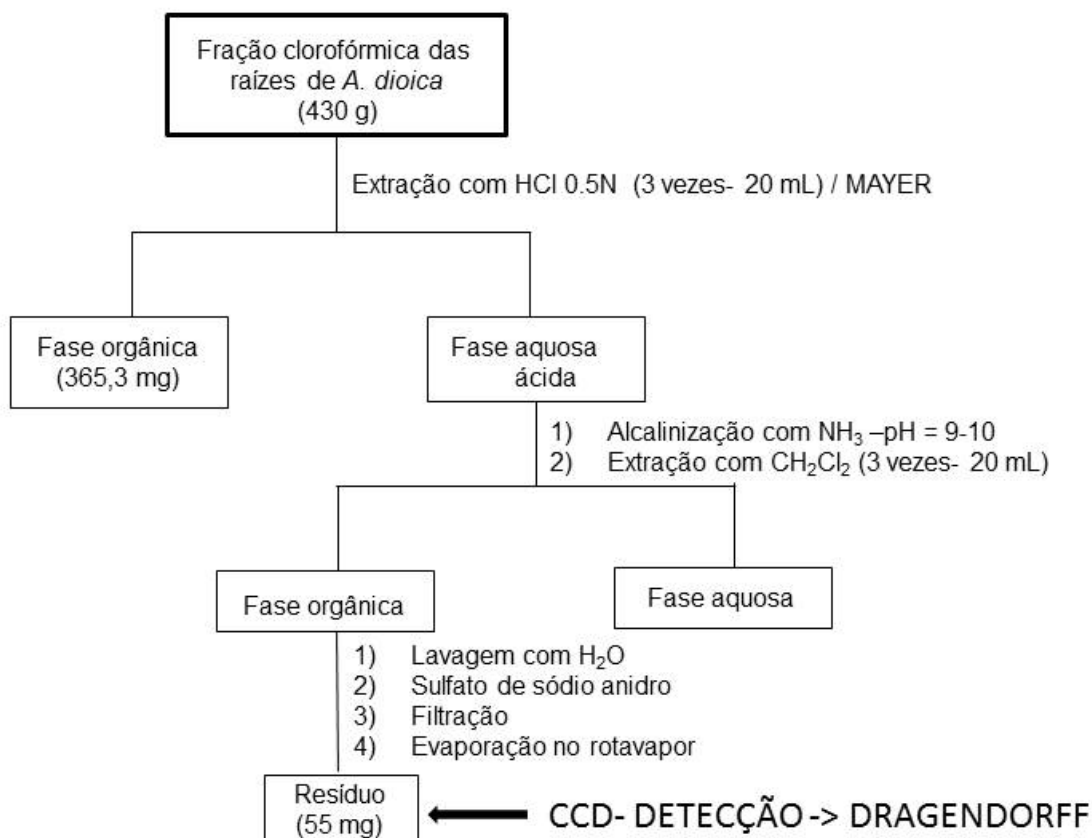


Figura 12. Extração de alcaloides com solução aquosa-ácida.

4.2.1.2 Preparo e fracionamento do extrato bruto de *A. acutiflora*

As folhas de *A. acutiflora* foram secas ao ar livre, em ambiente sombreado, e pulverizadas em moinhos de martelo (540,4 g).

A extração dos constituintes químicos foi realizada por maceração a frio utilizando uma solução hidroalcolica (etanol:água; 9:1). As soluções obtidas foram concentradas a pressão reduzida em evaporador rotativo fornecendo o extrato bruto que foi codificado como AAF (9,62 g).

Partição do extrato hidroalcolico das folhas de *A. acutiflora*

O extrato hidroalcolico das folhas foi submetido a uma partição líquido-líquido com clorofórmio: água (1:1), originando a fração AAF-C. Com uma parte da porção orgânica (AAF-C), foi realizada outra partição líquido-líquido com metanol/água (90%):hexano (1:1) dando origem as respectivas frações: AAF-H e AAF-M (**Figura 13**).



Figura 13. Frações resultantes do extrato hidroalcolico das folhas de *A. acutiflora* (AAF).

4.2.1.3 Preparo e fracionamento do extrato bruto de *A. dolabripetala*

As folhas de *A. dolabripetala* foram secas ao ar livre, em ambiente sombreado, e pulverizadas em moinhos de martelo (430,0 g).

A extração dos constituintes químicos foi realizada por maceração a frio utilizando uma solução hidroalcolica (etanol:água; 9:1). As soluções obtidas foram concentradas a pressão reduzida em evaporador rotativo fornecendo o extrato bruto que foi codificado como ADF (7,40 g).

Partição do extrato hidroalcolico das folhas de *A. dolabripetala*

O extrato hidroalcolico das folhas (ADF) foi submetido a uma partição líquido-líquido com clorofórmio: água (1:1), originando a fração ADF-C. Com uma parte da porção orgânica (ADF-C), foi realizada outra partição líquido-líquido com metanol/água (90%):hexano (1:1) dando origem as respectivas frações ADF-H e ADF-M (**Figura 14**).

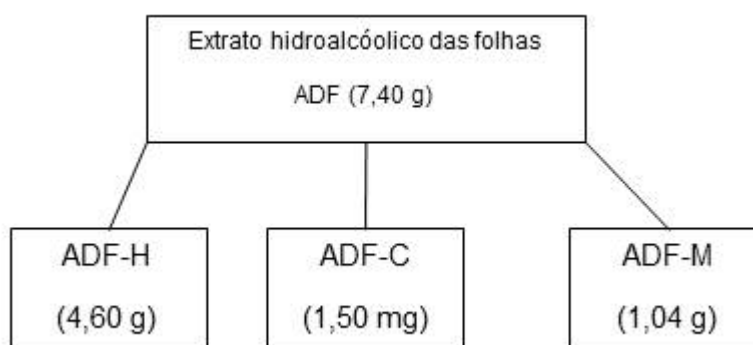


Figura 14. Frações resultantes do extrato hidroalcolico das folhas de *A. dolabripetala* (ADF).

4.2.1.4 Avaliação do grau de pureza das substâncias isoladas

O grau de pureza das substâncias isoladas foi avaliado através de cromatografia em camada delgada analítica e dados espectrais. As acetogeninas são de forma geral substâncias de aspecto líquido denso (oleosas) não permitindo a realização do ponto de fusão.

4.2.1.5 Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas

A identificação e elucidação estrutural se deram, principalmente, através

da espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C), somado às análises bidimensionais de correlação homonuclear de hidrogênio e hidrogênio (^1H - ^1H -COSY); heteronuclear de carbono-13 e hidrogênio (HSQC). Em complementação, foi usado o espectrofotômetro de massas ESI-MS foram utilizados.

4.2.2 Metodologia do estudo biológico

4.2.2.1 Amostras de estudo

- Frações obtidas das espécies *A. acutiflora* (hexânica, clorofórmica e metanólica), *A. dioica* (clorofórmica, acetato de etila e metanólica) e *A. dolabripetala* (hexânica, clorofórmica e metanólica).
- Substâncias isoladas da fração clorofórmica de *A. dioica*: motrilina, esquamocina, annonacina, isoannonacina, cherimolina-1 e isocherimolina-1.
- Substâncias gentilmente cedidas pela profa. Dra. Maria Raquel Garcia Vega isoladas da fração clorofórmica das raízes de *A. dioica*, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob a colaboração do Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho: paraguaína e paraguaína acetilada.

4.2.2.1.1 Diluição, concentrações de trabalho e armazenamento das frações e substâncias puras

Para a realização dos testes biológicos foram preparadas soluções *stock* das frações obtidas das espécies *A. acutiflora*, *A. dioica* e *A. dolabripetala* na concentração de 200 mg/mL ou 10 mg/50 μL empregando-se DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma) para solubilizar. As soluções *stock* das substâncias puras motrilina, esquamocina, annonacina, isoannonacina, cherimolina-1, isocherimolina-1, paraguaína e paraguaína acetilada foram preparadas na concentração de 0,1 mol/L empregando-se DMSO para solubilizar. As alíquotas dessas soluções *stock* foram armazenadas em freezer (Freezer Forma Scientific) à temperatura de -20°C até o momento de montagem dos experimentos. Para os distintos tratamentos, estas soluções, previamente

solubilizadas em DMSO, foram diluídas em meio de cultura celular DMEM/F-12 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 20 µg/mL de gentamicina (Gibco) até alcançar as concentrações necessárias específicas para cada experimento.

Durante à realização dos ensaios, foi avaliado um controle de células tratadas com DMSO diluído em meio de cultura na mesma proporção utilizada para dissolver as amostras. As concentrações de DMSO estavam abaixo de 0,2 % do volume, o que não implicou ser tóxico para células.

A solução *stock* da doxorrubicina (Sigma), controle positivo dos experimentos, foi preparada na concentração de 50 ng/mL empregando-se PBS estéril para solubilizar.

4.2.2.2 Cultura das linhagens de células de origem neoplásica

As linhagens celulares neoplásicas humanas, adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC), usadas para a triagem da bioatividade das amostras foram: U-937 (linfoma histiocítico), THP-1 (leucemia monocítica aguda), COLO 205 (adenocarcinoma de cólon), NCI-H460 (carcinoma de pulmão). Para elucidação do mecanismo de morte celular induzido pelas substâncias ativas, foi usada a linhagem celular U-937.

Todas as linhagens celulares foram criopreservadas a -196°C em nitrogênio líquido com soro fetal bovino e 10 % de DMSO em criotubos. Para o cultivo, as células foram submetidas a um processo rápido de descongelamento onde os criotubos foram imersos em banho-maria a 37 °C. Posteriormente, foram transferidas para garrafas de cultivo estéreis de 25 cm², utilizando o meio de cultivo celular DMEM/F-12 (Gibco) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco) e 10 % de soro fetal bovino (Gibco). As culturas celulares foram mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37 °C, com 5 % de CO₂ e umidade controlada. Além disso, tiveram seu crescimento acompanhado sob microscópio a cada 24 horas e replicadas a cada dois dias.

Nas linhagens de células aderentes COLO 205 e NCI-H460 os repiques foram realizados utilizando solução de tripsina (0,25 % + EDTA 1 mmol/L) em tampão PBS e pH 7,4 para desprender as células aderidas ao fundo da garrafa.

4.2.2.3 Obtenção e cultura das linhagens de células normais

As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) foram obtidas do sangue venoso de voluntários saudáveis sendo coletado pelo sistema de tubos "Vacutainer™" (*Becton Dickinson*) contendo heparina sódica como anticoagulante e processado pela metodologia descrita por Bennett & Breit (1994). O sangue total coletado foi lentamente adicionado sobre o Ficoll-Paque™ Plus (1,08 g/mL) na proporção de 2:1 (20 mL de sangue para 10 mL de Ficoll) em tubo falcon de 50 mL, centrifugado (Centrifuga Sorval) à 1500 rpm por 40 minutos, a 20 °C. O plasma, que compõe a primeira camada no tubo de centrífuga, foi descartado e o anel de células mononucleares foi colhido, lavado três vezes com meio de cultura (DMEM/F-12) gelado não suplementado e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Após as lavagens, as PBMCs foram quantificadas e ressuspensas em meio DMEM/F-12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 20 µg/mL de gentamicina. Para estimular a cultura de PBMCs, foi adicionado 0,25 µg/mL Enterotoxina B de *Staphilococcus* (SEB) (Sigma).

4.2.2.4 Quantificação celular adequada para os experimentos

A quantificação celular foi feita em câmara de Neubauer (Boeco) com corante vital azul de Trypan (Sigma) na concentração de 0,4 mmol/L. Uma alíquota das células de cada cultura foi quantificada e as células ressuspensas em meio de cultura DMEM/F-12 completo, de modo a obter-se a concentração final de $1,0 \times 10^6$ células/mL de cultura.

4.2.2.5 Avaliação da viabilidade celular das amostras frente às células neoplásicas e normais (PBMC)

A viabilidade celular foi analisada de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983) que consiste no ensaio colorimétrico através da metabolização do MTT (3-(4,5- dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio).

Nesse ensaio, as células U-937, THP-1, COLO 205, NCI-H460 e PBMCs foram plaqueadas em volume de 100 μL /poço (1×10^6 cels/mL) em placas de 96 poços (TPP), tratadas com as frações (somente com U-937, THP-1 e PBMCs) e substâncias nas concentrações finais de trabalho específico de cada amostra no tempo de 48 horas. O controle negativo, representado como 100 % de viabilidade celular, foi correspondente a células mantidas somente incubadas com meio de cultura DMEM/F-12 suplementado com 20 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina e 10 % de soro fetal bovino.

Como fármaco padrão, a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo para fins comparativos. Foi empregado o controle do solvente DMSO, usado na diluição das frações e substâncias.

Após 48 horas de incubação com as amostras, foram adicionados 20 μL da solução de MTT (Sigma, 5 mg/mL em PBS) para cada 100 μL de cultivo. As placas foram mantidas na estufa a 37 °C com 5% de CO₂ e umidade controlada por quatro horas. Após esse período foram retirados 150 μL do sobrenadante de cada poço e depois adicionados 100 μL de uma solução de 0,0014 % de HCl fumegante com isopropanol (Merck), homogeneizando bem até a completa dissolução dos cristais púrpuros. Para separar o precipitado, as placas foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm e 100 μL do sobrenadante foi transferido para outra placa de cultura de 96 poços e lida em espectrofotômetro (Epoch™, BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas em três ensaios independentes.

Seleção das linhagens mais sensíveis e das substâncias promissoras

Neste *screening* inicial foi avaliada a viabilidade das células por meio de uma triagem das frações e substâncias. Após o *screening*, foi selecionada a linhagem mais sensível ao tratamento de citotoxicidade para que fosse avaliada a indução de morte celular.

4.2.2.6 Testes de avaliação do tipo de morte celular induzido pelas frações e substâncias

4.2.2.6.1 Ensaio de dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (IP)

De acordo com o protocolo do kit *AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit* (SIGMA-ALDRICH), a linhagem celular U-937 foi plaqueada na concentração de 1×10^6 células/mL em placas de 24 poços e tratada com as respectivas concentrações mais ativas de cada substância, durante 12 horas de incubação. Como controles negativos de indução de morte celular, as células foram cultivadas em meio DMEM/F-12 suplementado com 20 µg/mL de gentamicina e 10 % de soro fetal bovino.

Após o período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e ressuspensas no tampão de ligação fornecido pelo kit (100mM HEPES/NaOH, pH 7,5, contendo 1400 mmol/L de NaCl e 25 mmol/L de CaCl₂). Em 500 µL da solução de tampão de ligação com as células foram adicionados 5 µL de Anexina V e 10 µL de Iodeto de Propídio (IP) para cada amostra. As amostras foram deixadas por 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Imediatamente após esse tempo as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur).

4.2.2.6.2 Avaliação de apoptose pela fragmentação do DNA em gel de agarose

Para investigar a fragmentação do DNA foi utilizada a metodologia descrita por Gong (1994).

As linhagens celulares U-937 e THP-1 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL em placas de 6 poços e tratadas com as respectivas concentrações mais ativas de cada fração das espécies, durante 24 horas de incubação. Como controles negativos de indução de morte celular, as células foram cultivadas em meio DMEM/F-12 suplementado com 20 µg/mL de gentamicina e 10 % de soro fetal bovino.

Após incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em etanol 70 % à temperatura de -20 °C durante 2 horas. Após a centrifugação o etanol foi totalmente removido e evaporado à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 50 µL de tampão de extração (Na_2HPO_4 0,2 mol/L e $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0,1 mol/L, pH 7,8) e incubadas a 37 °C durante 30 minutos. Logo após esse processo, 5 µL de RNase (1mg/mL) foi adicionado em cada amostra, e uma nova incubação foi realizada a 3 °C durante 30 minutos. Para detectar os fragmentos de DNA, as amostras de DNA isoladas foram submetidas a eletroforese durante 1 hora a 60 V em gel de agarose a 1% e coradas com ácido nucleico GelRedStain (Biotium). A fragmentação do DNA foi observada em um transiluminador UV (Bio-Rad, Gel Doc™ XR +).

4.2.2.6.3 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1)

Para a quantificação de células em apoptose, foi utilizada a metodologia descrita por Gong (1994). A linhagem celular U-937 na concentração de 1×10^6 células/mL foi plaqueada em volume de 500 µL/poço em placas de 24 poços e tratada com as respectivas concentrações mais ativas de cada substância, durante 24 horas de incubação. Como controles negativos de indução de morte celular, as células foram cultivadas em meio DMEM/F-12 suplementado com 20 µg/mL de gentamicina e 10 % de soro fetal bovino.

Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi transferido para um eppendorf e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. O *pellet* obtido foi lavado duas vezes com PBS e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. Depois de lavado, ao *pellet* foi adicionado lentamente 1 mL de etanol 70 % gelado e as células submetidas a fixação por 30 minutos a 4 °C. Após o período de fixação, as células foram sedimentadas por centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos e o *pellet* formado foi lavado com tampão fosfato-citrato (0,2 mol/L, pH=7,8) e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* formado adicionado 50 µL de RNase A (100 µg/mL Sigma) e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, foram adicionados 400 µL de iodeto de propídio (concentração final 50 µg/mL; Sigma). As células foram avaliadas, então, para a marcação do conteúdo de DNA por IP, em citômetro de fluxo (FACS Calibur) onde foram contados 10.000 eventos por amostra.

4.2.2.6.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Segundo o protocolo descrito por Cossariza (1993), a linhagem celular U-937 na concentração de 1×10^6 células/mL foi plaqueada em volume de 500 µL/poço em placas de 24 poços, e tratada com as respectivas concentrações mais ativas de cada substância durante 12 horas de incubação. Como controles negativos de indução de morte celular, as células foram cultivadas em meio DMEM/F-12 suplementado com 20 µg/mL de gentamicina e 10 % de soro fetal bovino.

Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi transferido para eppendorf e centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* incubado por 15 minutos em estufa (37 °C e 5% de CO₂) com 500 µL de solução do marcador catiônico lipofílico fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro- 1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) (25 µg/mL diluído 1:1000 em meio de cultura, Sigma). As células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e lavadas duas vezes com 2 mL de meio de cultura DMEM/F-12. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido

ressuspendido em 500 μ L de meio de cultura DMEM/F-12 e a leitura foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (FACS Calibur).

4.2.2.6.5 Detecção da atividade das caspases

Segundo o protocolo *Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)* contendo substratos para as caspases -3 (efetora para ambas as vias) e -9 (ativadora da via mitocondrial) a cultura de células da linhagem U937, contendo 1×10^6 céls/mL, foi tratada com a respectiva concentração mais ativa da substância mais promissora, durante o tempo específico da amostra. Posteriormente as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1200 rpm e ressuspendidas em 100 μ L do tampão de lise (1 % Triton X-100, 0.32 mol/L sacarose, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2 mmol/L dithiothreitol, 1 mmol/L PMSF, 1 g/mL aprotinina, 1 mg/mL leucepeptina). As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 10.000 rpm, na qual se retirou o lisado (sobrenadante). Aos 50 μ L do lisado de células foram adicionados 50 μ L do tampão de reação contendo 10 mmol/L de DTT (dithiothreitol) e 15 μ L do substrato de caspase na concentração de 1,5 mmol/L em cada amostra (DEVD-pNA específico para caspase 3, LEHD-pNA específico para caspase 9). As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora em estufa, no escuro. Logo após, a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro (Epoch™, BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 405 nm e a atividade enzimática foi quantificada pelo aparecimento da cor, que indica a clivagem do respectivo substrato. O resultado foi expresso como unidades relativas de absorbância em comparação com os valores do grupo controle (não tratado). Os ensaios foram feitos em duplicatas.

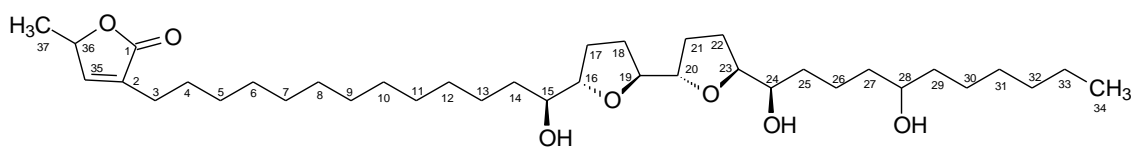
4.2.2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas para o teste de viabilidade celular utilizando o programa GraphPad versão 4.0. Para este experimento foi utilizado o teste estatístico Two-way ANOVA. As diferenças significativas serão consideradas como $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação estrutural dos constituintes químicos isolados da espécie *Annona dioica*.

5.1.1 Identificação da substância A1



A1

A substância **A1** presente na fração clorofórmica de *Annona dioica*, foi isolada com um aspecto de cera incolor. Apresentou teste positivo para acetogeninas pela coloração rosa-violeta demonstrada em solução do reagente de Kedde, que sugere a presença do anel γ - lactônico α,β - insaturado.

Na análise do espectro na região do Infravermelho (**Figura 15, p. 102**), confirma-se esta hipótese devido à existência de uma banda de absorção em $1751,8\text{ cm}^{-1}$, que corresponde à presença de um grupo carbonílico de uma γ - lactona α,β -insaturada. Também, pode ser observada uma banda de absorção a $3429,2\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença do grupo hidroxila, que são característicos grupos funcionais presentes nas estruturas das acetogeninas. As absorções em $2922,2\text{ cm}^{-1}$ e $2853,3\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de ligação H-Csp^3 e, a em $1060,4\text{ cm}^{-1}$ indica a presença de C-O.

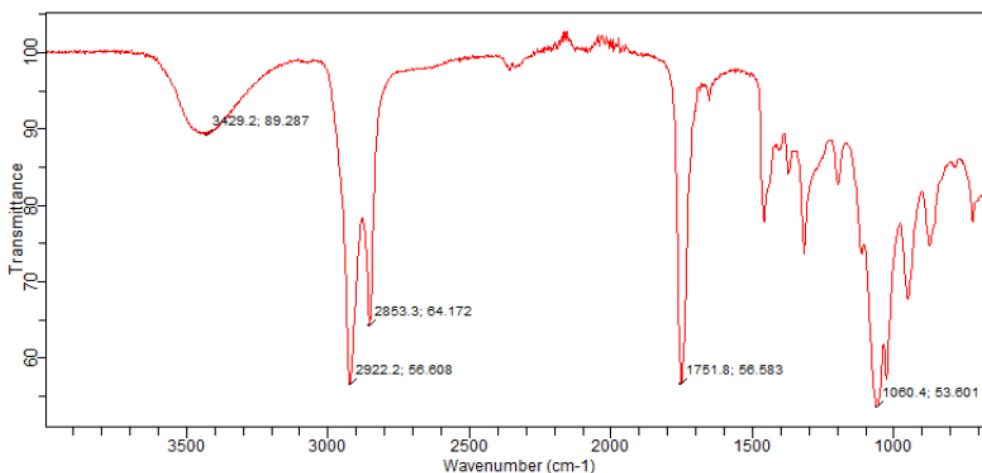


Figura 15. Espectro de infravermelho da esquamocina (A1).

O espectro de RMN ^1H de A1 (Figura 20, p. 108 e Figura 21, p. 109), corrobora com os dados descritos acima e permite estabelecer com exatidão a estrutura de um sistema γ -metil γ -lactona α,β -insaturada apresentado na Figura 16, p. 103. Pode ser observada, a presença de um sinal integrando para um átomo de hidrogênio que aparece como um duplete em δ_{H} 7,0, referente ao H-35 oleofínico (β) com uma constante de acoplamento $^3J = 1,6$ Hz com o H-36 (γ). Esta constante de acoplamento é característica de um hidrogênio vinílico com um átomo de hidrogênio de um anel de cinco membros. Por outro lado, o H-36 (γ) aparece duplo quadruplete, integrando para um hidrogênio em δ_{H} 5,0, por se acoplar com o H-35 oleofínico (β) ($^3J_{36-35} = 1,6$ Hz) e com os hidrogênios do grupo metila CH_3 -37 ($^3J_{36-37} = 6,8$ Hz). Quanto ao grupo metila CH_3 -37, aparece em δ_{H} 1,43 como duplete com uma constante vicinal de $^3J_{37-36} = 6,8$ Hz. Os átomos de hidrogênios metilênicos 2H-3 são equivalentes e aparecem como tripleto em δ_{H} 2,25 ($^3J_{3-4} = 6$ Hz). As correlações homonucleares apresentadas no mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY (Figura 23, p. 110) reforçam claramente a conectividade entre esses átomos de hidrogênio. No espectro de RMN ^{13}C observa um sinal em δ_{C} 173,90, correspondente ao átomo de carbono carbonílico C-1 da lactona. O átomo de carbono oleofínico C-2 (α) apresenta deslocamento químico em δ_{C} 134,34 e o C-35 em δ_{C} 148,85. O sinal dos átomos dos carbonos metínico CH-36 (γ) e o carbono metílico CH_3 -37, aparecem a δ_{C} 77,40 e δ_{C} 19,22, respectivamente.

Desta maneira, as atribuições dos sinais de deslocamentos químicos referentes aos átomos de hidrogênios e carbonos do anel γ -lactônico α,β -insaturado foram confirmados através do mapa de correlação heteronuclear HSQC.

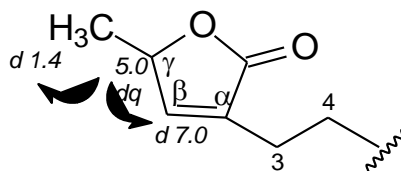


Figura 16. Deslocamentos químicos de RMN ^1H característicos do anel γ -lactônico α,β -insaturado sem hidroxila no átomo de carbono 4.

A análise concomitante dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C proporciona uma grande informação sobre o número de anéis THF dispostos ao longo da cadeia hidrocarbônica, e incluso a sua configuração relativa. Os átomos de carbono oxigenados dos anéis tetrahydrofurânicos (THF) normalmente aparecem entre $\delta_{\text{C}} 79$ e $\delta_{\text{C}} 83$, de tal maneira que de acordo com o número de sinais que aparecem nesta zona, pode ser deduzido o número de anéis THF que a molécula apresenta. Os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbonos oxigenados apresentam sinais em $\delta_{\text{H}} 3,8$ como multipletos. A integração deste sinal indica o número de anéis THF que a molécula apresenta, mas tem que levar em conta os átomos de hidrogênio dos carbonos hidroxilados que aparecem entre $\delta_{\text{H}} 3,4-3,8$ (CAVÉ et al., 1997).

Assim, o sistema bis-tetrahydrofurânico adjacente α, α' -dihidroxilado foi sugerido pela presença de quatro sinais em $\delta_{\text{C}} 83,31$ (CH-16), $\delta_{\text{C}} 82,52$ (CH-19), $\delta_{\text{C}} 82,22$ (CH-20) e $\delta_{\text{C}} 82,81$ (CH-23) e de dois carbonos carbinólicos em $\delta_{\text{C}} 74,14$ (CH-15) e $\delta_{\text{C}} 71,41$ (CH-24) observados do espectro RMN ^{13}C (**Figuras 22, p. 109**) em consonância com os sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio observados no espectro RMN ^1H (**Figura 20, p. 108 e Figura 21, p. 109**) em que se observa dois multipletos característicos do sistema bis-tetrahydrofurânico adjacente α, α' -dihidroxilado: um multipletos integrando para um átomo de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 3,40$ (H-15) e um outro multipletos em $\delta_{\text{H}} 3,87-3,98$, referente aos átomos de hidrogênios H-16, H-19,

H-20, H-23 e H-24. Aos quatro carbonos metilênicos que fazem parte do sistema anel bis-THF, foram atribuídos os sinais em δ_C 28,93 (CH₂-17), δ_C 28,40 (CH₂-18), δ_C 24,83 (CH₂-21), δ_C 28,93 (CH₂-22), em consonância com os sinais correspondentes aos átomos de hidrogênios observados no multipletto δ_H 1,65-2,00.

Para estabelecer a configuração relativa do sistema THF, foi realizada uma análise comparativa dos dados citados com os modelos descritos na literatura. Vários estudos de RMN sobre modelos preparados por síntese, mostraram diferenças de deslocamento químico em função da sua configuração relativa (*erythro* ou *threo*/ *cis* ou *trans*). A comparação entre os valores de RMN ¹H e RMN ¹³C dos modelos de síntese e dos atribuídos para algumas acetogeninas bis-THF naturais, permitiram estabelecer a configuração relativa dos sistemas THF das mesmas. Assim, foi possível distinguir seis configurações relativas nas acetogeninas bis-THF adjacentes naturais (**Figura 17**) (CAVÉ et al., 1997; ZAFRA-POLO et al., 1998; HOYE & SUHADOLNIK, 1987; HOYE & ZHUANG, 1988).

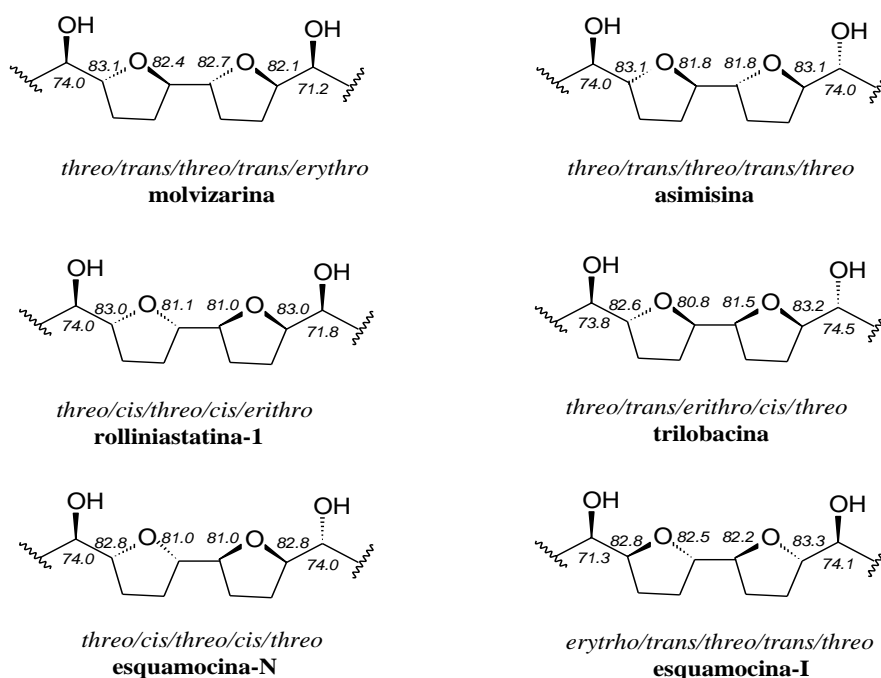
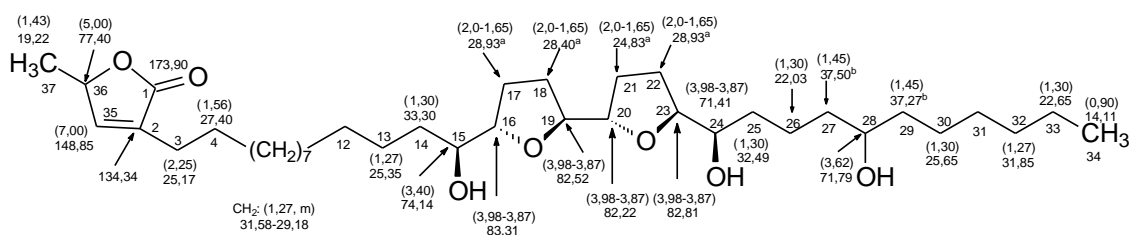


Figura 17. Configuração relativa dos sistemas bis-THF adjacentes observados em acetogeninas naturais.

Dessa forma, permitiu propor a configuração relativa do sistema bis-THF adjacente como sendo *threo/trans/threo/trans/erythro* para a acetogenina **A1**, semelhante à molvizarina.

Para confirmar a presença do grupo funcional hidroxila ao longo da cadeia hidrocarbônica, na análise do espectro de RMN ^{13}C observou-se a presença de mais um sinal na região onde se situam os carbonos hidroxilados da cadeia alifática, entre δ_{C} 67 e 74 (CAVÉ et al., 1997). Refere-se ao sinal em δ_{C} 71,79 (CH-28) e, no espectro de RMN ^1H o átomo de hidrogênio correspondente aparece como um multipeto integrando para um hidrogênio em δ_{H} 3,62, sendo, portanto, a presença típica de um grupo hidroxila em uma cadeia alquila.

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbonos, no espectro de RMN ^{13}C (**Figura 22, p. 109**), da parte não funcionalizada, estão de acordo com os dados da literatura (CH₂-3 a CH₂-13 e CH₂-31: δ_{C} 25,17-31,58; CH₂-17, CH₂-18, CH₂-21, CH₂-22: δ_{C} 28,93-24,83). No espectro de RMN ^1H os sinais correspondentes a esses átomos de hidrogênios aparecem em δ_{H} 2,25-1,27; δ_{H} 2,0-1,65, respectivamente. As demais atribuições de valores dos deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C encontram-se sumarizadas na **Tabela 24, p. 107** e na **Figura 18**.



a,b pode ocorrer inversão de valores

Figura 18. Deslocamentos químicos de RMN ^1H (entre parêntesis) de RMN ^{13}C da esquamocina (**A1**).

O espectro de massas ESI-MS (**Figuras 24 e 25, p. 110 e 111**) apresentou o pico do íon molecular $[\text{M}^+\text{Na}]^+$ de m/z 645,5 indicando M^+ de m/z 622 (622,480855 cal), consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_7$, confirmando a proposta estrutural da acetogenina **A1**. O espectro também

revelou picos que podem ser justificados por íons correspondentes à perda de moléculas de água. É importante destacar que o pico em m/z 365,1 (366,27 cal) permite confirmar a posição do anel bis-tetrahidrofurânico adjacente entre os átomos de carbonos C-19/C-20. Além disso, o pico em m/z 117,0 (116,12 cal) confirma a posição do grupo hidroxila na cadeia hidrocarbônica em C-28, atribuído à clivagem entre os átomos de carbonos C-27/C-28 (**Figura 19**).

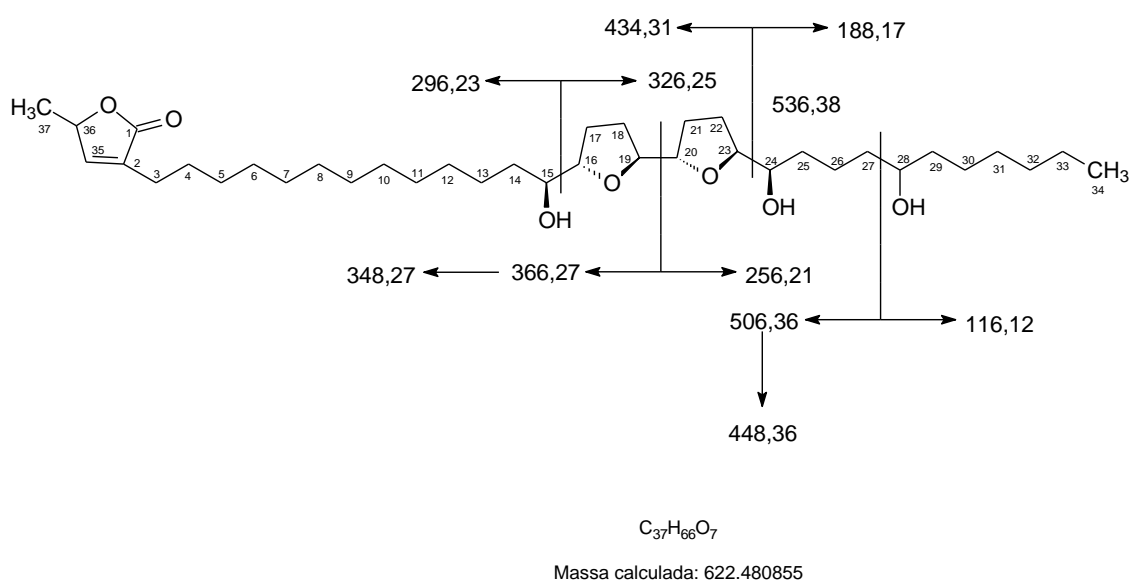


Figura 19. Proposta de fragmentação para os principais íons da esquamocina (**A1**).

A comparação dos dados de RMN 1H e RMN ^{13}C com dados de literatura confirmou de forma inequívoca que a acetogenina **A1** trata-se da esquamocina, conhecida como annonina-I, isolada pela primeira vez das sementes de *A. squamosa* (FUJIMOTO et al., 1988). Também, já foi encontrada nas sementes de *A. atemoya*, cascas de *A. bullata*, sementes de *A. reticulata*, nas sementes de *A. spinescens*, nas sementes de *A. cherimolia* e sementes de *A. senegalenses* (CHANG et al., 1999; HUI et al., 1991; YUAN et al., 2006; QUEIROZ et al., 1998; CORTES et al., 1991; SAPHAZ et al., 1996).

Tabela 24. Dados de RMN¹H (300 MHz), ¹³C (500 MHz) da acetogenina **A1**, em CDCl₃ (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a esquamocina em CDCl₃. Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (entre parêntesis) estão em Hz.

	Substância A1		Esquamocina (FUJIMOTO <i>et al.</i> , 1988)	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
C				
1	173,90	-	173,93	-
2	134,34	-	134,31	-
CH				
15	74,14	3,40 (<i>m</i>)	74,09	3,33 (<i>m</i>)
16	83,31	3,98-3,87 (<i>m</i>)	83,36	3,86-3,76 (<i>m</i>)
19	82,52	3,98-3,87 (<i>m</i>)	82,55	3,86-3,76 (<i>m</i>)
20	82,22	3,98-3,87 (<i>m</i>)	82,15	3,86-3,76 (<i>m</i>)
23	82,81	3,98-3,87 (<i>m</i>)	82,85	3,86-3,76 (<i>m</i>)
24	71,41	3,98-3,87 (<i>m</i>)	71,51	3,86-3,76 (<i>m</i>)
28	71,79	3,62 (<i>m</i>)	71,60	3,52 (<i>m</i>)
35	148,85	7,0 (<i>d</i> , <i>J</i> =1,6)	148,97	6,96 (<i>d</i> , <i>J</i> =1,4)
36	77,40	5,0 (<i>dq</i> , <i>J</i> =1,6/6,8)	77,35	4,95(<i>dq</i> , <i>J</i> =1,4/6,8)
CH₂				
3	25,17	2,25 (<i>t</i> , <i>J</i> =6)	25,18	2,21 (<i>t</i> , <i>J</i> =7,7)
4	27,40	1,56 (<i>m</i>)	27,43	1,50 (<i>m</i>)
5-12	31,58-29,18	1,27 (<i>m</i>)	29,78-29,16	1,27-1,20 (<i>m</i>)
13	25,35	1,27 (<i>m</i>)	25,69	1,27-1,20 (<i>m</i>)
14	33,30	1,30 (<i>m</i>)	33,12	1,30 (<i>m</i>)
17	28,93 ^a	2,00-1,65 (<i>m</i>)	28,86	1,9-1,5 (<i>m</i>)
18	28,40 ^a	2,00-1,65 (<i>m</i>)	28,48	1,9-1,5 (<i>m</i>)
21	24,83 ^a	2,00-1,65 (<i>m</i>)	24,97	1,87-1,76 (<i>m</i>)
22	28,93 ^a	2,00-1,65 (<i>m</i>)	28,99	1,9-1,5 (<i>m</i>)
25	32,49	1,30 (<i>m</i>)	32,49	1,30 (<i>m</i>)
26	22,03	1,30 (<i>m</i>)	22,07	1,30 (<i>m</i>)
27	37,50 ^b	1,45 (<i>m</i>)	37,48	1,4-1,35 (<i>m</i>)
29	37,27 ^b	1,45 (<i>m</i>)	37,27	1,4-1,35 (<i>m</i>)
30	25,65	1,30 (<i>m</i>)	25,65	1,30 (<i>m</i>)
31	31,58-29,18	1,27 (<i>m</i>)	29,78-29,16	1,25 (<i>m</i>)
32	31,85	1,27 (<i>m</i>)	31,81	1,25 (<i>m</i>)
33	22,65	1,30 (<i>m</i>)	22,63	1,25 (<i>m</i>)
CH₃				

34	14,11	0,90 (<i>t</i> , $J=6,0$)	14,08	0,83 (<i>t</i> , $J=7,0$)
37	19,22	1,43 (<i>d</i> , $J=6,8$)	19,21	1,36 (<i>d</i> , $J=6,8$)

^{a,b} pode ocorrer inversão de valores

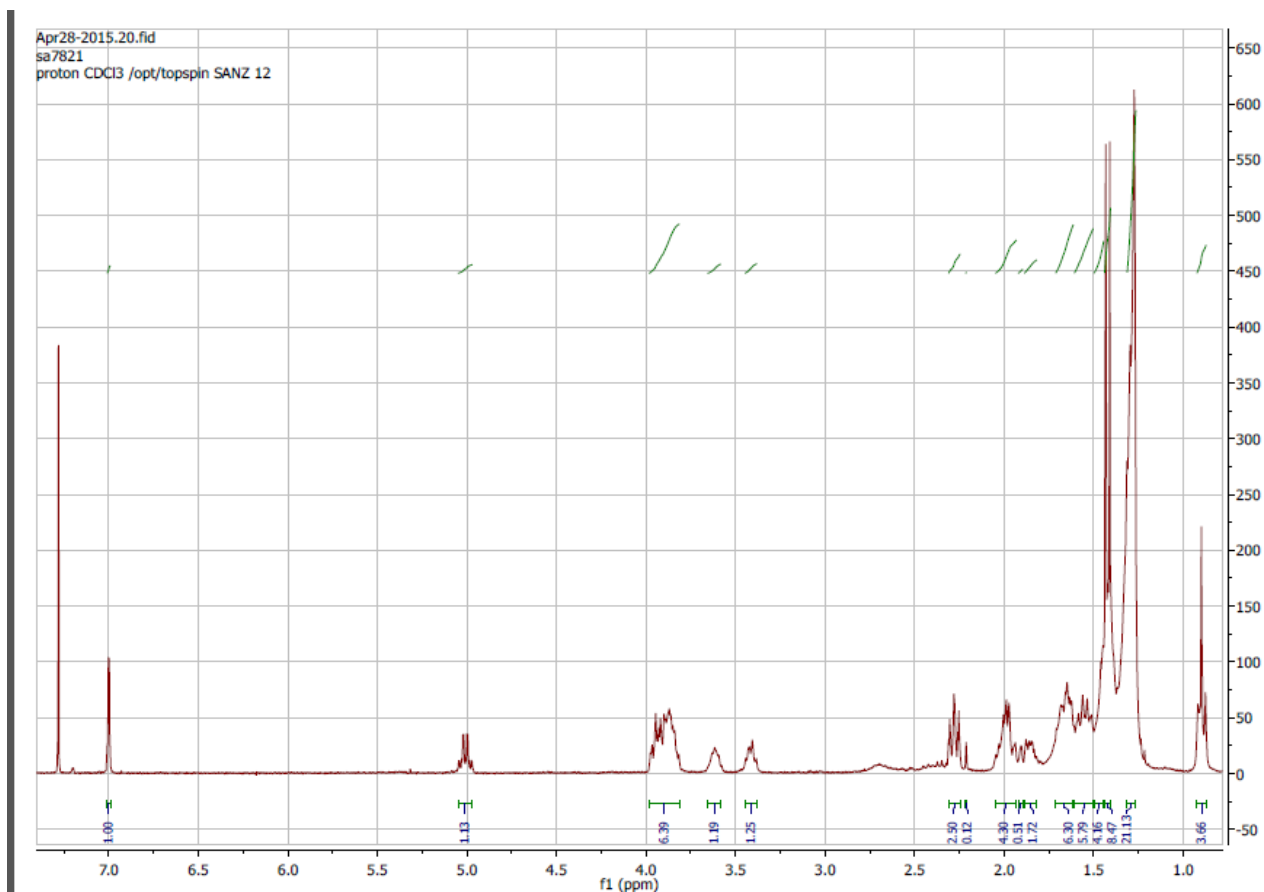


Figura 20. Espectro de RMN ¹H (300 MHz) em CDCl₃ de **A1**.

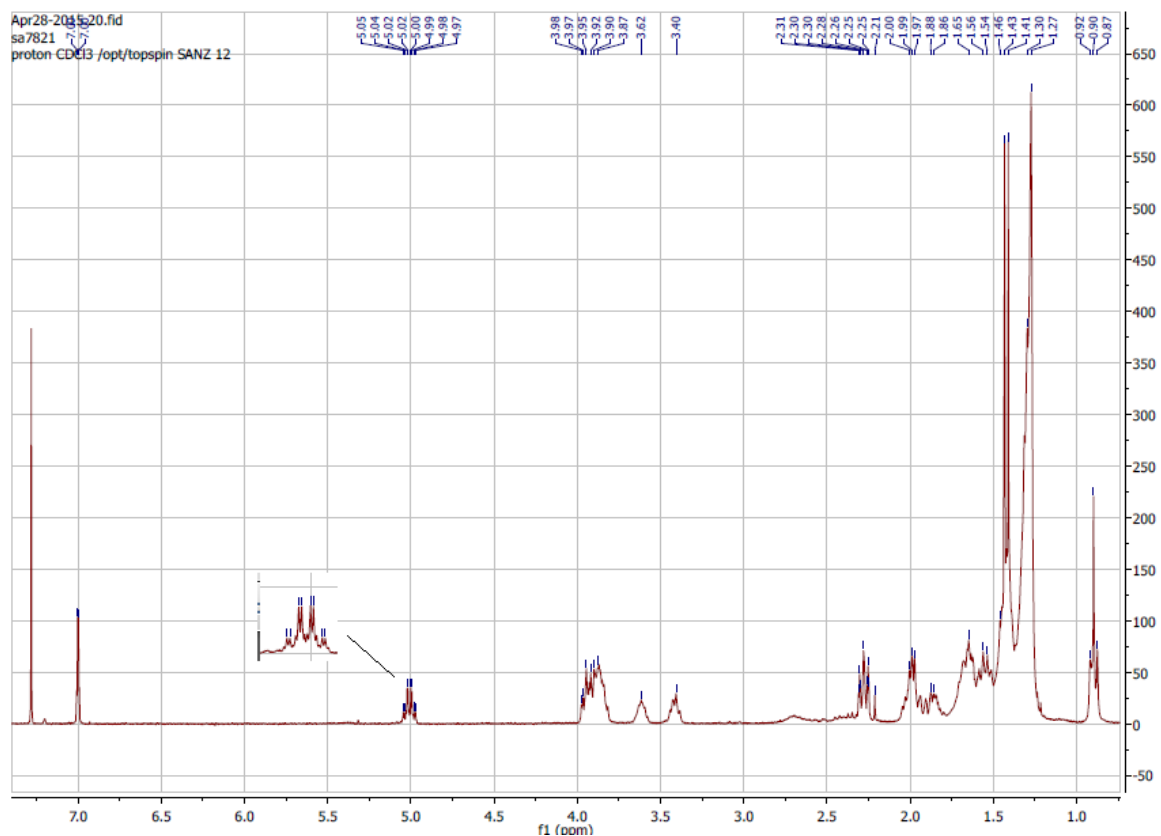


Figura 21. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de A1.

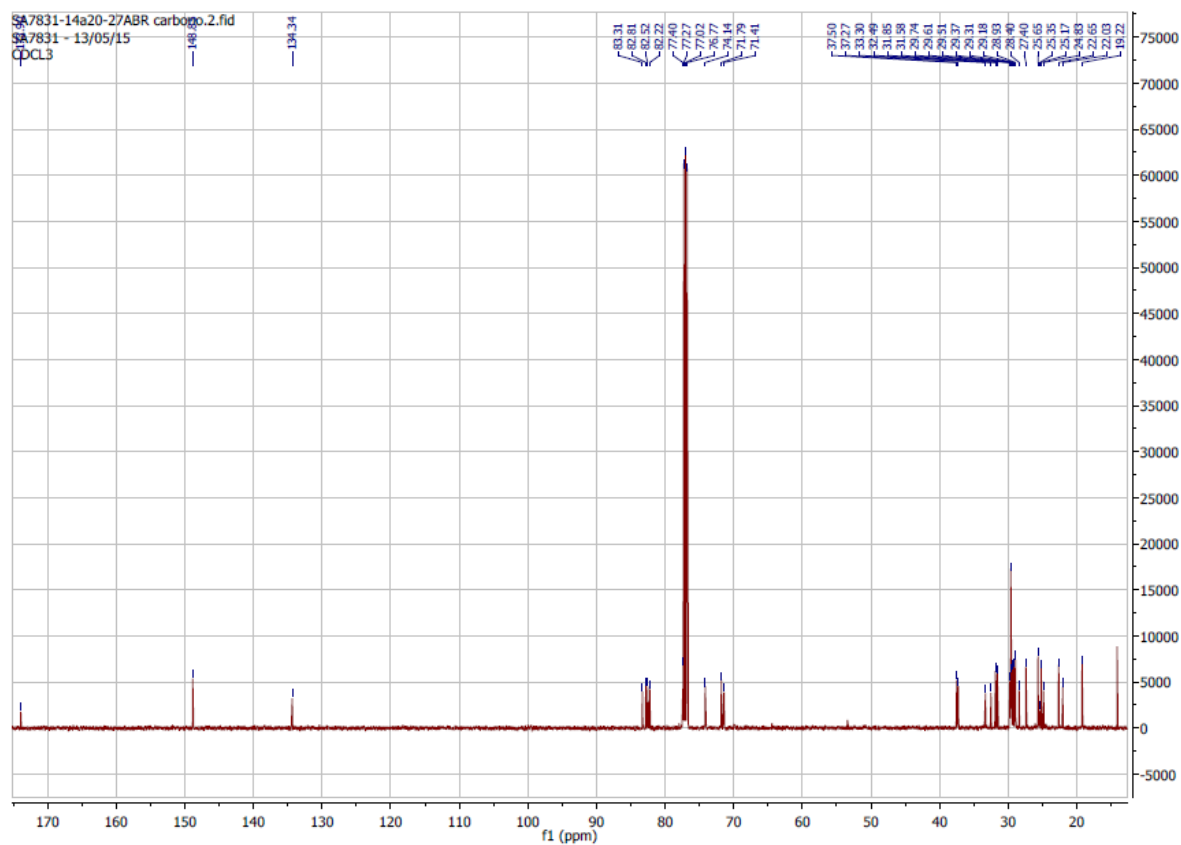


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz) em CDCl_3 de A1.

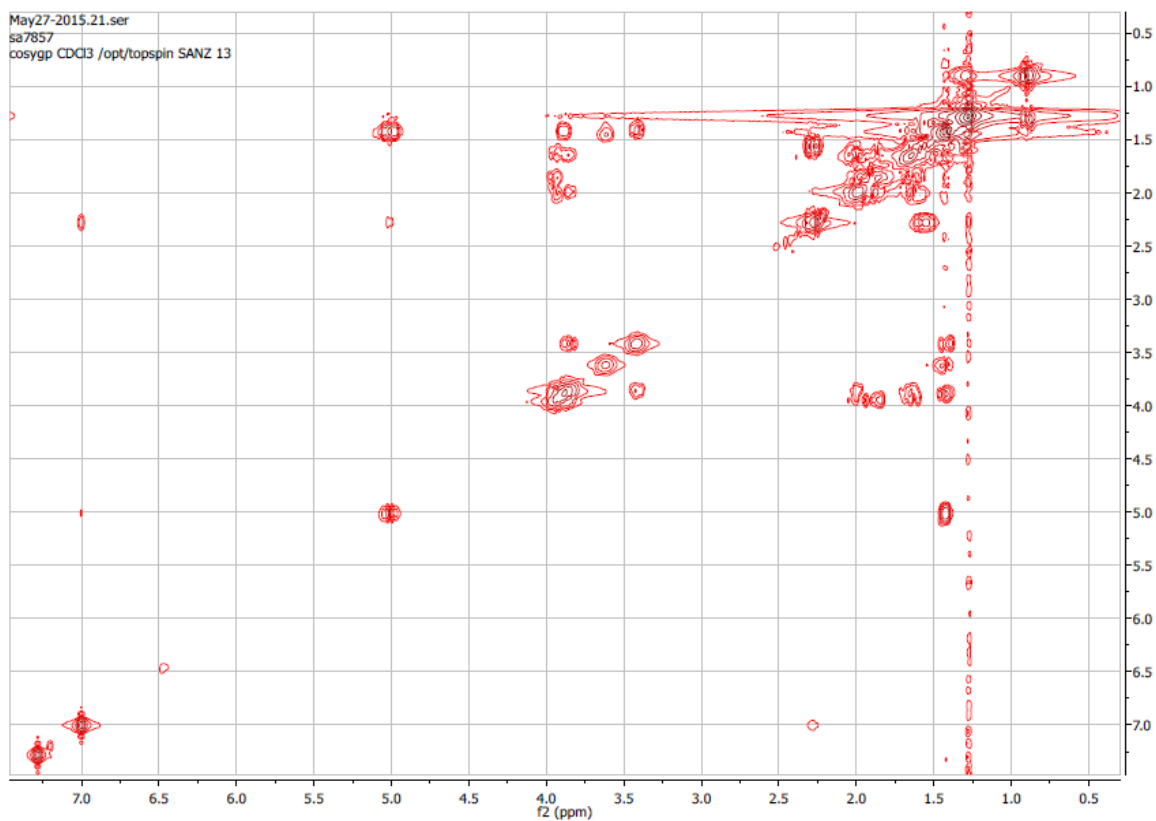


Figura 23. Mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY em CDCl_3 de **A1**.

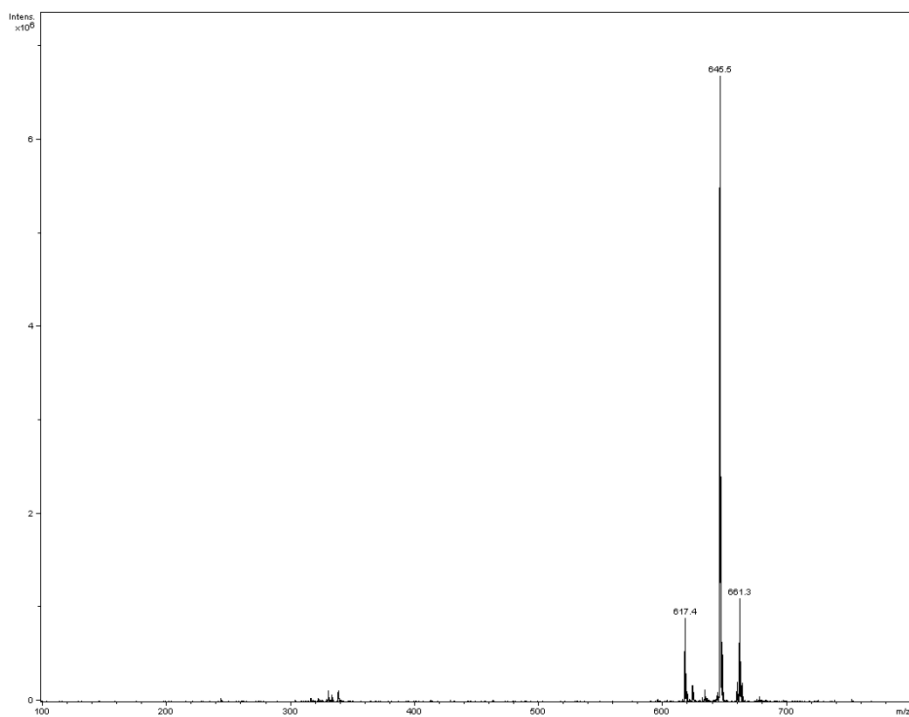


Figura 24. Espectro de massas ESI-MS de **A1**.

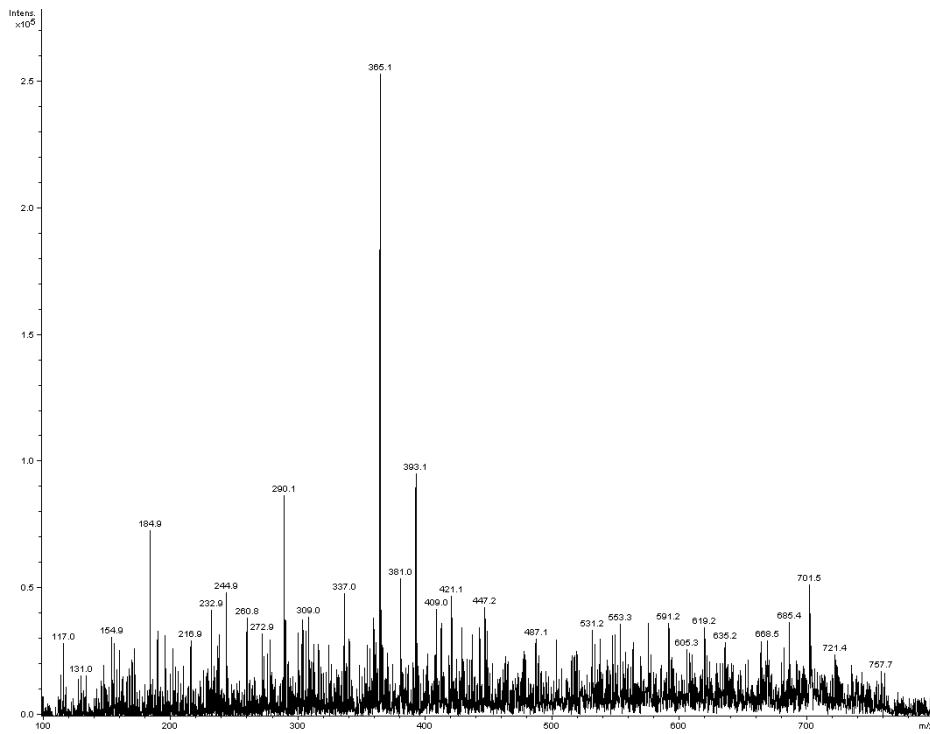
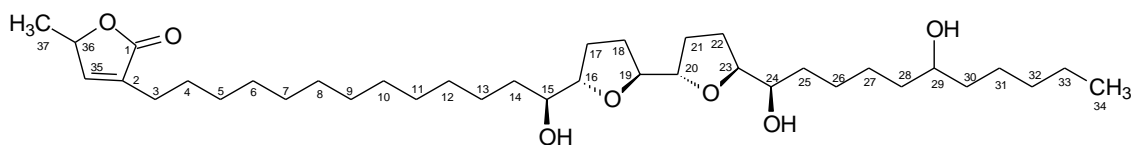


Figura 25. Ampliação do espectro de massas ESI-MS de A1.

5.1.2 Identificação da substância A2



A2

A substância **A2** presente na fração clorofórmica de *Annona dioica*, foi isolada com um aspecto de cera branca. Apresentou teste positivo para acetogeninas pela coloração rosa-violeta demonstrada em solução do reagente de Kedde, que sugere a presença do anel γ -lactônico α,β -insaturado.

Na análise do espectro na região do Infravermelho (**Figura 26**), confirma-se esta hipótese devido a existência de uma banda de absorção em $1742,5\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a presença de um grupo carbonílico de uma γ -lactona α,β -insaturada. Também, pode ser observada uma banda de absorção a $3369,5\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença do grupo hidroxila, que são característicos grupos funcionais presentes nas estruturas das acetogeninas. As absorções em $2916,6\text{ cm}^{-1}$ e $2851,4\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de ligação H-Csp^3 e, a em $1051,1\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de C-O.

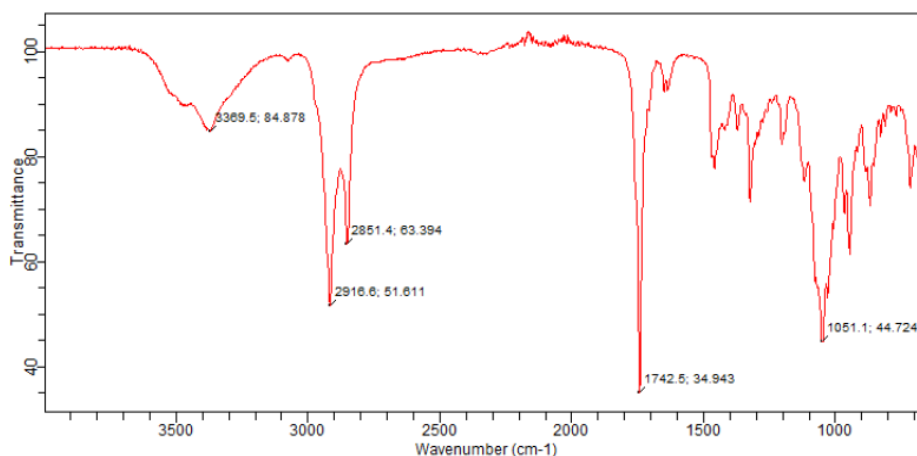


Figura 26. Espectro de infravermelho da motrilina (**A2**).

O espectro de RMN ^1H de **A2** (**Figuras 30 e 31, p. 118**), corrobora com os dados descritos acima e permite estabelecer com exatidão a estrutura de

um sistema γ -metil γ -lactona α,β -insaturada. Pode ser observada, a presença de um sinal integrando para um hidrogênio que aparece como um duplete em δ_H 6,98, referente ao H-35 oleofínico (β) com uma constante de acoplamento $^3J = 1,6$ Hz com o H-36 (γ). Por outro lado, o H-36 aparece duplo quadruplete, integrando para um hidrogênio em δ_H 5,0, por se acoplar com o H-35 oleofínico (β) ($^3J_{36-35} = 1,6$ Hz) e com os hidrogênios do grupo metila CH₃-37 ($^3J_{36-37} = 6,8$ Hz). Quanto ao grupo metila CH₃-37, aparece em δ_H 1,41 como duplete com uma constante vicinal de $^3J_{37-36} = 6,8$ Hz. As correlações homonucleares apresentadas no mapa de correlação 1H - 1H -COSY (**Figura 33, p. 119**) reforçam claramente a proximidade entre esses átomos de hidrogênios.

No espectro de RMN ^{13}C (**Figura 32, p. 119**) observa um sinal em δ_C 173,92, correspondente ao carbono carbonílico C-1 da lactona. O carbono oleofínico C-2 (α) apresenta deslocamento químico em δ_C 134,27 e o C-35 δ_C 148,91. O sinal do carbono metínico CH-36 (γ) e o carbono metílico CH₃-37, aparecem a δ_C 77,42 e δ_C 19,20, respectivamente. Desta maneira, as atribuições dos sinais dos deslocamentos químicos referentes ao anel γ -lactônico α,β -insaturado foram confirmados através do mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figuras 34 e 35, p. 120**).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbonos e hidrogênios presentes no sistema THF, bem como a sua configuração relativa foi realizado pela mesma estratégia empregada na determinação estrutural da substância **A1**, descrita anteriormente (**p. 101**).

Assim, o sistema bis-tetrahidrofurânico adjacente α, α' -dihidroilado foi sugerido pela presença dos quatro sinais em δ_C 83,34 (CH-16), δ_C 82,55 (CH-19), δ_C 82,21 (CH-20) e δ_C 82,80 (CH-23) e de dois carbonos carbinólicos em δ_C 74,16 (CH-15) e δ_C 71,33 (CH-24) observados do espectro RMN ^{13}C (**Figura 32, p. 119**) em consonância com os sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio observados no espectro RMN 1H (**Figuras 30 e 31, p. 118**) em que se observa dois multipletos característicos do sistema bis-THF adjacente α, α' -dihidroilado: um multiplete integrando para um átomo de hidrogênio em δ_H 3,38 (H-15) e um outro multiplete em δ_H 3,80-3,92, referente aos átomos de hidrogênios H-16, H-19, H-20, H-23, H-24. As correlações

observadas no mapa de correlação HSQC e COSY (**Figura 33, p. 119; Figuras 34 e 35, p. 120**) confirmam os deslocamentos químicos propostos.

A comparação entre os valores de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos modelos de síntese e dos atribuídos para algumas acetogeninas bis-THF adjacentes naturais, mediante os modelos apresentados na **Figura 27**, permitiu propor a configuração relativa do sistema bis-THF como sendo *threo/trans/threo/trans/erythro* para a acetogenina **A2**, semelhante à molvizarina.

Para confirmar a presença do grupo funcional hidroxila ao longo da cadeia hidrocarbônica, na análise do espectro de RMN ^{13}C observou-se a presença de mais um sinal na região onde se situam os carbonos hidroxilados da cadeia alifática, entre δ_{C} 67 e 74 (CAVÉ *et al.*, 1997). Refere-se ao sinal em δ_{C} 71,73 (CH-29) e, no espectro de RMN ^1H o átomo de hidrogênio correspondente aparece como um multiplete integrando para um hidrogênio em δ_{H} 3,57. Vale destacar, que um valor aproximado a este deslocamento químico para o átomo de carbono também é encontrado na substância **A1** (esquamocina), porém é atribuído ao CH-28. Isso se deve a única diferença de dados de RMN ^{13}C entre estas duas substâncias, o sinal em δ_{C} 22,03, que somente aparece no espectro da esquamocina (**A1**), que é atribuído ao CH_2 -26 e, a outros sinais referentes aos átomos de carbonos vizinhos. A blindagem do CH_2 -26 da esquamocina (**1**) resulta de dois efeitos β provocados pelos dois átomos de carbonos CH-24 e CH-28. E isso não é observado na substância **A2**, que apresenta o CH_2 -26 em δ_{C} 25,64.

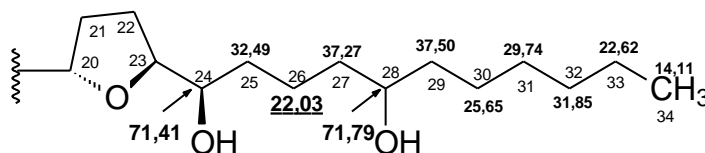


Figura 27. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C da cadeia dihidroxialquil da esquamocina (**A1**).

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbonos, no espectro de RMN ^{13}C (**Figura 32, p. 119**), da parte não funcionalizada, estão de acordo com os dados da literatura (CH_2 -3 a CH_2 -13: δ_{C} 25,15-29,74; CH_2 -17, CH_2 -18,

CH₂-21e CH₂-22: δ_C 28,97-24,58). No espectro de RMN ¹H os sinais correspondentes a esses átomos de hidrogênios aparecem em δ_H 2,25-1,25; δ_H 1,96-1,59, respectivamente. As demais atribuições de valores dos deslocamentos químicos de RMN ¹H e RMN ¹³C encontram-se sumarizadas na **Tabela 25, p. 116** e na **Figura 28**, e, confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (**Figuras 34 e 35, p. 120**).

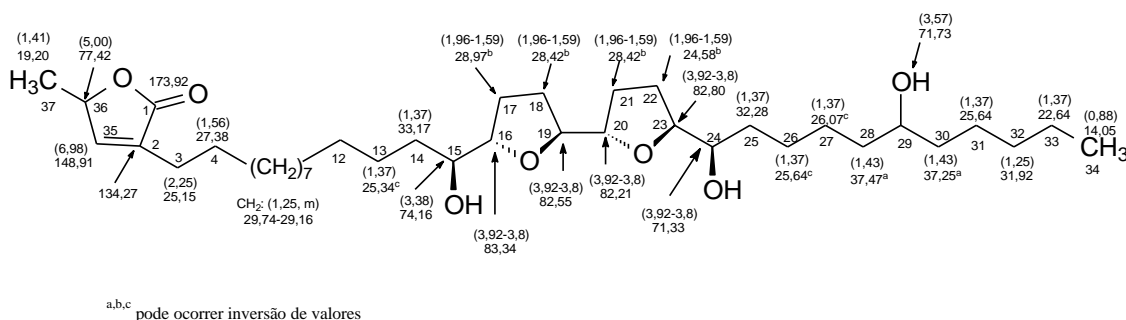


Figura 28. Deslocamentos químicos de RMN ¹H (entre parêntesis) de RMN ¹³C da motrilina (**A2**).

O espectro de massas ESI-MS (**Figura 36, p. 121**) apresentou o pico do íon molecular [M⁺Na]⁺ de *m/z* 645,4 indicando M⁺ de *m/z* 622 (622,480855 cal), consistente com a fórmula molecular C₃₇H₆₆O₇, confirmando a proposta estrutural da acetogenina **A2**. O espectro também revelou picos que podem ser justificados por íons correspondentes à perda de moléculas de água. É importante destacar que o pico em *m/z* 365,1 (366,27 cal) permite confirmar a posição do anel bis-tetrahydrofurânico adjacente entre os átomos de carbonos C-19/C-20. Além disso, o pico em *m/z* 521,2 (520,38 cal) confirma a posição do grupo hidroxila na cadeia hidrocarbônica em C-29, atribuído à clivagem entre os átomos de carbonos C-28/C-29 (**Figura 29, p. 116**).

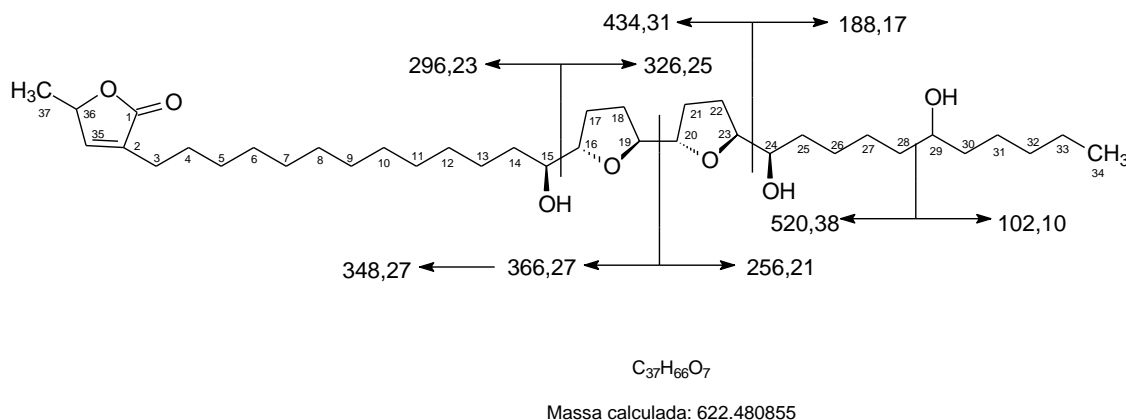


Figura 29. Proposta de fragmentação para os principais íons da motrilina (**A2**).

A comparação dos dados de RMN ¹H e RMN ¹³C com dados de literatura confirmou de forma inequívoca que acetogenina **A2** trata-se da motrilina, um isômero de posição da esquamocina (**A1**), isolada pela primeira vez das sementes de *A. cherimolia* (CORTES *et al.*, 1991). Também, já foi encontrada nas raízes de *A. dioica* e sementes *A. atemoya* (VEGA, 2006; DURET *et al.*, 1997).

Tabela 25. Dados de RMN¹H (300 MHz), ¹³C- (500 MHz) da acetogenina **A2**, em CDCl₃ (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a motrilina em CDCl₃. Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (*J* entre parêntesis) estão em Hz.

	Substância A2		Motrilina (CORTES <i>et al.</i> , 1991)	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
C				
1	173,92	-	173,83	-
2	134,27	-	131,00	-
CH				
15	74,16	3,38 (<i>m</i>)	74,06	3,38 (<i>m</i>)
16	83,34	3,92-3,80 (<i>m</i>)	83,21	3,94-3,85 (<i>m</i>)
19	82,55	3,92-3,80 (<i>m</i>)	82,44	3,94-3,85 (<i>m</i>)
20	82,21	3,92-3,80 (<i>m</i>)	82,69	3,94-3,85 (<i>m</i>)
23	82,80	3,92-3,80 (<i>m</i>)	82,10	3,94-3,85 (<i>m</i>)
24	71,33	3,92-3,80 (<i>m</i>)	71,27	3,94-3,85 (<i>m</i>)
29	71,73	3,57 (<i>m</i>)	71,65	3,55 (<i>m</i>)
35	148,91	6,98 (<i>d</i> , <i>J</i> =1,6)	148,81	6,97 (<i>d</i> , <i>J</i> =1,5)

36	77,42	5,00 (<i>dq</i> , $J=1,6/6,8$)	77,33	4,98 (<i>dq</i> , $J=1,5/7,5$)
CH₂				
3	25,15	2,25 (<i>t</i> , $J=7,7$)	25,05	2,26 (<i>t</i> , $J=8,0$)
4	27,38	1,56 (<i>m</i>)	27,28	1,52 (<i>m</i>)
5-12	29,74-29,16	1,25 (<i>m</i>)	29,63-29,05	1,26 (<i>m</i>)
13	25,34 ^a	1,37 (<i>m</i>)	25,23	1,36 (<i>m</i>)
14	33,17	1,37 (<i>m</i>)	33,09	1,38 (<i>m</i>)
17	28,97 ^b	1,96-1,59 (<i>m</i>)	28,86	1,95-1,65 (<i>m</i>)
18	28,42 ^b	1,96-1,59 (<i>m</i>)	28,31	1,95-1,65 (<i>m</i>)
21	28,42 ^b	1,96-1,59 (<i>m</i>)	28,31	1,95-1,65 (<i>m</i>)
22	24,58 ^b	1,96-1,59 (<i>m</i>)	24,50	1,95-1,65 (<i>m</i>)
25	32,28	1,37 (<i>m</i>)	32,19	1,38 (<i>m</i>)
26	25,64 ^a	1,37 (<i>m</i>)	25,53	1,34 (<i>m</i>)
27	26,07 ^a	1,37 (<i>m</i>)	25,94	1,34
28	37,47 ^c	1,43 (<i>m</i>)	37,36	1,45
30	37,25 ^c	1,43 (<i>m</i>)	37,15	1,45
31	25,64	1,37 (<i>m</i>)	25,53	1,34
32	31,92	1,25 (<i>m</i>)	31,81	1,26
33	22,64	1,37 (<i>m</i>)	22,53	1,32
CH₃				
34	14,05	0,88 (<i>m</i>)	13,94	0,89
37	19,20	1,41 (<i>d</i> , $J=6,8$)	19,09	1,41

^{a,b,c} pode ocorrer inversão de valores

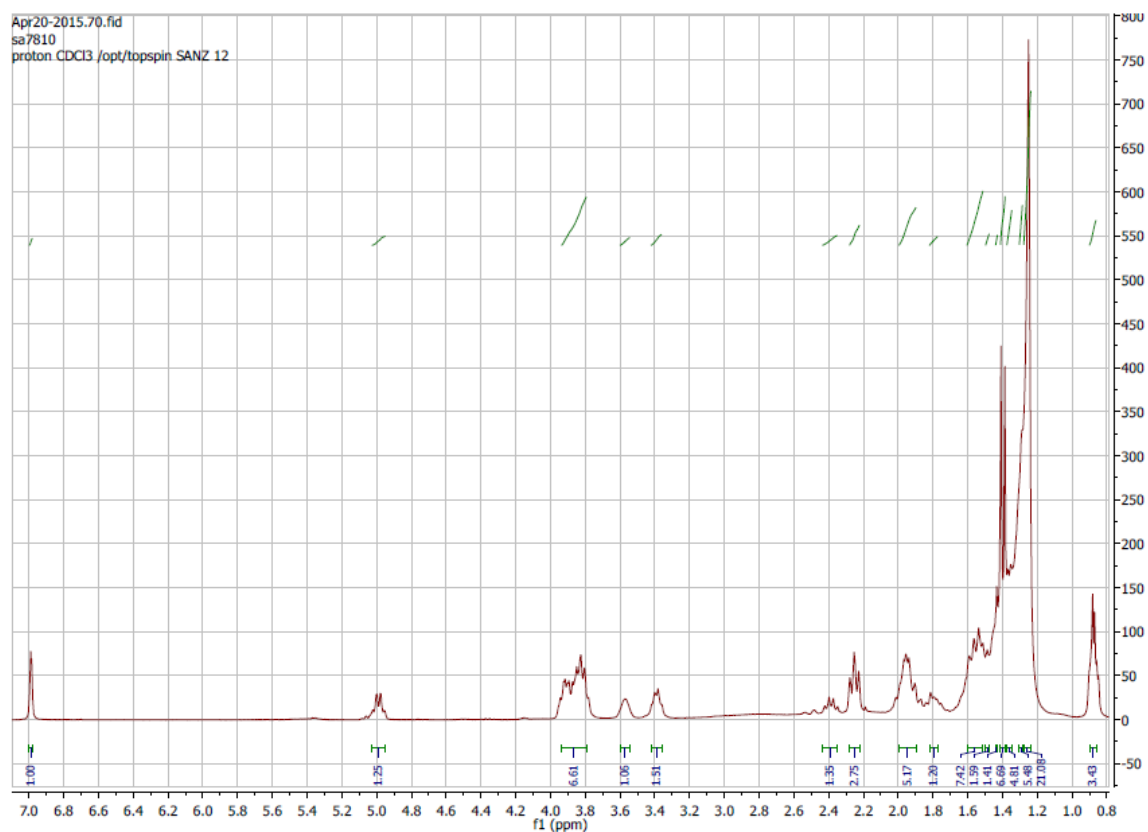


Figura 30. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de A2.

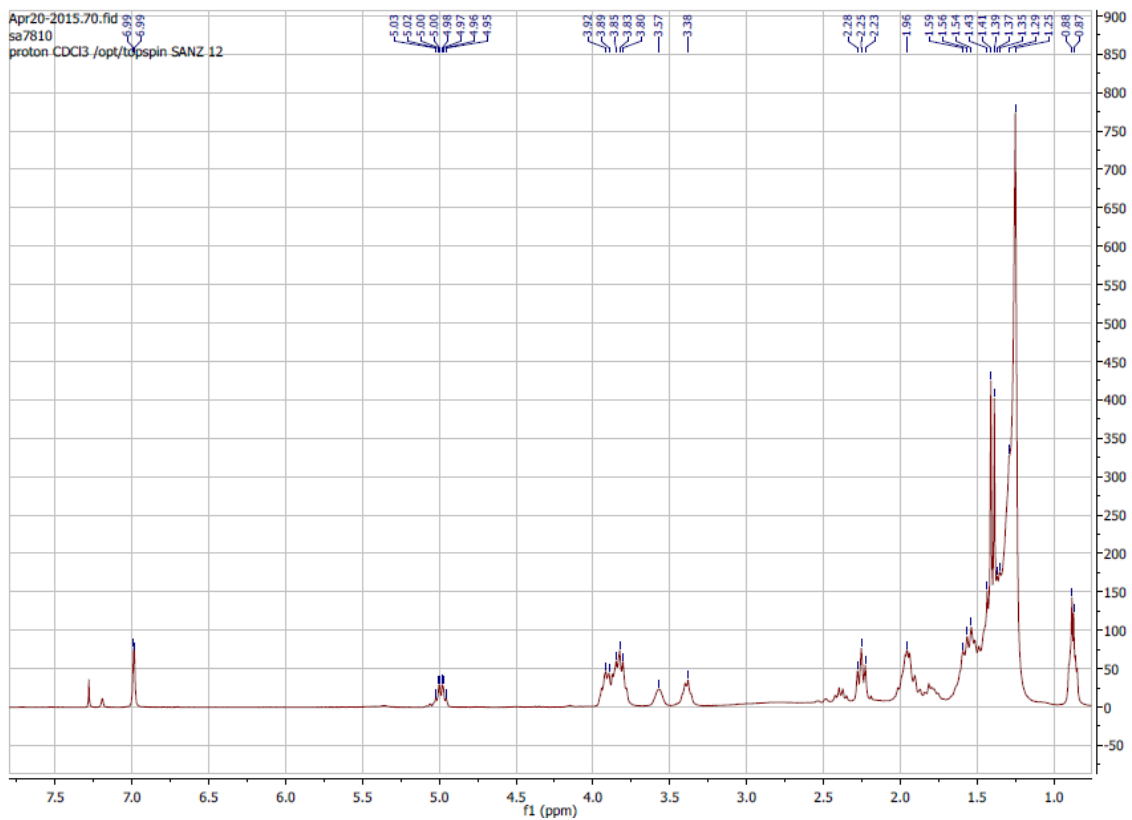


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de A2.

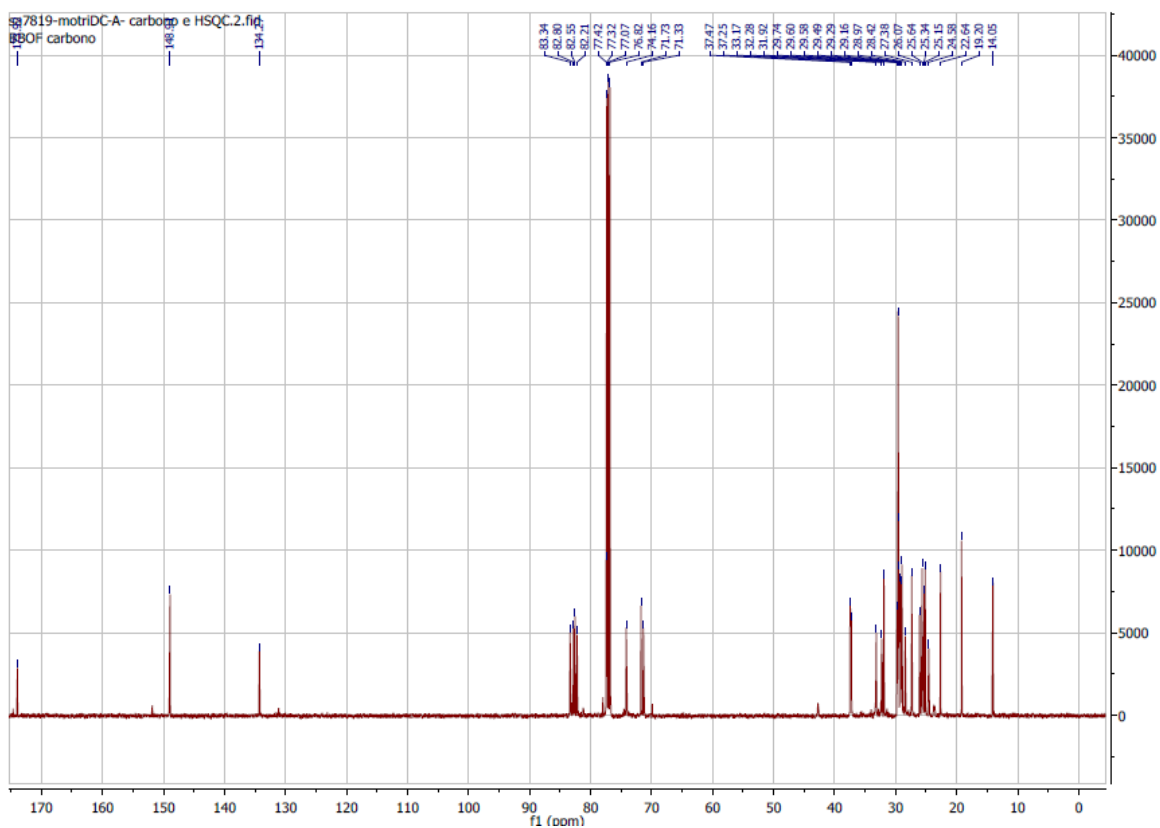


Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz) em CDCl_3 de **A2**.

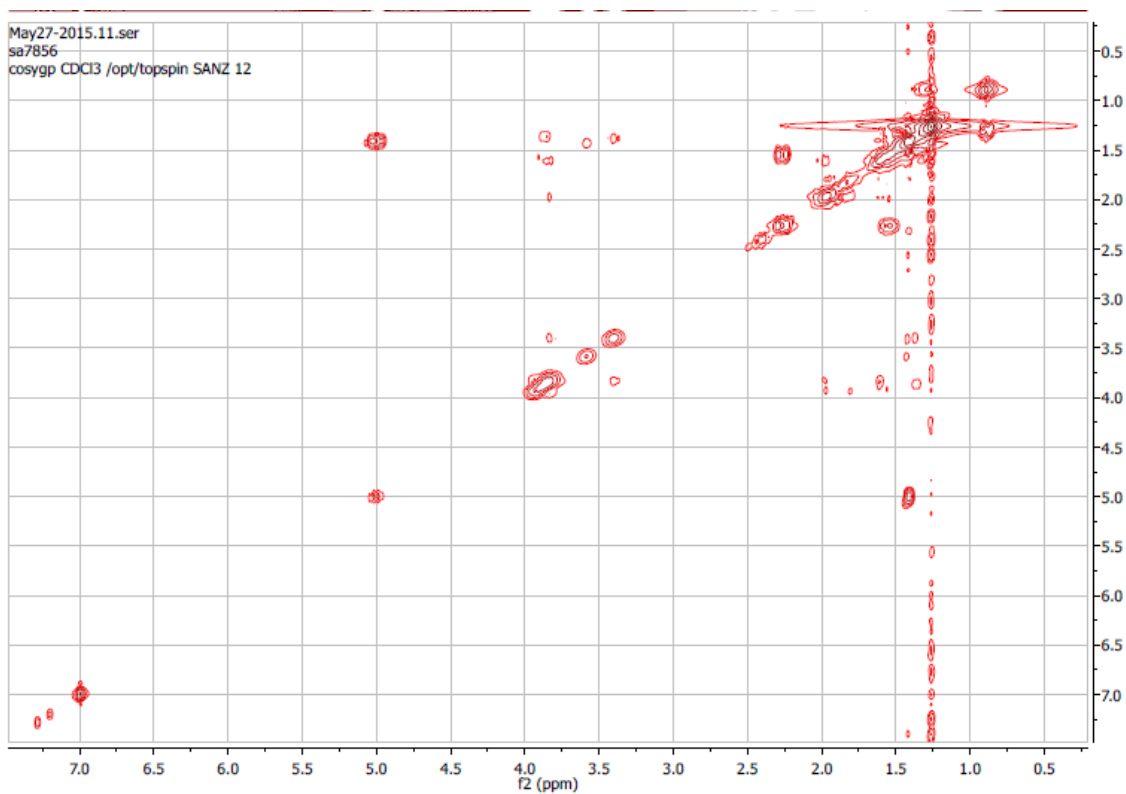


Figura 33. Mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY em CDCl_3 de **A2**.

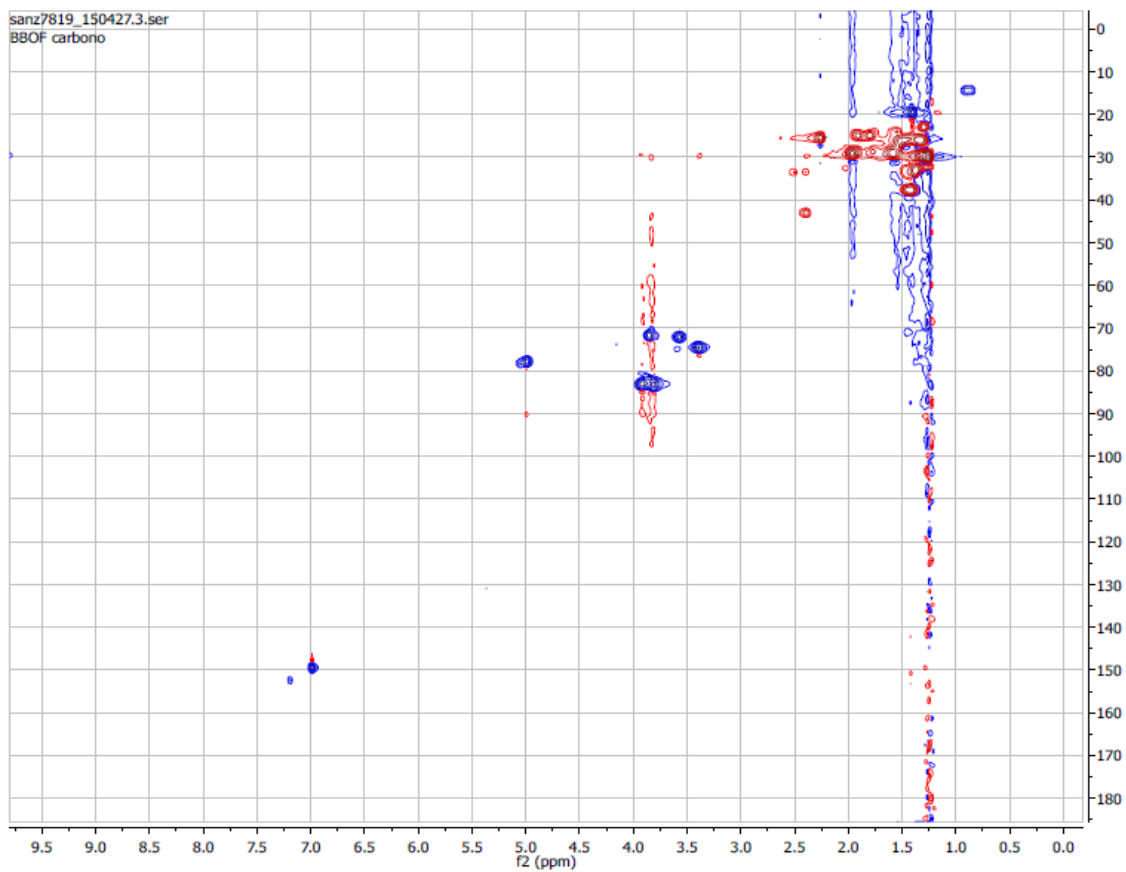


Figura 34. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de **A2**.

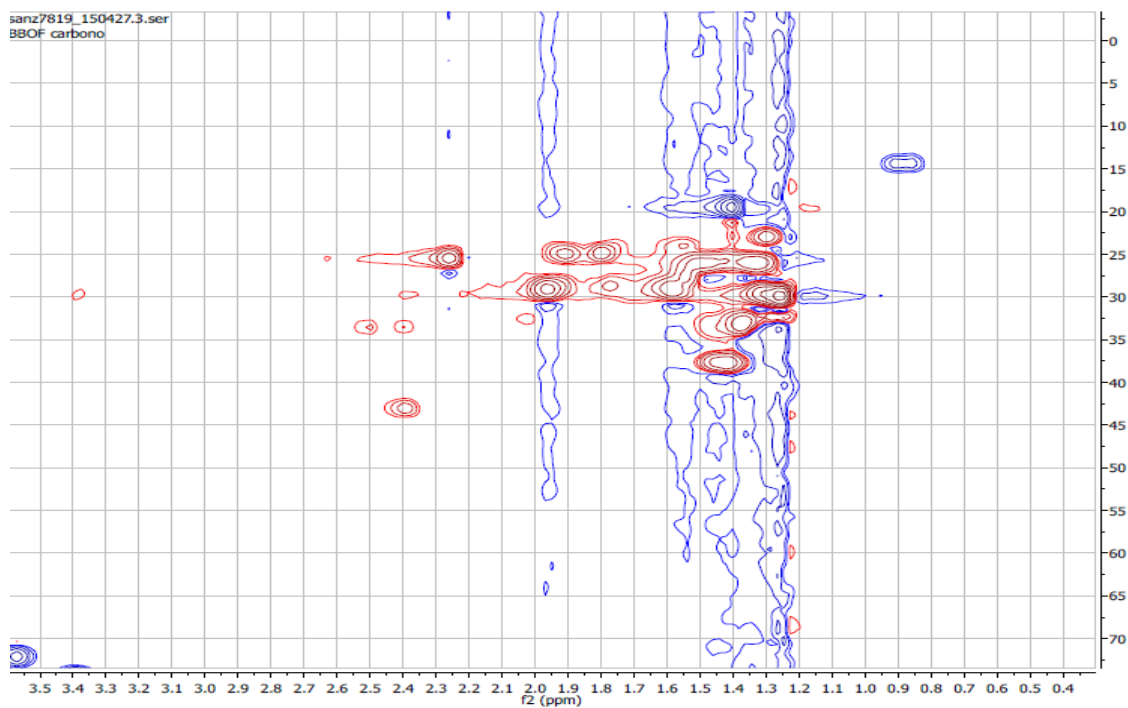


Figura 35. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de **A2**.

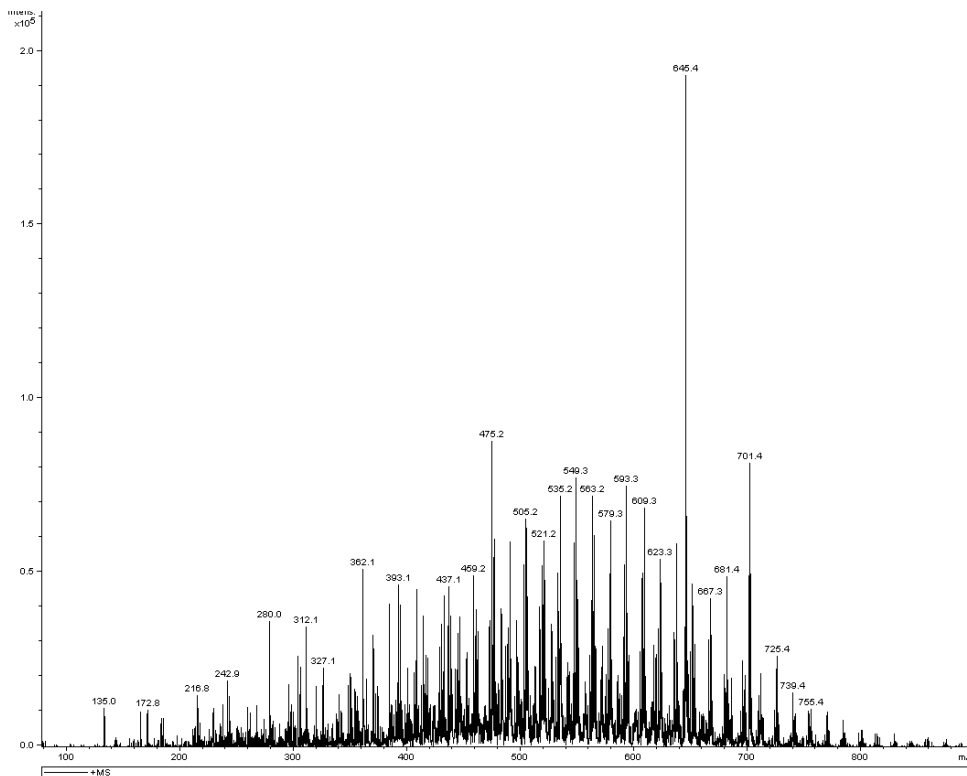
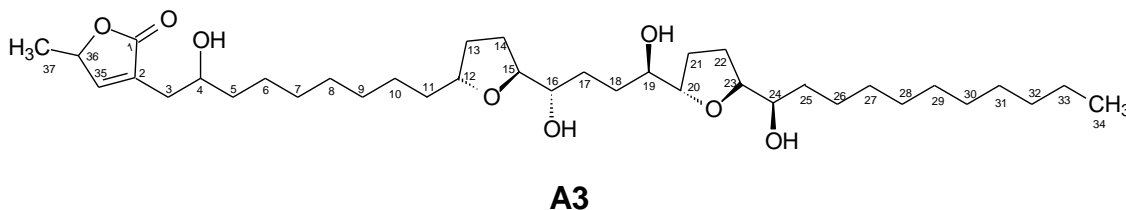


Figura 36. Espectro de massas ESI-MS de A2.

5.1.3 Identificação da substância A3



A substância **A3** presente na fração clorofórmica de *Annona dioica*, foi isolada com um aspecto de cera branca. Apresentou teste positivo para acetogeninas pela coloração rosa-violeta demonstrada em solução do reagente de Kedde, que sugere a presença do anel γ - lactônico α,β - insaturado.

Na análise do espectro na região do Infravermelho (**Figura 37**), confirma-se esta hipótese devido à existência de uma banda de absorção em $1735,1\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a presença de um grupo carbonílico de uma γ - lactona α,β -insaturada. Também, pode ser observada uma banda de absorção a $3418,0\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença do grupo hidroxila, que são característicos grupos funcionais presentes nas estruturas das acetogeninas. As absorções em $2920,4\text{ cm}^{-1}$ e $2851,4\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de ligação H-Csp³ e, a em $1058,0\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de C-O.

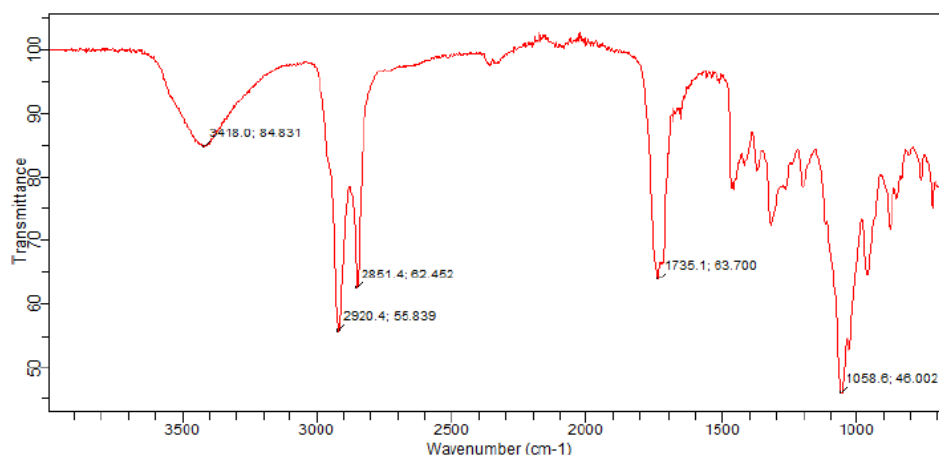


Figura 37. Espectro de infravermelho da cherimolina-1 (**A3**).

Os espectros obtidos das análises de RMN ¹H, RMN ¹³C e RMN ¹³C-DEPT (**Figuras 43-46**, p. 129-131), pareados aos dados previamente publicados na

literatura especializada, indicaram uma maior desproteção dos átomos de hidrogênio e carbono associados ao anel γ - lactônico α,β - insaturado quando comparados as substâncias **A1** e **A2** descritas anteriormente (p. 101, p. 112). Estes deslocamentos químicos são característicos das acetogeninas que apresentam um grupo hidroxila no átomo de C-4, que devido a formação de um pseudo-anel originado por uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o grupo hidroxila no átomo de C-4 e o grupo carbonila do anel γ - lactônico α,β - insaturado e, além do efeito de conjugação da α,β carbonila do anel γ - lactônico, provocam conseqüentemente uma desproteção destes átomos (**Figura 38**) (CAVÉ et al., 1997).

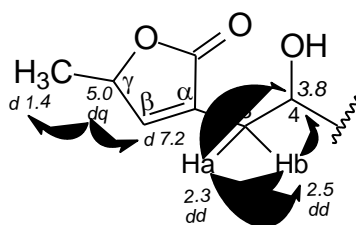


Figura 38. Deslocamentos químicos de RMN ^1H do anel γ - lactônico α,β - insaturado com hidroxila no átomo de carbono 4.

Assim, o espectro de RMN ^1H de **A3** (**Figuras 43 e 44, p. 129 e 130**), permite estabelecer a estrutura de um sistema γ -metil γ -lactona α,β -insaturada com um grupo hidroxila no átomo de C-4. Pode ser observado, a presença de um sinal integrando para um hidrogênio que aparece como um dubleto em δ_{H} 7,20, referente ao H-35 oleofínico (β) com uma constante de acoplamento $J = 1,6$ Hz com o H-36 (γ). Por outro lado, o H-36 (δ_{H} 5,08) aparece como um duplo quadrupletto, com integração para um hidrogênio, por se acoplar com o H-35 oleofínico (β) ($J_{36-35} = 1,6$ Hz) e com os hidrogênios do grupo metila CH_3 -37 ($J_{36-37} = 6,8$ Hz). Quanto ao grupo metila CH_3 -37, aparece em δ_{H} 1,43 como dupletto com uma constante vicinal de $^3J_{37-36} = 6,8$ Hz. As correlações homonucleares apresentadas no mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY (**Figura 47, p. 131**) reforçam claramente a conectividade entre esses átomos de hidrogênio.

Os deslocamentos químicos característicos das acetogeninas que apresentam um grupo hidroxila no átomo de C-4 são corroborados pela presença de um sistema ABX (CAVÉ et al., 1997). A existência do sistema ABX característico está apoiada na interpretação dos dados gerados pelo espectro de RMN ^1H (**Figuras 43 e 44, p. 129 e 130**), correspondente a dois átomos de hidrogênios não equivalentes na posição H-3a e H-3b que aparecem separadamente como um duplo duplete e um multiplete, respectivamente, sendo o H-3a em $\delta_{\text{H}} 2,39$ ($J_{3a-3b} = 15 \text{ Hz}$; $^3J_{3a-4} = 8 \text{ Hz}$) e o H-3b em $\delta_{\text{H}} 2,53$. A não equivalência dos átomos de hidrogênios em H-3 é provavelmente devido a presença desse pseudo-anel de sete membros formado. Por sua vez, o átomo de H-4 apresenta sinal em $\delta_{\text{H}} 3,86$.

A presença do grupo hidroxila no átomo de carbono 4 também é confirmado no espectro de RMN ^{13}C e RMN ^{13}C -DEPT (**Figuras 45 e 46, p. 130 e 131**) quando também observa-se a desproteção de alguns átomos de carbono do anel γ -lactônico α,β -insaturado. O sinal em $\delta_{\text{C}} 174,61$ é associado ao átomo de carbono carbonílico C-1 da lactona. O átomo de carbono oleofínico C-2 (α) apresenta deslocamento químico em $\delta_{\text{C}} 131,17$ e o C-35 $\delta_{\text{C}} 151,81$. O sinal do carbono metínico CH-36 (γ) e o carbono metílico CH₃-37, aparecem a $\delta_{\text{C}} 77,98$ e $\delta_{\text{C}} 19,11$, respectivamente. O átomo de carbono C-4, devido à presença do grupo hidroxila, apresenta sinal em $\delta_{\text{C}} 69,95$ e o átomo de C-3 agora apresenta um deslocamento químico de $\delta_{\text{C}} 33,35$, em função do substituinte na posição α , quando comparado ao átomo de C-3 das moléculas **A1** e **A2** que não apresentam o substituinte em tal posição.

Desta maneira, as atribuições dos sinais de deslocamentos químicos referentes ao anel γ -lactônico α,β -insaturado com hidroxila no átomo de carbono 4 foram confirmados através do mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figuras 48 e 49, p. 132**).

A identificação de um sistema bis-THF não adjacente é sugerido pela presença de três sinais observados do espectro RMN ^{13}C e RMN ^{13}C -DEPT (**Figuras 45 e 46, p. 130 e 131**) entre $\delta_{\text{C}} 81-84$ referentes aos átomos de carbonos do sistema THF que estão perto dos grupos CH-OH e por um sinal em $\delta_{\text{C}} 79$, que é típico de um átomo de carbono que não está α -substituído. A

Figura 39, ilustra este tipo mais frequente de aparição do sistema bis-THF não-adjacente, que é caracterizado por dois anéis THF não-adjacentes separados por dois grupos metilênicos, possuindo um átomo de carbono hidroxilado na posição α entre os dois anéis THF e, um segundo anel THF com padrão de substituição α, α' -dihidroxilado.

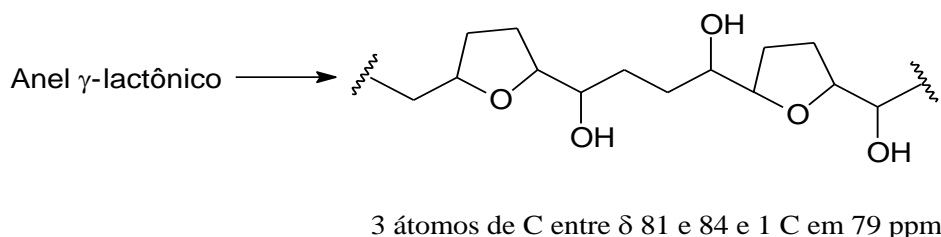


Figura 39. Características de um sistema bis-THF não-adjacente.

Assim, o sistema bis-tetrahidrofurânico não-adjacente foi sugerido pela presença dos quatro sinais em δ_C 81,99 (CH-15), δ_C 83,31 (CH-20), δ_C 82,22 (CH-23) e de um sinal típico na região de δ_C 79, em δ_C 79,33 (CH-12). Os três átomos de carbonos carbinólicos em δ_C 74,56 (CH-16), δ_C 74,45 (CH-19), δ_C 71,54 (CH-24), são observados do espectro RMN ^{13}C (**Figuras 45 e 46, p. 130 e 131**) em consonância com os sinais correspondentes aos átomos de hidrogênios observados no espectro RMN 1H (**Figuras 43 e 44, p. 129 e 130**) em δ_H 3,86 (m, H-12, H-15, H-20, H-23 e H-24), δ_H 3,42 (m, H-16) e δ_H 3,42 (m, H-19). As correlações observadas no mapa de correlação HSQC (**Figuras 48 e 49, p. 132**) confirmam os deslocamentos químicos propostos.

Para estabelecer a configuração relativa do sistema bis-THF não-adjacente, foi realizada uma análise comparativa dos dados citados com modelos descritos na literatura. Os modelos de configurações encontrados com mais frequência na natureza estão apresentados na **Figura 40 (p. 126)** (CAVÉ et al., 1997;CORTES et al., 1993). Dessa forma, permitiu propor a configuração relativa do sistema bis-THF não-adjacente como sendo *trans/threo-threo/trans/erythro* para a acetogenina **A3**, semelhante à cherimolina-1.

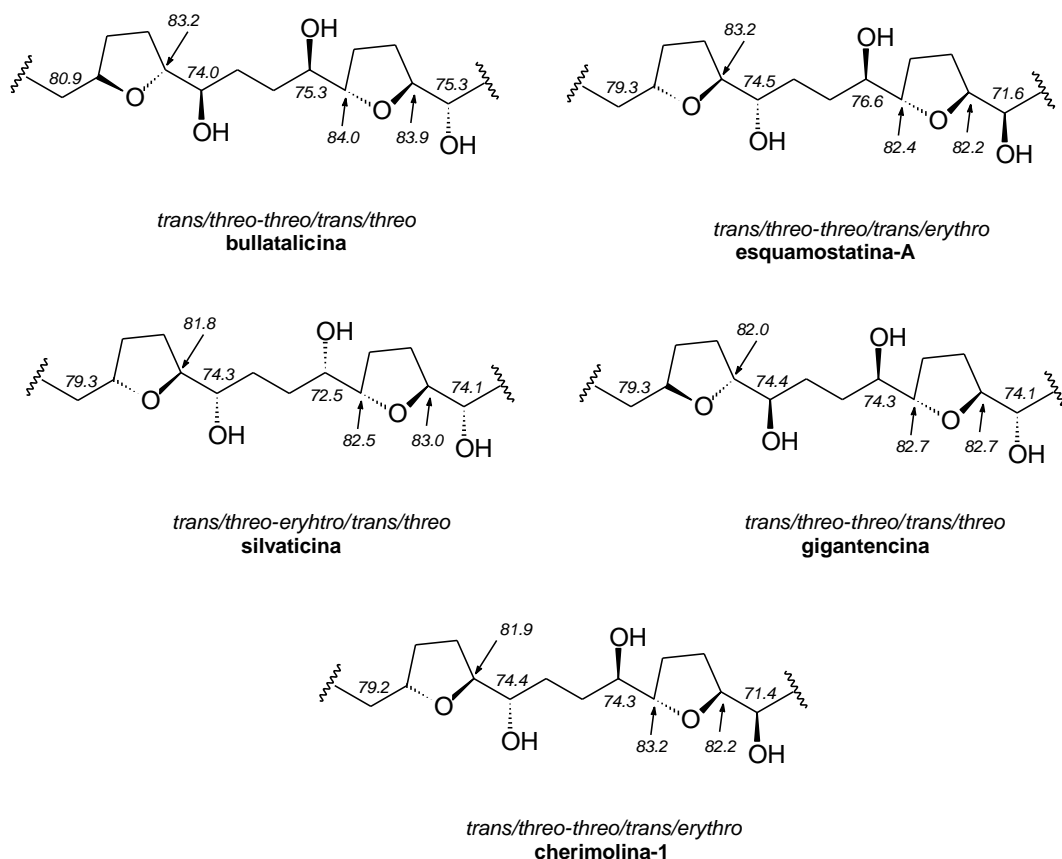
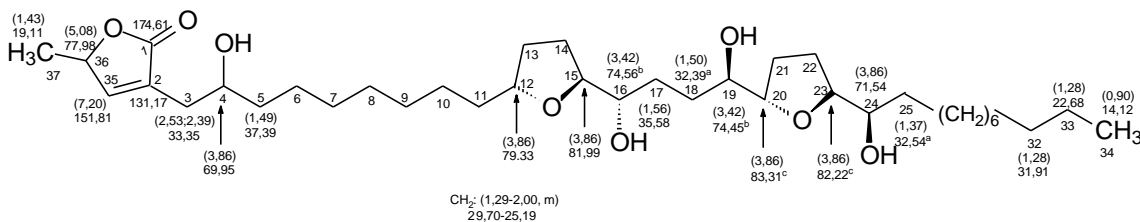


Figura 40. Modelos de configurações encontrados com mais frequência na natureza para sistemas bis-THF não-adjacentes.

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbonos, no espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 45 e 46, p. 130 e 131**), da parte não funcionalizada, estão de acordo com os dados da literatura (CH_2 -6 a CH_2 -11, CH_2 -13, CH_2 -14, CH_2 -21, CH_2 -22 e CH_2 -26 a CH_2 -31: δ_{C} 29,70-25,19). No espectro de RMN ^1H os sinais correspondentes a esses átomos de hidrogênios aparecem em δ_{H} 2,0-1,29. As demais atribuições de valores dos deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C encontram-se sumarizadas na **Tabela 26, p. 128 e Figura 41, p. 127**, e confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (**Figuras 48 e 49, p. 132**).



a,b,c pode ocorrer inversão de valores

Figura 41. Deslocamentos químicos de RMN ¹H (entre parêntesis) de RMN ¹³C da chirimolina-1 **A3**.

O espectro de massas ESI-MS (**Figura 50, p. 133**) apresentou o pico do íon molecular [M⁺Na]⁺ de *m/z* 661,4 indicando M⁺ de *m/z* 638 (638,475770 cal), consistente com a fórmula molecular C₃₇H₆₆O₈, confirmando a proposta estrutural da acetogenina **A3**. O espectro também revelou picos que podem ser justificados por íons correspondentes à perda de moléculas de água. É importante destacar que o pico em *m/z* 360,1 ([M⁺- 2H₂O]⁺) (360,25 cal) permite confirmar a posição de um anel mono-tetrahydrofurânico entre os átomos de carbonos C-19/C-24 e o pico em *m/z* 290,1 ([M⁺- 1H₂O]⁺) (290,21 cal) permite confirmar a posição de um anel mono-tetrahydrofurânico entre os átomos de carbonos C-12/C-16, propondo desta forma um sistema bis-tetrahydrofurânico não adjacente. Além disso, o pico em *m/z* 338,1 (338,22 cal) confirma a posição do grupo hidroxila na cadeia hidrocarbônica em C-16, atribuído à clivagem entre os átomos de carbonos C-16/C-17 (**Figura 42**).

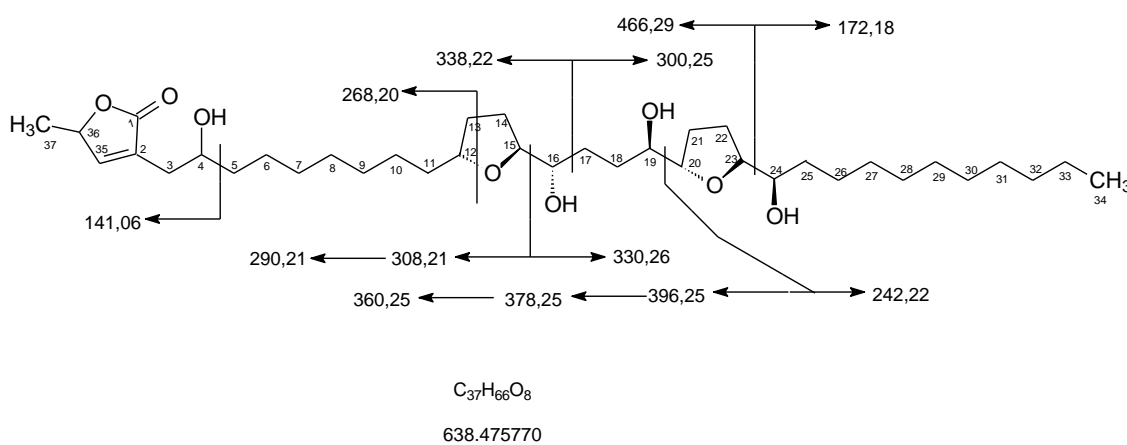


Figura 42. Proposta de fragmentação para os principais íons da chirimolina-1 (**A3**).

A comparação dos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C e RMN ^{13}C –DEPT com dados de literatura confirmou de forma inequívoca que a acetogenina **A3** trata-se da cherimolina-1, também conhecida como bullatalicina, isolada pela primeira vez das cascas das sementes de *A. cherimolia* (CORTES et al., 1984). Também, já foi encontrada nas sementes de *A. atemoya* (DURET et al., 1997).

Tabela 26. Dados de RMN ^1H (300 MHz), ^{13}C (500 MHz) da acetogenina **A3**, em CDCl_3 (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a cherimolina-1 em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (entre parêntesis) estão em Hz.

	Substância A3		Cherimolina-1 (CORTES et al., 1993)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
1	174,61	-	174,53	-
2	131,17	-	131,04	-
CH				
4	69,95	3,86 (m)	69,78	3,80 (m)
12	79,33	3,86 (m)	79,25	3,80 (m)
15	81,99	3,86 (m)	81,93	3,80 (m)
16	74,56 ^a	3,42 (m)	74,45	3,40 (m)
19	74,45 ^a	3,42 (m)	74,33	3,40 (m)
20	83,31 ^b	3,86 (m)	83,26	3,80 (m)
23	82,22 ^b	3,86 (m)	82,19	3,80 (m)
24	71,54	3,86 (m)	71,46	3,80 (m)
35	151,81	7,20 (d, J=1,6)	151,75	7,16 (d)
36	77,98	5,00 (dq, J=1,6/6,8)	77,88	5,02 (dq)
CH₂				
3a	33,35	2,39 (dd, J=15/8)	33,19	2,37 (dd)
3b		2,53 (m)		2,49 (m)
5	37,39	1,49 (m)	37,27	3,80 (m)
6-11	29,70-25,19	2,0-1,29 (m)	29,52-24,43	1,94-1,24 (m)
13-14	29,70-25,19	2,0-1,29 (m)	29,52-24,43	1,94-1,24 (m)
17	35,58	1,56 (m)	35,49	1,94-1,24 (m)
18	32,39 ^c	1,50 (m)	32,27	1,94-1,24 (m)
21-22	29,70-25,19	2,0-1,29 (m)	29,52-24,43	1,94-1,24 (m)
25	32,54 ^c	1,37 (m)	32,44	1,94-1,24 (m)

26-31	29,70-25,19	2,0-1,29 (m)	29,52-24,43	1,94-1,24 (m)
32	31,91	1,28 (m)	31,80	1,94-1,24 (m)
33	22,68	1,28 (m)	22,57	1,94-1,24 (m)
CH₃				
34	14,12	0,90 (t, J=7,1)	14,01	0,86 (t)
37	19,11	1,43 (d, J=6,8)	18,99	1,40 (d)

^{a,b,c} pode ocorrer inversão de valores

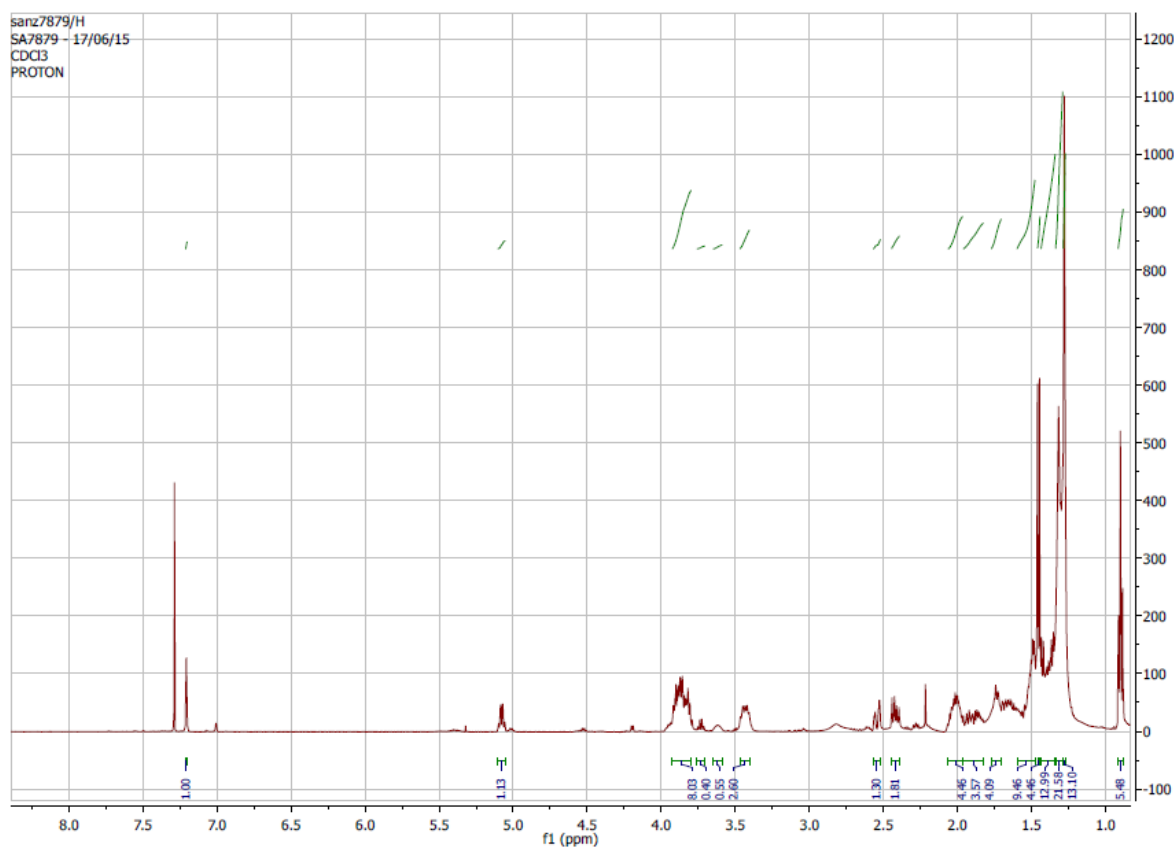


Figura 43. Espectro de RMN ¹H (300 MHz) em CDCl₃ de **A3**.

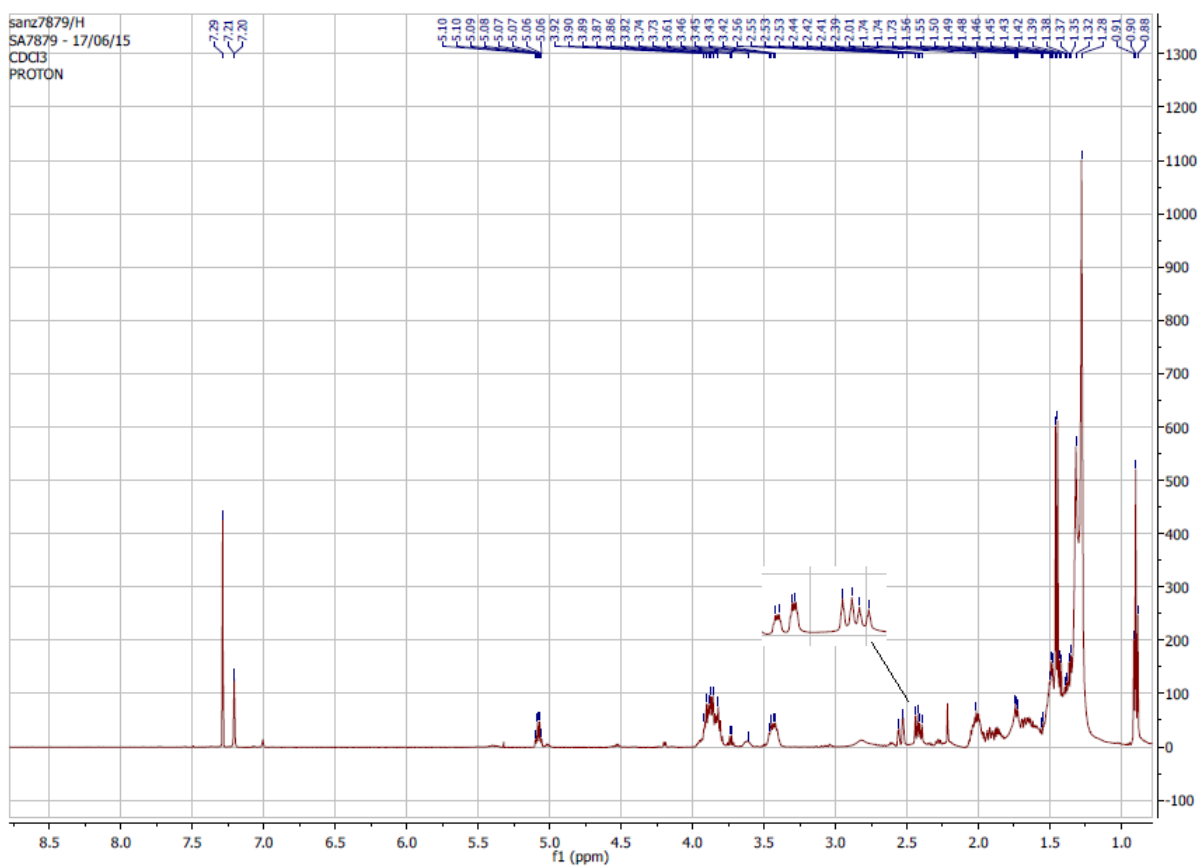


Figura 44. Espectro de RMN ¹H (300 MHz) em CDCl₃ de A3.

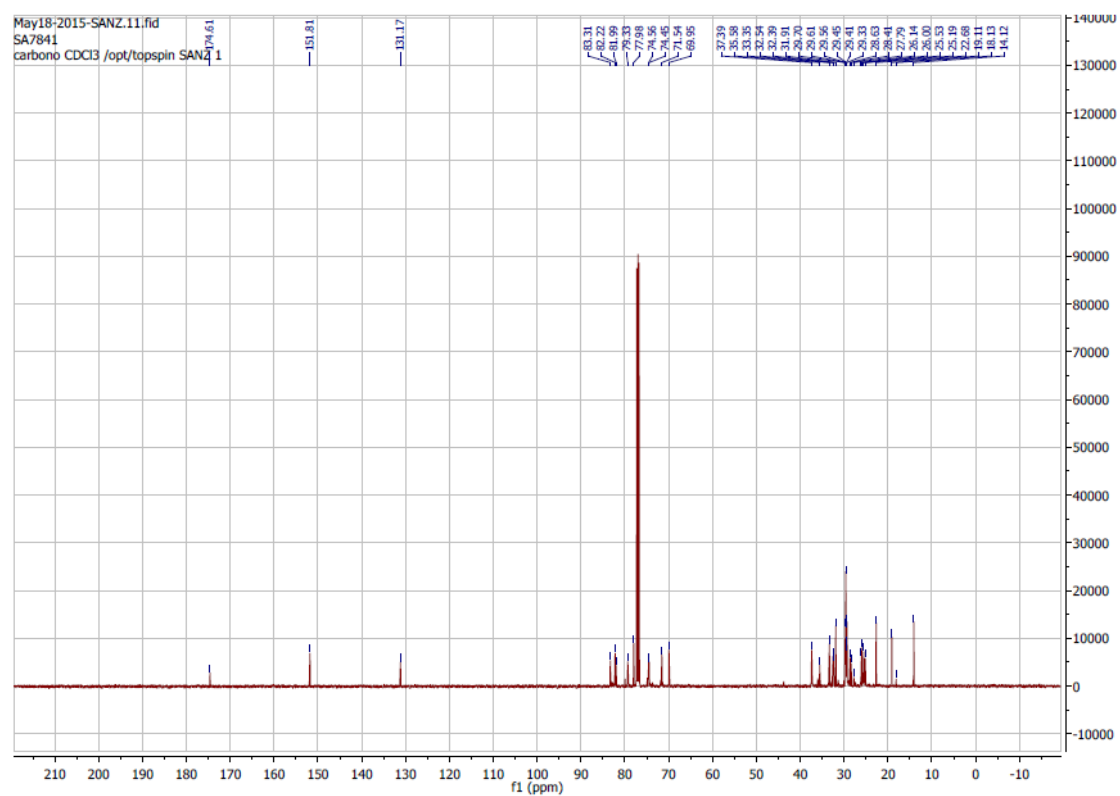


Figura 45. Espectro de RMN ¹³C (500 MHz) em CDCl₃ de A3.

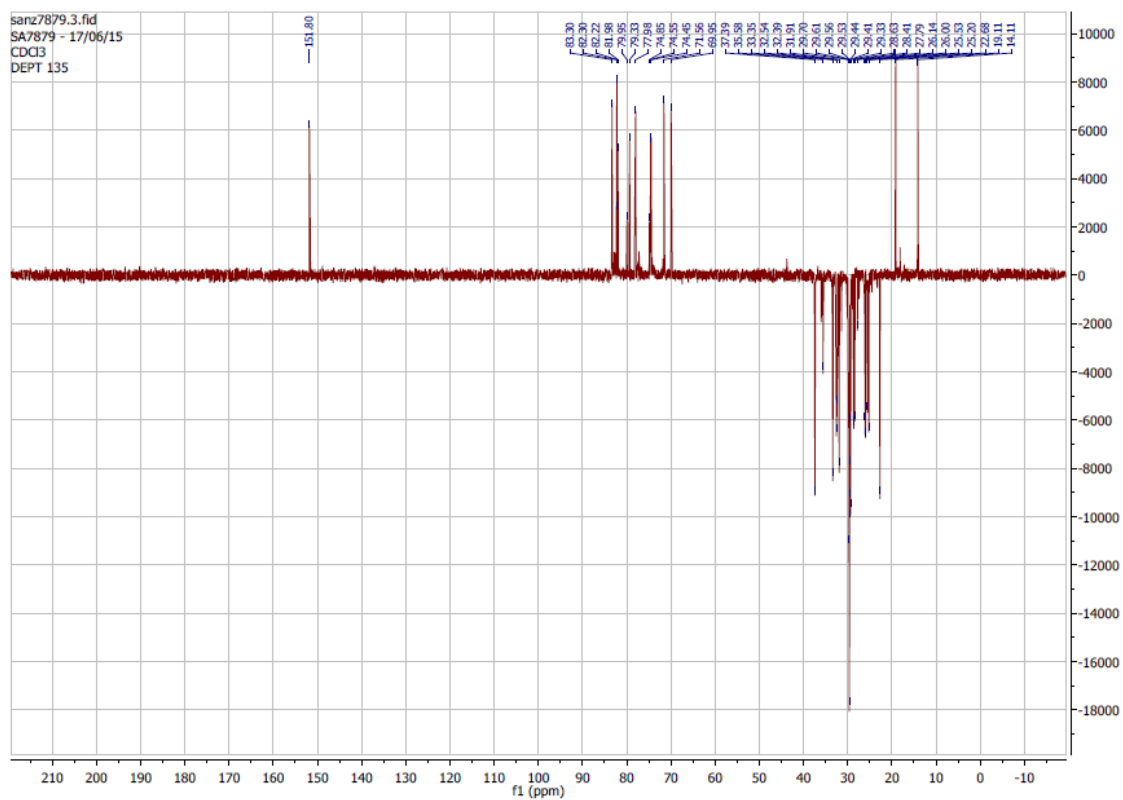


Figura 46. Espectro DEPT 135 (500 MHz) em CDCl₃ de A3.

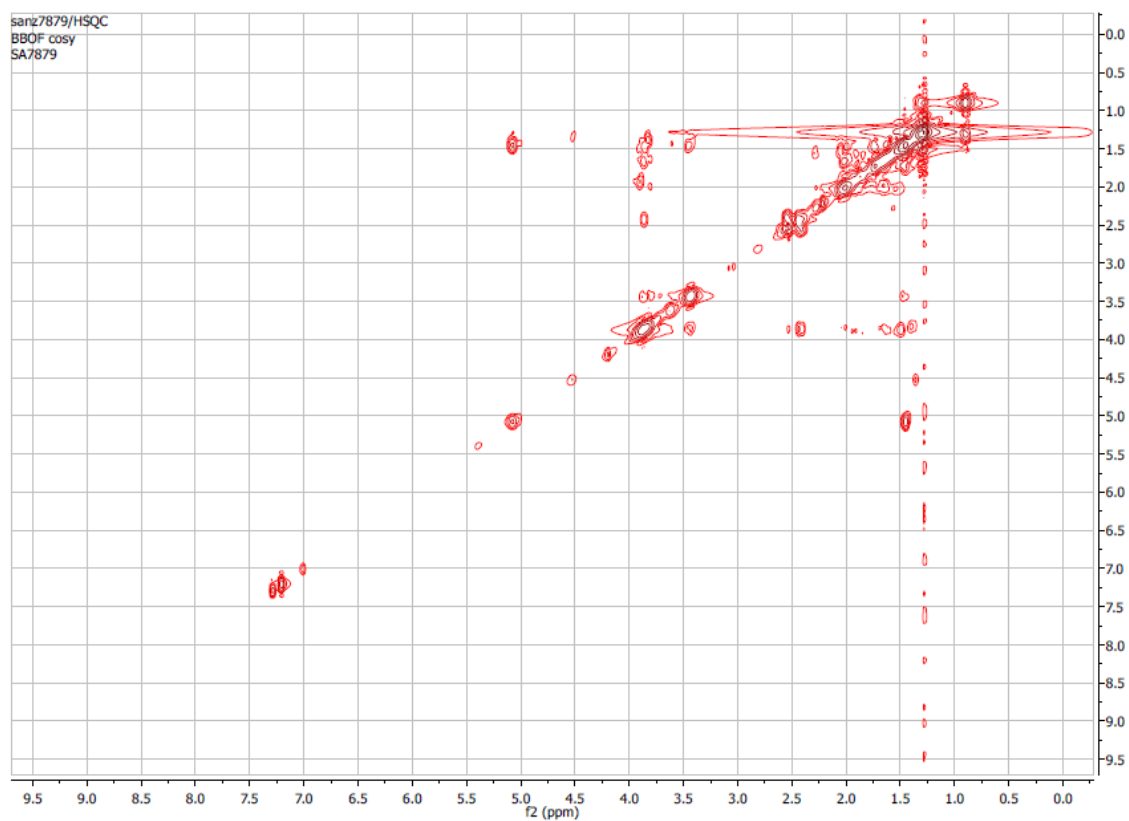


Figura 47. Mapa de correlação ¹H-¹H-COSY em CDCl₃ de A3.

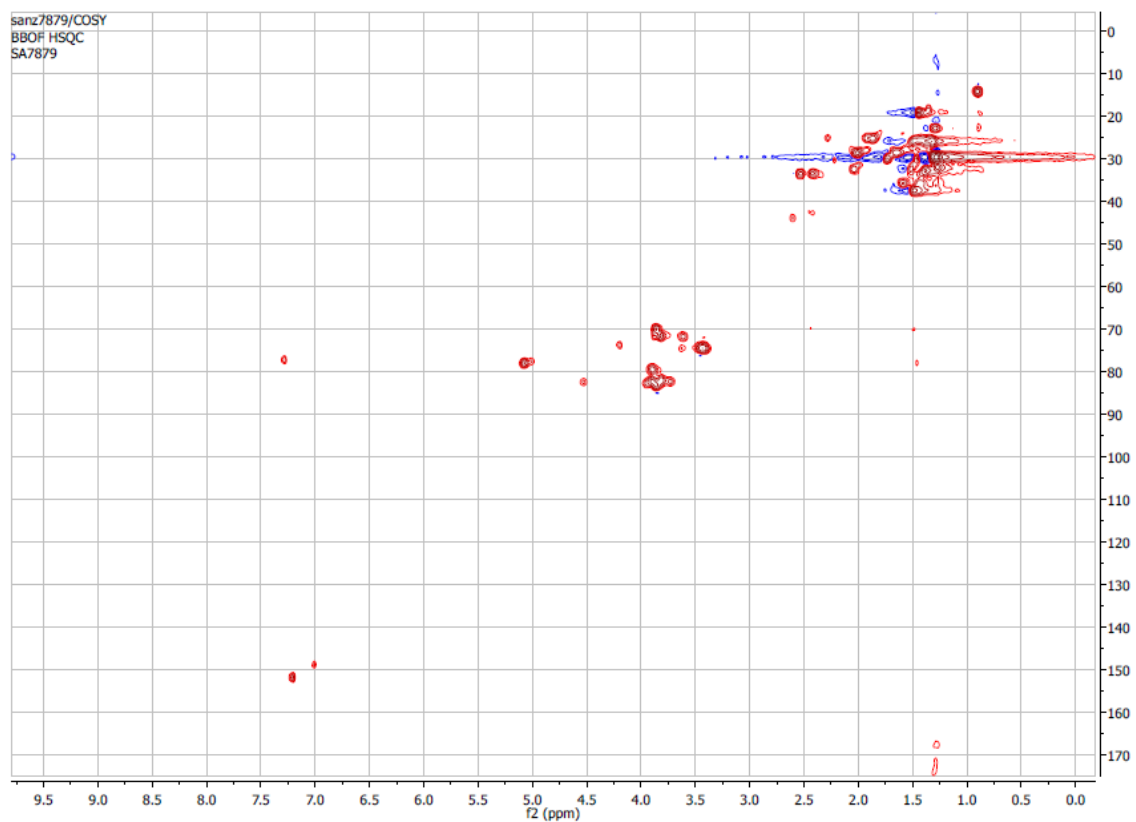


Figura 48. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de **A3**.

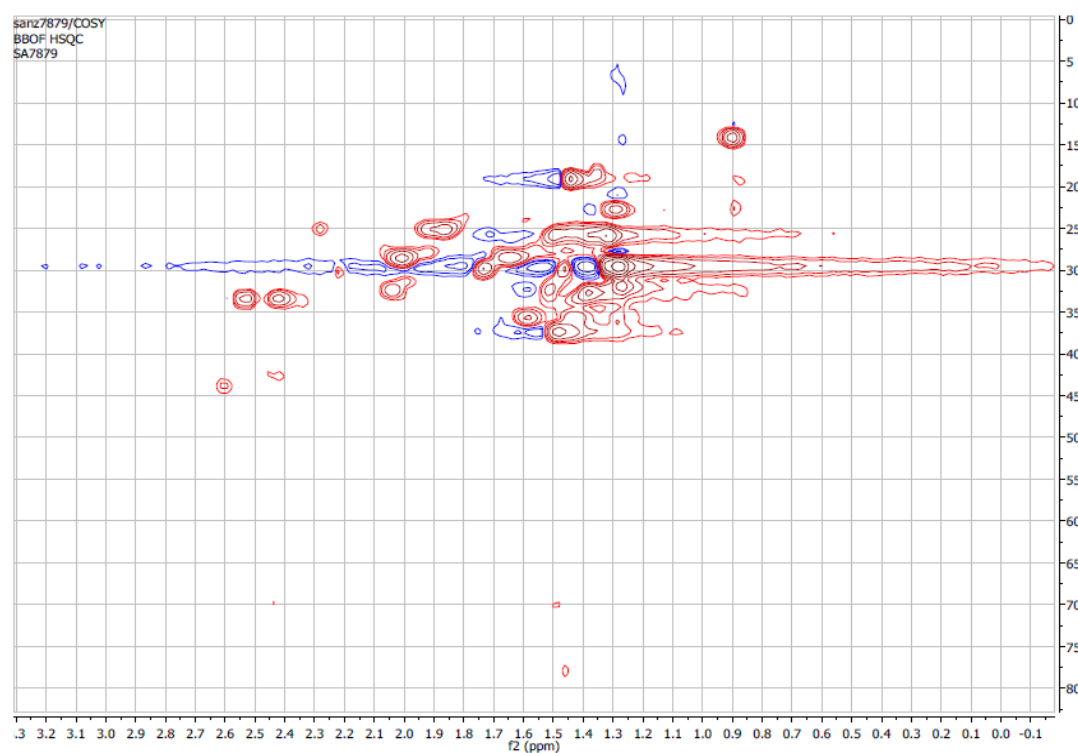


Figura 49. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de **A3**.

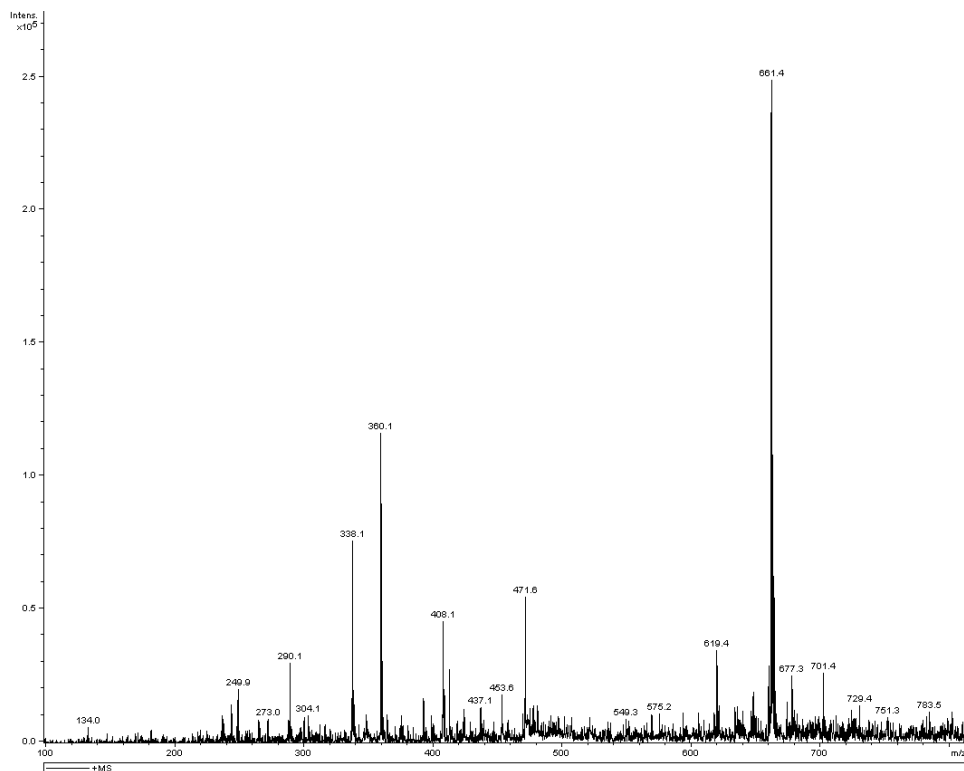
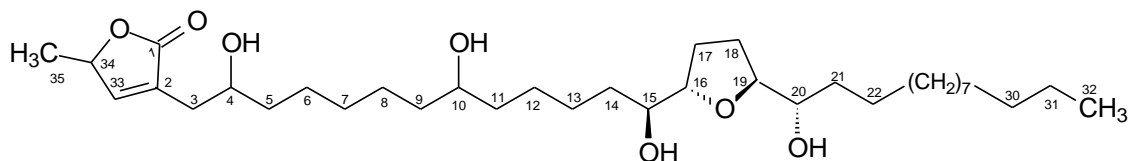


Figura 50. Espectro de massas ESI-MS de **A3**.

5.1.4 Identificação da substância A4



A4

A substância **A4** presente na fração clorofórmica de *Annona dioica*, foi isolada com um aspecto de cera branca. Apresentou teste positivo para acetogeninas pela coloração rosa-violeta demonstrada em solução do reagente de Kedde, que sugere a presença do anel γ -lactônico α,β -insaturado.

Na análise do espectro na região do Infravermelho (**Figura 51**), confirma-se esta hipótese devido à existência de uma banda de absorção em $1735,1\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a presença de um grupo carbonílico de uma γ -lactona α,β -insaturada. Também, pode ser observada uma banda de absorção a $3393,7\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença do grupo hidroxila, que são característicos grupos funcionais presentes nas estruturas das acetogeninas. As absorções em $2918,5\text{ cm}^{-1}$ e $2848,5\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de ligação H-Csp^3 e, a em $1069,7\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de C-O.

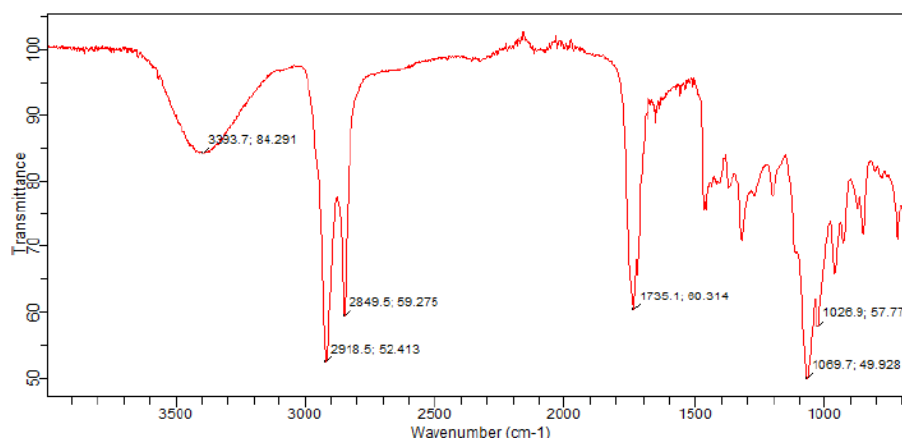


Figura 51. Espectro de infravermelho da annonacina (**A4**).

Nos espectros obtidos das análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C -DEPT (**Figuras 55-57, p. 140 e 141**), comparados aos dados previamente publicados na literatura, são observados deslocamentos químicos característicos das acetogeninas que apresentam um anel γ - lactônico α,β - insaturado associado com grupo hidroxila no átomo de C-4. Cabe destacar, que neste caso ocorre uma maior desproteção dos átomos de hidrogênio e carbono associados ao anel γ - lactônico devido a formação de um pseudo-anel originado por uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o grupo hidroxila no átomo de C-4 e o grupo carbonila do anel γ - lactônico α,β - insaturado, quando comparados a um sistema de anel γ - lactônico α,β - insaturado não associado com grupo hidroxila no átomo de C-4 (CAVÉ et al., 1997).

Assim, o espectro de RMN ^1H de **A4 (Figuras 55 e 56, p. 140 e 141)**, permite estabelecer com exatidão a estrutura de um sistema γ -metil γ -lactona α,β -insaturada com um grupo hidroxila no átomo de C-4. Pode ser observado, a presença de um sinal integrando para um hidrogênio que aparece como um duplete em δ_{H} 7,12, referente ao H-33 oleofínico (β) com uma constante de acoplamento $^3J = 1,6$ Hz com o H-34 (γ). Por outro lado, o H-34 aparece como um duplo quadruplete, integrando para um hidrogênio em δ_{H} 5,00, por se acoplar com o H-33 oleofínico (β) ($^3J_{34-33} = 1,6$ Hz) e com os hidrogênios do grupo metila CH_3 -35 ($J_{34-35} = 6,8$ Hz). Quanto ao grupo metila CH_3 -35, aparece em δ_{H} 1,36 como duplete com uma constante vicinal de $^3J_{35-34} = 6,8$ Hz.

Os deslocamentos químicos característicos das acetogeninas que apresentam um grupo hidroxila no átomo de C-4 são corroborados pela presença de um sistema ABX (CAVÉ et al., 1997). A existência do sistema ABX característico está apoiada na interpretação dos dados gerados pelo espectro de RMN ^1H (**Figuras 55 e 56, p. 140 e 141**), correspondente a dois átomos de hidrogênios não equivalentes na posição H-3a e H-3b que aparecem separadamente como um duplo duplete e um multiplete, respectivamente, sendo o H-3a em δ_{H} 2,34 ($J_{3a-3b} = 14$ Hz; $^3J_{3a-4} = 7,1$ Hz) e o H-3b em δ_{H} 2,47. A não equivalência dos átomos de hidrogênios em H-3 é provavelmente devido a presença desse pseudo-anel de sete membros formado. Por sua vez, o átomo de H-4 apresenta sinal em δ_{H} 3,78 como um multiplete.

A presença do grupo hidroxila no átomo de carbono 4 também é confirmado no espectro de RMN ^{13}C -DEPT (**Figura 57, p. 141**) quando observa-se a desproteção de alguns átomos de carbono do anel γ - lactônico α,β - insaturado. O sinal em δ_{C} 174,5 é associado ao átomo de carbono carbonílico C-1 da lactona. O átomo de carbono oleofínico C-2 (α) apresenta deslocamento químico em δ_{C} 131,0 e o C-3 δ_{C} 151,88. O sinal do carbono metínico CH-34 (γ) e o carbono metílico CH₃-35, aparecem em δ_{C} 78,02 e δ_{C} 19,11, respectivamente. O átomo de carbono C-4, devido a presença do grupo hidroxila, apresenta sinal em δ_{C} 69,92 e o átomo de C-3 agora apresenta um deslocamento químico em δ_{C} 33,46, em função do substituinte na posição α .

Desta maneira, as atribuições dos sinais de deslocamentos químicos referentes ao anel γ - lactônico α,β - insaturado com hidroxila no átomo de carbono 4 foram confirmados através do mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figuras 58 e 59, p. 142**).

A identificação de um sistema mono THF é sugerido pela presença de dois sinais observados do espectro RMN ^{13}C -DEPT (**Figura 57, p. 141**) entre δ_{C} 81-83. E o padrão de substituição α , α' -dihidroilado é proposto pela existência de dois sinais entre δ_{C} 73-76 (CAVÉ et al., 1997). Assim, os sinais em δ_{C} 82,59 e δ_{C} 82,67 foram atribuídos aos dois átomos de carbono CH-16 e CH-19, respectivamente. Os sinais dos dois carbonos carbinólicos em δ_{C} 74,11 (CH-15) e δ_{C} 74,01 (CH-20) podem ser observados do espectro RMN ^{13}C -DEPT (**Figura 57, p. 141**). Em consonância, os sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio observados no espectro RMN ^1H (**Figuras 55 e 56, p. 140 e 141**) em δ_{H} 3,72 (m, H-16 e H-19) e δ_{H} 3,34 (m, H-15 e H-20). As correlações observadas no mapa de correlação HSQC (**Figuras 58 e 59, p. 142**) confirmam os deslocamentos químicos propostos.

Para estabelecer a configuração relativa do sistema mono-THF, foi realizada uma análise comparativa dos dados citados com modelos descritos na literatura. Os modelos de configurações encontrados com mais frequência na natureza estão apresentados na **Figura 52 (p. 137)** (CAVÉ et al., 1997; BORN et al., 1990). Dessa forma, permitiu propor a configuração relativa do

anel mono-THF como sendo *threo/trans/threo* para a acetogenina **A4**, semelhante à annonacina.

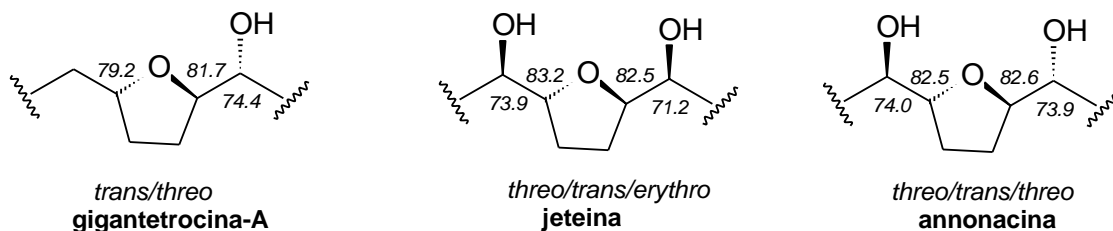


Figura 52. Modelos de configurações encontrados com mais frequência na natureza para sistemas mono-THF.

Para confirmar a presença do grupo funcional hidroxila ao longo da cadeia hidrocarbônica, na análise do espectro de RMN ^{13}C observou-se a presença de mais um sinal na região onde se situam os carbonos hidroxilados da cadeia alifática, entre δ_{C} 67 e 74 (CAVÉ et al., 1997). Refere-se ao sinal em δ_{C} 71,75 (CH-10) e, no espectro de RMN ^1H o átomo de hidrogênio correspondente aparece como um multiplete integrando para um hidrogênio em δ_{H} 3,53.

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbonos, no espectro de RMN ^{13}C -DEPT (**Figura 57, p. 141**), da parte não funcionalizada, estão de acordo com os dados da literatura (CH₂-6 a CH₂-8 e CH₂-23 a CH₂-29: δ_{C} 29,67-29,36; CH₂-17 e CH₂-18: δ_{C} 28,78). No espectro de RMN ^1H os sinais correspondentes a esses átomos de hidrogênios aparecem em δ_{H} 1,26-1,19; δ_{H} 1,92-1,60, respectivamente. As demais atribuições de valores dos deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C encontram-se sumarizadas na **Tabela 27, p. 139** e **Figura 53, p. 138**, e confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (**Figuras 58 e 59, p. 142**).

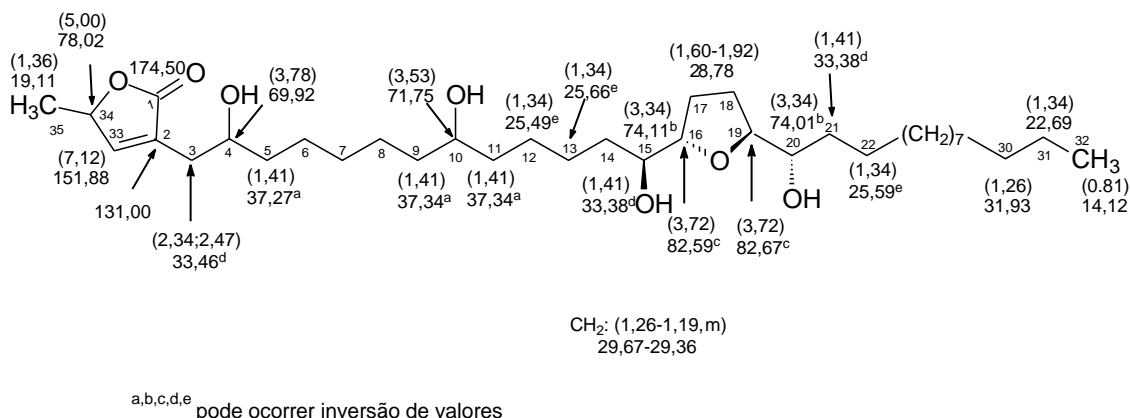


Figura 53. Deslocamentos químicos de RMN ¹H (entre parêntesis) de RMN ¹³C da annonacina (**A4**).

O espectro de massas ESI-MS (**Figuras 60 e 61, p. 143**) apresentou o pico do íon molecular [M⁺Na]⁺ de *m/z* 619,5 indicando M⁺ de *m/z* 596 (596,465205 cal), consistente com a fórmula molecular C₃₅H₆₄O₇, confirmando a proposta estrutural da acetogenina **A4**. O espectro também revelou picos que podem ser justificados por íons correspondentes à perda de moléculas de água. É importante destacar que o pico em *m/z* 327,2 (326,1 cal) permite confirmar a posição do anel mono-tetrahydrofurânico entre os átomos de carbonos C-15/C-20. Além disso, o pico em *m/z* 242,1 (241,18 cal) confirma a posição do grupo hidroxila na cadeia hidrocarbônica em C-10, atribuído à clivagem entre os átomos de carbonos C-10/C-11. A presença do grupo hidroxila no átomo de carbono C-4 também pode ser confirmada pelo pico em *m/z* 142,0 (142,06 cal) (**Figura 54**).

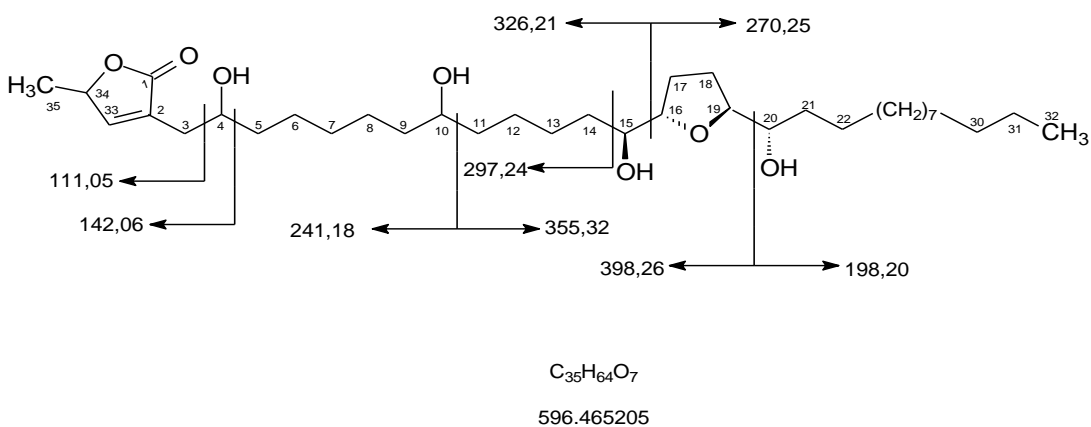


Figura 54. Proposta de fragmentação para os principais íons da annonacina (**A4**).

A comparação dos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C -DEPT com dados de literatura confirmou de forma inequívoca que a acetogenina **A4** trata-se da annonacina, isolada pela primeira vez das cascas do caule de *A. densicoma* (MCCLLOUD et al., 1987). Também, já foi encontrada nas sementes de *A. muricata*, sementes de *A. montana*, sementes de *A. senegalenses*, sementes de *A. glauca*, sementes de *A. glabra*. Também, há registros do isolamento da annonacina em outros gêneros da família Annonaceae como nas raízes de *Goniothalamus undulatus* e nas sementes de *Asimina triloba* (MYINT et al., 1991; JOSSANG et al., 1991; LIAW et al., 2004b; SAPHAZ et al., 1996; WAECHTER, et al., 1997; GALLARDO et al., 1998; TANTITHANAPORN et al., 2011; WOO et al., 1999b).

Tabela 27. Dados de RMN ^1H (300 MHz), ^{13}C -DEPT (500 MHz) da acetogenina **A4**, em CDCl_3 (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a annonacina em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (entre parêntesis) estão em Hz.

	Substância A4		Annonacina (MYINT et al., 1991)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
1	174,50	-	174,7	-
2	131,00	-	131,0	-
CH				
4	69,92	3,78 (m)	69,7	3,76 (m)
10	71,75	3,53 (m)	71,5	3,54 (m)
15	74,11 ^a	3,34 (m)	74,1	3,37 (m)
16	82,59 ^b	3,72 (m)	82,6	3,76 (m)
19	82,67 ^b	3,72 (m)	82,7	3,76 (m)
20	74,01 ^a	3,34 (m)	74,0	3,37 (m)
33	151,88	7,12 (d, J=1,6)	151,9	7,16 (d, J=1,6)
34	78,02	5,00 (dq, J=1,6/6,8)	78,0	5,05 (dq, J=1,6/7)
CH₂				
3a	33,46 ^c	2,34 (dd, J=14/7,1)	33,2	2,35 (dd, J=15/8)
3b		2,47 (m)		2,47 (dd, J=15/3)
5	37,27 ^d	1,41 (m)	37,2	1,42 (m)
6-8	29,67-29,36	1,26-1,19 (m)	29,6-29,7	1,24 (m)
9	37,34 ^d	1,41 (m)	37,3	1,38 (m)
11	37,34 ^d	1,41 (m)	37,3	1,38 (m)

12	25,49 ^e	1,34 (m)	25,4	1,24 (m)
13	25,66 ^e	1,34 (m)	25,6	1,24 (m)
14	33,38 ^c	1,41 (m)	33,3	1,34 (m)
17	28,78	1,92-1,60 (m)	28,8	1,94-1,60 (m)
18	28,78	1,92-1,60 (m)	28,8	1,94-1,60 (m)
21	33,38 ^c	1,41 (m)	33,1	1,34 (m)
22	25,59 ^e	1,34 (m)	25,5	1,24 (m)
23-29	29,67-29,36	1,26-1,19 (m)	29,6-29,7	1,24 (m)
30	31,93	1,26 (m)	31,9	1,24 (m)
31	22,69	1,34 (m)	22,6	1,24 (m)
CH₃				
32	14,12	0,81 (t, J=6,0)	14,1	0,85 (t, J=7,0)
35	19,11	1,36 (d, J=6,8)	19,0	1,40 (d, J=7,0)

a,b,c,d, e pode ocorrer inversão de valores

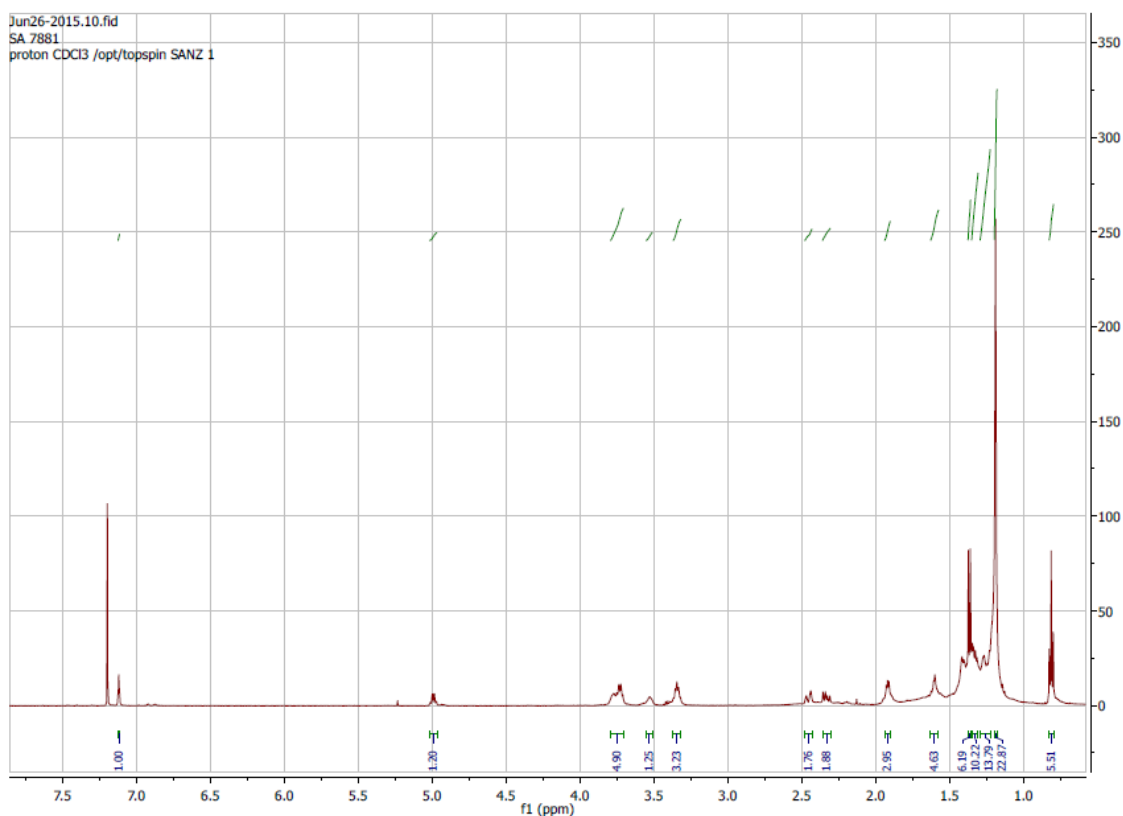


Figura 55. Espectro de RMN ¹H (300 MHz) em CDCl₃ de A4.

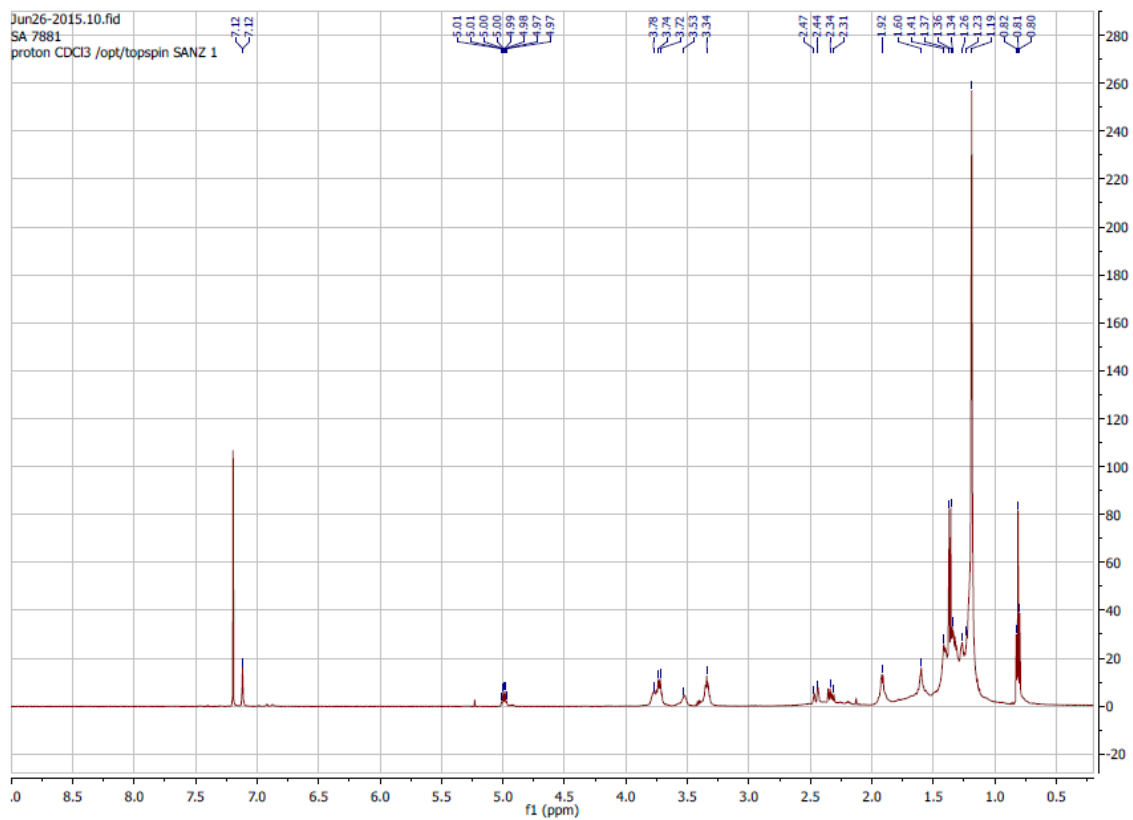


Figura 56. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de **A4**.

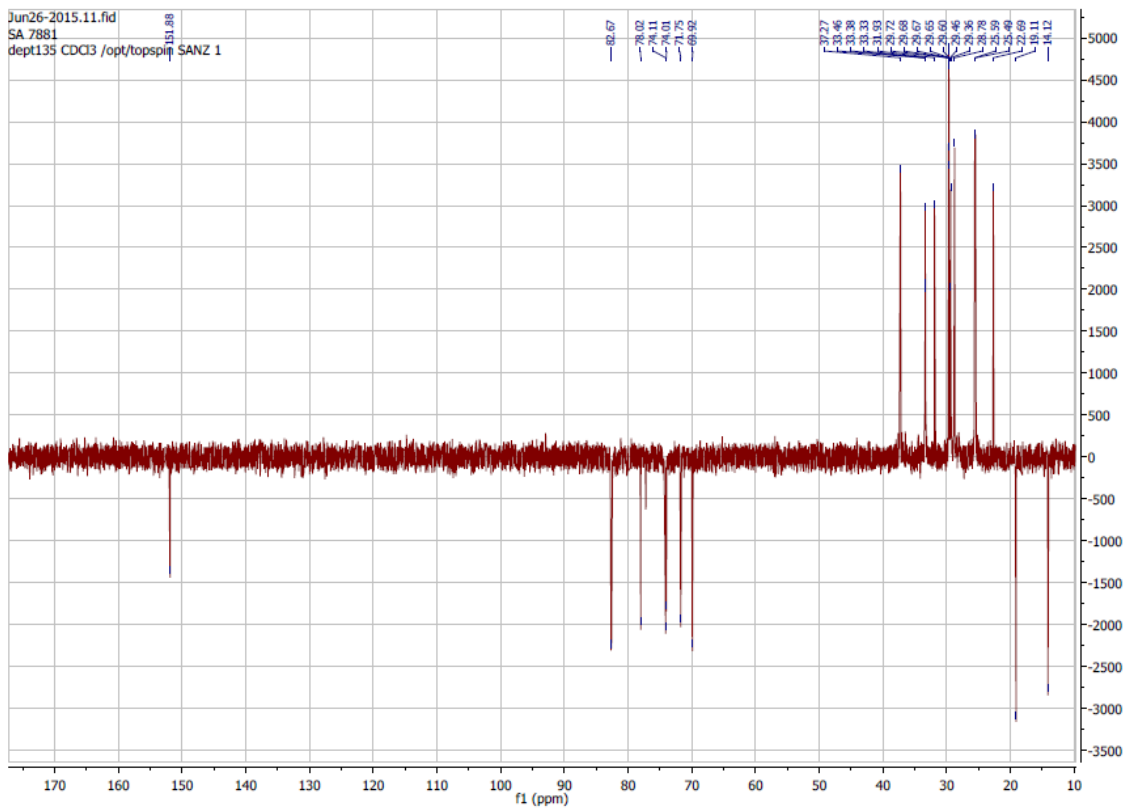


Figura 57. Espectro DEPT 135 (500 MHz) em CDCl_3 de **A4**.

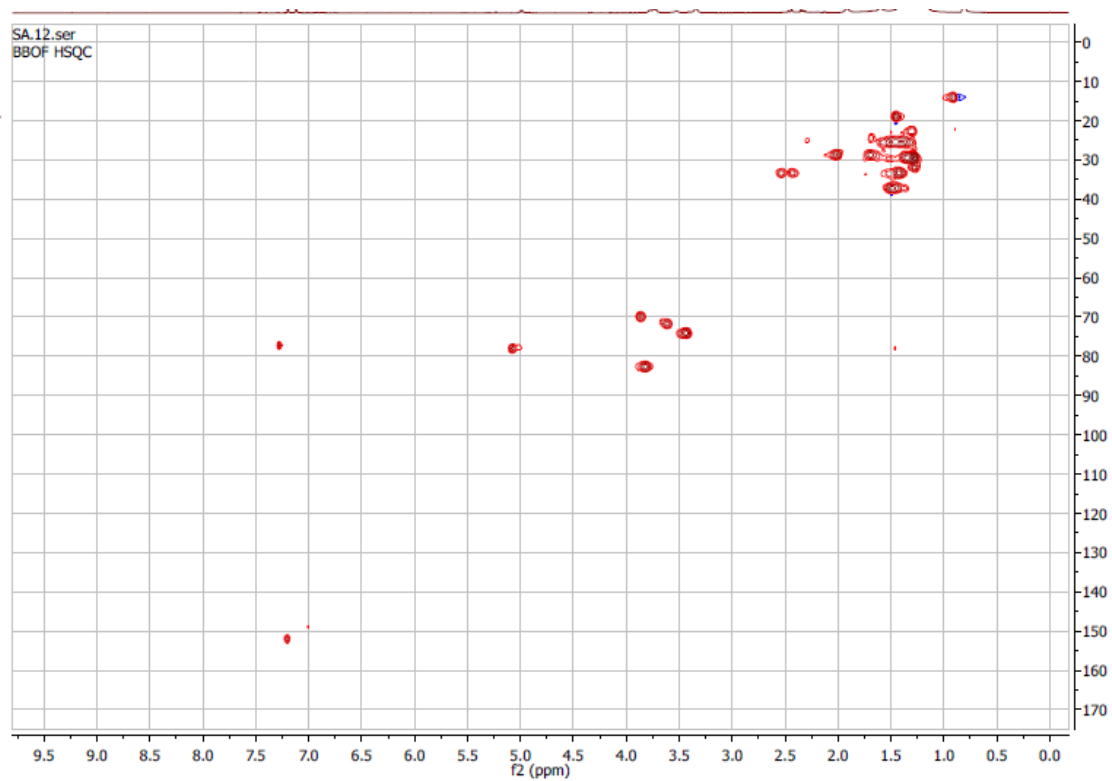


Figura 58. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de **A4**.

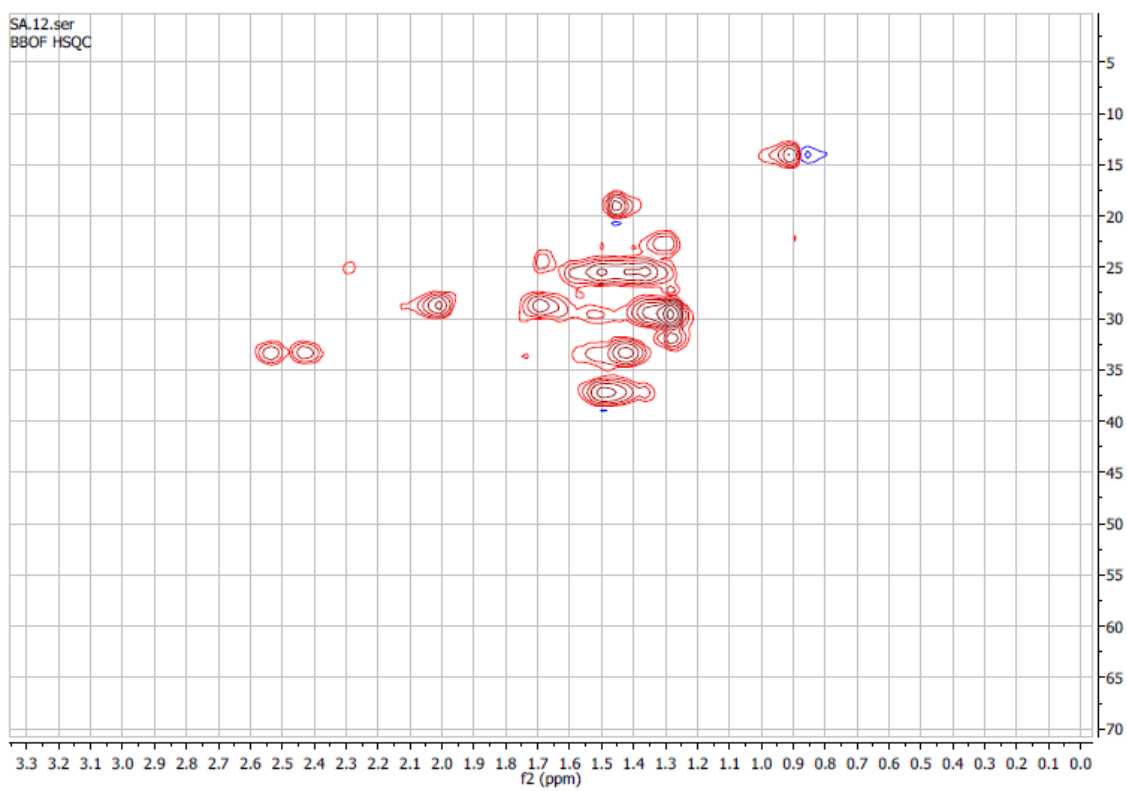


Figura 59. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de **A4**.

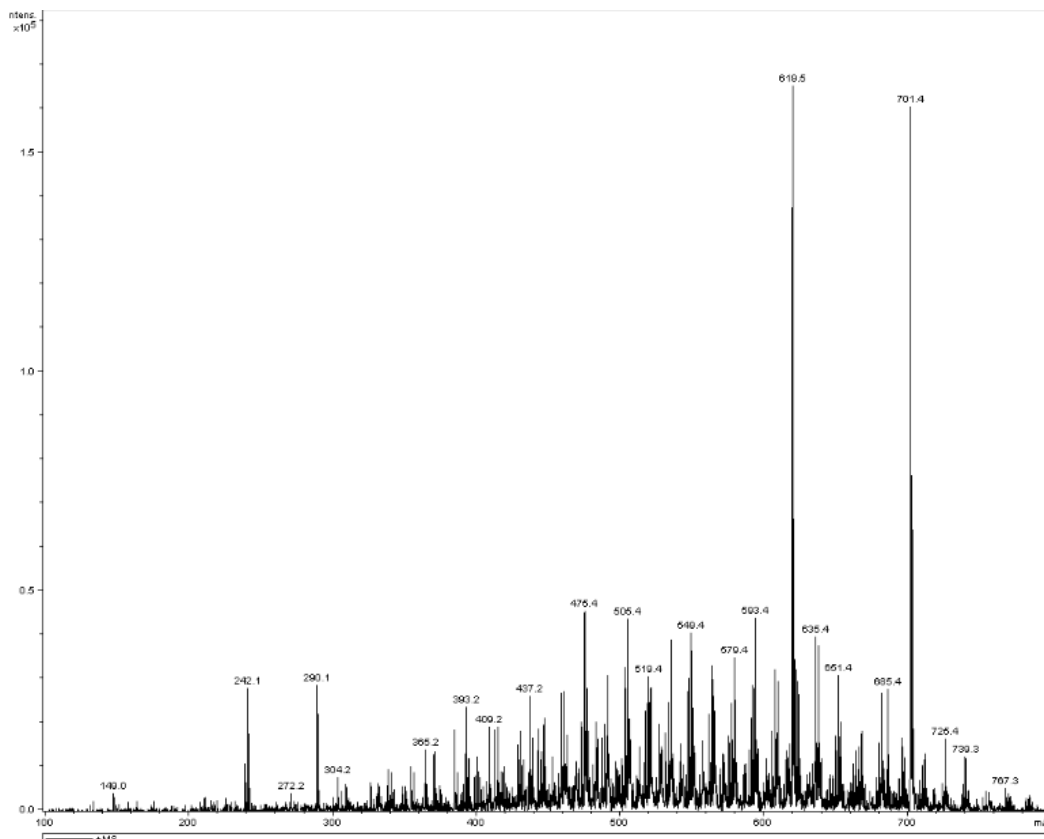


Figura 60. Espectro de massas ESI-MS de A4.

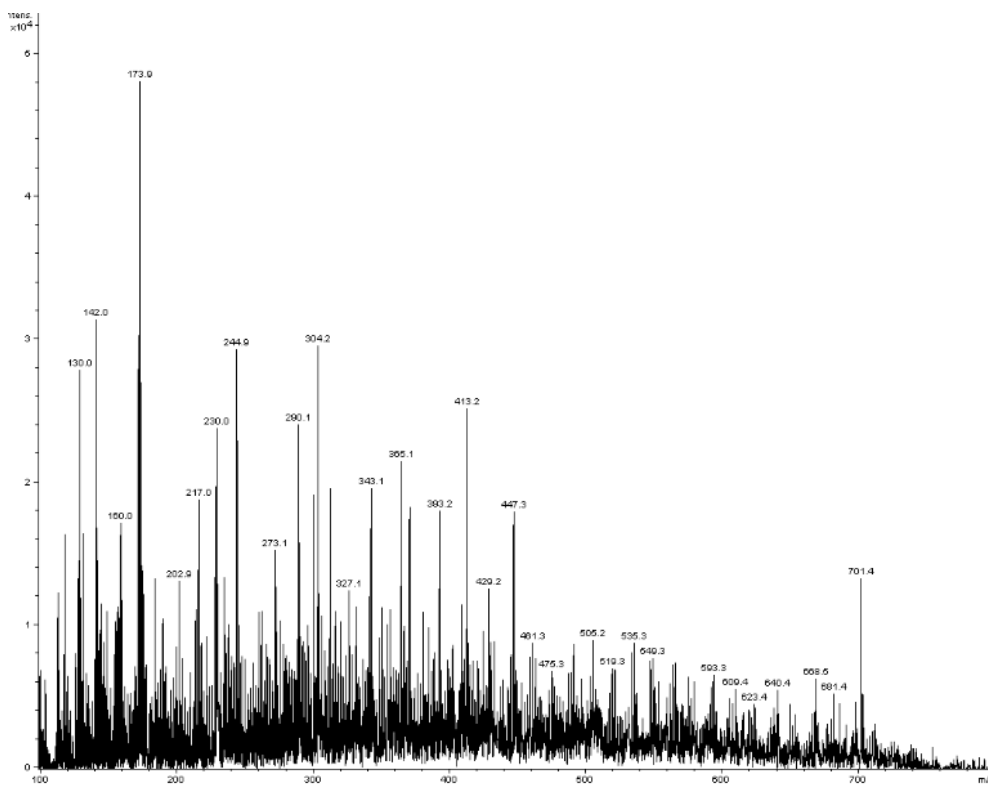
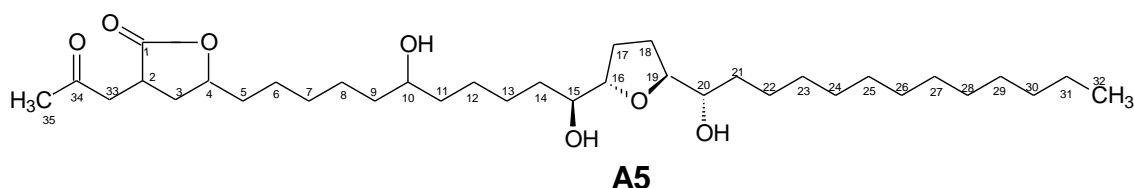


Figura 61. Ampliação do espectro de massas ESI-MS de A4.

5.1.5 Identificação da substância A5



A substância **A5** presente na fração clorofórmica de *Annona dioica*, foi isolada com um aspecto de cera incolor. Apresentou teste negativo para acetogeninas pela coloração rosa-violeta demonstrada em solução do reagente de Kedde, que sugere a ausência do anel γ -lactônico α,β -insaturado.

Na análise do espectro na região do Infravermelho (**Figura 62**), observa-se a existência de duas bandas de absorção em $1755,6\text{ cm}^{-1}$ e em $1712,7\text{ cm}^{-1}$ que corresponde à presença de dois grupos carbonílicos distintos. Também, pode ser observada uma banda de absorção a $3432,9\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença do grupo hidroxila, que são característicos grupos funcionais presentes nas estruturas das acetogeninas. As absorções em $2918,5\text{ cm}^{-1}$ e $2851,4\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de ligação H-Csp^3 e, a em $1090,2\text{ cm}^{-1}$.

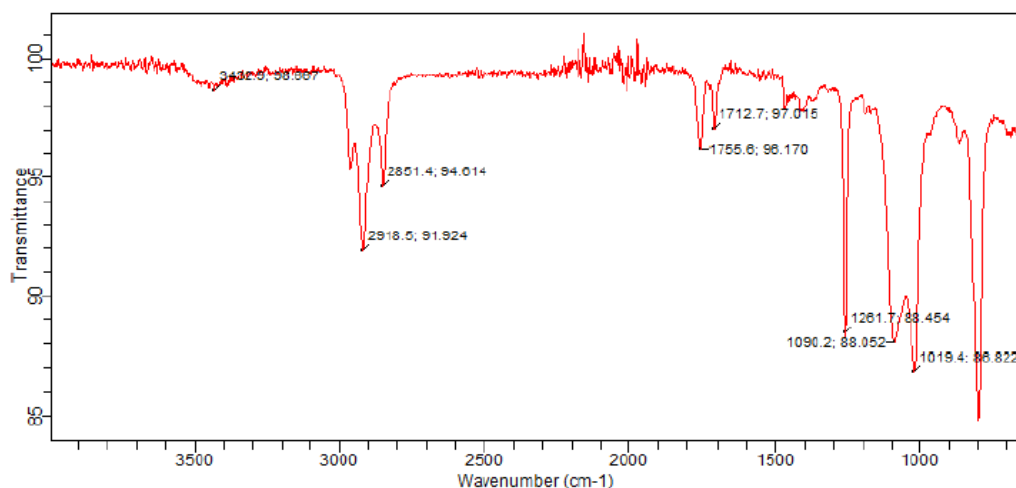


Figura 62. Espectro de infravermelho da isoannonacina (**A5**).

O espectro de RMN ^1H de **A5** (**Figuras 67-70**, p. 151-153), corrobora com os dados descritos acima e permite estabelecer com precisão a ausência da estrutura de um sistema γ -metil γ -lactona α,β -insaturada e a presença de

um sistema α -oxido- γ -lactona saturada apresentado na **Figura 63**. As acetogeninas que apresentam este modelo particular de anel γ -lactônico são comumente chamadas de “iso-acetogeninas” (DURET et al., 1994).

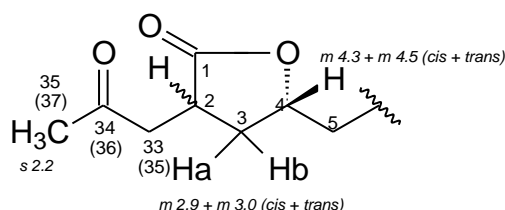


Figura 63. Deslocamentos químicos de RMN ^1H do anel γ -lactônico da “iso-acetogenina”.

A “iso-acetogeninas” são caracterizadas por apresentarem no espectro de RMN ^1H um simpleto a δ_{H} 2,2, correspondente a metila terminal no átomo de C-37 (35) (**Figura 63**) (DURET et al., 1994). No espectro de RMN ^1H de **A5** (**Figuras 67-70, p. 151-153**) pode ser observado este sinal em δ_{H} 2,13.

Estas substâncias sempre são isoladas como misturas de diastereoisômeros *cis* e *trans*, dependendo se os átomos de H-2 e H-4 se encontram ou não no mesmo plano. Por esta razão, os sinais dos átomos de H-2, H-3, H-4 e H-35 (33) aparecem desdobrados (**Figura 63**) (DURET et al., 1994, CAVÉ et al., 1997). A fim de distinguir as duas configurações relativas, *cis* e *trans*, utilizamos como base modelos que foram preparados e analisados na literatura (CAVÉ et al., 1997).

Assim, no espectro de RMN ^1H de **A5** (**Figuras 67-70, p. 151-153**) os sinais em δ_{H} 2,93 e δ_{H} 2,95, se referem aos átomos de H-2 *cis* e *trans*, respectivamente. E, sinais em δ_{H} 4,32 e δ_{H} 4,47, se referem aos átomos de H-4 *cis* e *trans*, respectivamente. Além disso, os átomos de H-3 e H-33 de cada diastereoisômeros não são equivalentes, logo no espectro de RMN ^1H de **A5** (**Figuras 67-70, p. 151-153**) pode-se distinguir os átomos de H-3 *cis* α em δ_{H} 2,53 e β em δ_{H} 1,61; H-3 *trans* α em δ_{H} 2,55 e β em δ_{H} 1,92; H-33 *cis* α em δ_{H} 2,57 e β em δ_{H} 3,05 e H-33 *trans* α em δ_{H} 2,63 e β em δ_{H} 2,99. O espectro

COSY de **5** (**Figura 72, p. 154**) mostra as correlações correspondentes às interações spin-spin homonucleares destes átomos de hidrogênios.

A análise do espectro de RMN ^{13}C -DEPT de **A5** (**Figura 71, p. 153**) revelou a presença de alguns pares de sinais, devido à mistura de diastereoisômeros, com deslocamentos químicos em: δ_{C} 178,6 (C-1); δ_{C} 35,69 (CH-2); δ_{C} 34,53 e 34,30 (CH₂-3), δ_{C} 78,30 (CH-4); δ_{C} 42,24 *cis* e 43,78 *trans* (CH₂-33); δ_{C} 205,3 (C-34) e, δ_{C} 28,98 (CH₃-35). Desta maneira, as atribuições dos sinais de deslocamentos químicos referentes ao sistema α -oxo- γ -lactona saturada foram confirmados através do mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figuras 73 e 74, p. 154 e 155**).

A identificação de um sistema mono THF é proposto pela presença dos sinais em δ_{C} 81,58 e δ_{C} 81,64, que foram atribuídos aos dois átomos de carbono CH-16 e CH-19, respectivamente. Os sinais dos dois carbonos carbinólicos em δ_{C} 73,04 (CH-15) e δ_{C} 72,96 (CH-20) podem ser observados no espectro RMN ^{13}C -DEPT (**Figura 71, p. 153**), em consonância, os sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio observados no espectro RMN ^1H (**Figuras 67-70, p. 151-153**) em δ_{H} 3,74 (H-16 e H-19) e δ_{H} 3,34 (H-15 e H-20). Também foram identificados os sinais em δ_{C} 70,76 e um multiplete integrando para um hidrogênio em δ_{H} 3,53, que foram atribuídos ao átomo CH-10, confirmando a presença do grupo funcional hidroxila ao longo da cadeia hidrocarbônica. As correlações observadas no mapa de correlação HSQC (**Figuras 73 e 74, p. 154 e 155**) confirmam os deslocamentos químicos propostos.

A configuração relativa do sistema mono-THF, foi realizada por uma análise comparativa dos dados citados com modelos descritos na literatura. (CAVÉ et al., 1997; BORN et al., 1990). Dessa forma, permitiu propor a configuração relativa do anel mono-THF como sendo *threo/trans/threo* para a acetogenina **A5**, semelhante à annonacina (**A4**).

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbonos, no espectro de RMN ^{13}C -DEPT (**Figura 71, p. 153**), da parte não funcionalizada, estão de acordo com os dados da literatura (CH₂-5 a CH₂-8 e CH₂-23 a CH₂-29: δ_{C} 32,28-27,74; CH₂-17 e CH₂-18: δ_{C} 28,64). No espectro de RMN ^1H os sinais correspondentes a esses átomos de hidrogênios aparecem em δ_{H} 1,34-1,19;

δ_H 1,92-1,61, respectivamente. As demais atribuições de valores dos deslocamentos químicos de RMN 1H e RMN ^{13}C -DEPT encontram-se sumarizadas na **Tabela 28, p. 148** e **Figura 64**, e confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (**Figuras 73 e 74, p. 154 e 155**).

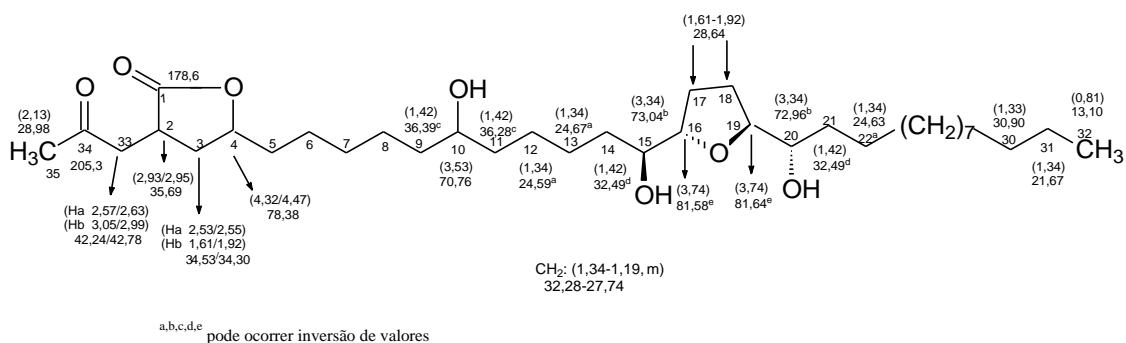


Figura 64. Deslocamentos químicos de RMN 1H (entre parêntesis) de RMN ^{13}C da isoannonacina (**A5**).

O espectro de massas ESI-MS (**Figuras 75 e 76, p. 155 e 156**) apresentou o pico do íon molecular $[M^+Na]^+$ de m/z 619,5 indicando M^+ de m/z 596 (596,465205 cal), consistente com a fórmula molecular $C_{35}H_{64}O_7$, confirmando a proposta estrutural da acetogenina **A5**. O espectro também revelou picos que podem ser justificados por íons correspondentes à perda de moléculas de água. É importante destacar que o pico em m/z 327,1 (326,1 cal) permite confirmar a posição do anel mono-tetrahydrofurânico entre os átomos de carbonos C-15/C-20. A presença do grupo α -oxo- γ -lactona saturada pode ser confirmada pelo pico em m/z 142,0 (142,06 cal) (**Figura 65, p. 148**).

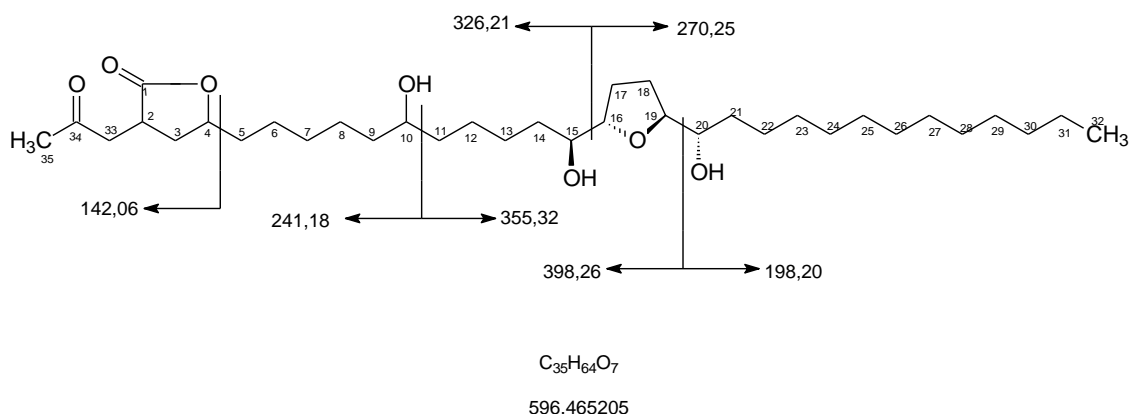


Figura 65. Proposta de fragmentação para os principais íons da isoannonacina (A5).

A comparação dos dados de RMN 1H e RMN ^{13}C -DEPT com dados de literatura confirmou de forma inequívoca que a acetogenina **A5** trata-se da isoannonacina, isolada pela primeira vez das cascas do caule da espécie *Annona densicoma* (XU et al., 1989).

Tabela 28. Dados de RMN 1H (300 MHz), ^{13}C -DEPT (500 MHz) da acetogenina **A5**, em $CDCl_3$ (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a isoannonacina em $CDCl_3$. Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (entre parêntesis) estão em Hz.

	Substância A5		Isoannonacina (XU et al., 1989)	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
C		-		
1	178,6	-	178,65	-
34	205,3		205,38	-
CH				
2	35,69	2,93/2,95 (m)	34,2	3,02 (dddd, J=17;9,5; 9,0;3,6)
4	78,38	4,32 (dddd, J=9,5; 9,0;5,0;3,6) 4,47 (m)	78,81	4,54 (tdd, J=7;4,3;3,6)
10	70,76	3,53 (m)	71,73	3,59 (m)
15	73,04 ^a	3,34 (ddd, J= 11;6,5;5)	74,03	3,41 (ddd, J= 12,2;6,4;5,2)

16	81,58 ^b	3,74 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 12;7)	82,64	3,8 (<i>dd</i> , <i>J</i> =12,2;6,4)
19	81,64 ^b	3,74 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 12;7)	82,70	3,8 (<i>dd</i> , <i>J</i> =12,2;6,4)
20	72,96 ^a	3,34 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 11;6,5;5)	73,97	3,41 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 12,2;6,4;5,2)
CH₂				
3a	34,53	2,53 (<i>m</i>) 2,55 (<i>m</i>)	33,31	2,23 (<i>m</i>)
3b	34,30	1,61/1,92 (<i>m</i>)		1,99 (<i>m</i>)
5-8	32,28-27,74	1,34-1,19 (<i>m</i>)	38-22	1,60-1,25 (<i>m</i>)
9	36,39 ^d	1,42 (<i>m</i>)	38-22	1,43 (<i>m</i>)
11	36,28 ^d	1,42 (<i>m</i>)	38-22	1,43 (<i>m</i>)
12	24,59 ^e	1,34 (<i>m</i>)	38-22	1,60-1,25 (<i>m</i>)
13	24,67 ^e	1,34 (<i>m</i>)	38-22	1,60-1,25 (<i>m</i>)
14	32,49 ^c	1,42 (<i>m</i>)	38-22	1,60-1,25 (<i>m</i>)
17	28,64	1,92-1,61 (<i>m</i>)	38-22	1,98-1,66 (<i>m</i>)
18	28,64	1,92-1,61 (<i>m</i>)	38-22	1,98-1,66 (<i>m</i>)
21	32,49 ^c	1,42 (<i>m</i>)	38-22	1,60-1,25 (<i>m</i>)
22	24,63 ^e	1,34 (<i>m</i>)	38-22	1,60-1,25 (<i>m</i>)
23-29	32,28-27,74	1,34-1,19 (<i>m</i>)	38-22	1,60-1,25 (<i>m</i>)
30	30,90	1,33 (<i>m</i>)	38-22	1,60-1,25 (<i>m</i>)
31	21,67	1,34 (<i>m</i>)	38-22	1,60-1,25 (<i>m</i>)
33a	42,24	2,57 (<i>dd</i> , <i>J</i> =16;9,3) 2,63 (<i>dd</i> , <i>J</i> =16;9,3)	44,25	2,68 (<i>dd</i> , <i>J</i> =17;9,5)
33b	42,78	3,05 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 19;3,5) 2,99 (<i>dd</i> , <i>J</i> =19; 3,5)		3,01(<i>dd</i> , <i>J</i> =9,5;9,0)
CH₃				
32	13,10	0,81 (<i>t</i> , <i>J</i> =6,7)	14,04	0,88 (<i>t</i> , <i>J</i> =6,8)
35	28,98	2,13 (<i>s</i>)	29,86	2,20 (<i>s</i>)

^{a,b,c,d,e} pode ocorrer inversão de valores

É importante, ressaltar que as “iso-acetogeninas” não devem ser consideradas produtos naturais e sim, artefatos procedentes da translaconização que ocorrem em ACGs hidroxiladas no átomo de C-4 (**Figura 66, p. 150**). Este processo pode ocorrer devido ao meio básico, como consequência, por exemplo, da presença de alcaloides. Também, foi descrito que a formação destes artefatos ocorre quando as ACGs se encontram no processo de extração em solução metanólica sob aquecimento. Um dos primeiros grupos de pesquisas sobre ACGs publicaram dados experimentais

em que numa extração com metanol feita sem precauções de raízes de *A. cherimolia* foi detectada a presença de “iso-acetogeninas”, porém quando realizaram o processo de extração por maceração com as raízes frescas de *A. cherimolia* usando ácido clorídrico a 0.5N, com a finalidade de separar os alcaloides das ACGs, não foram encontrado as “iso-acetogeninas”. Com esta investigação, pôde-se concluir que estas substâncias são formadas durante o processo de secagem ou de extração e, portanto não existem na matéria prima fresca (DURET *et al.*, 1994).

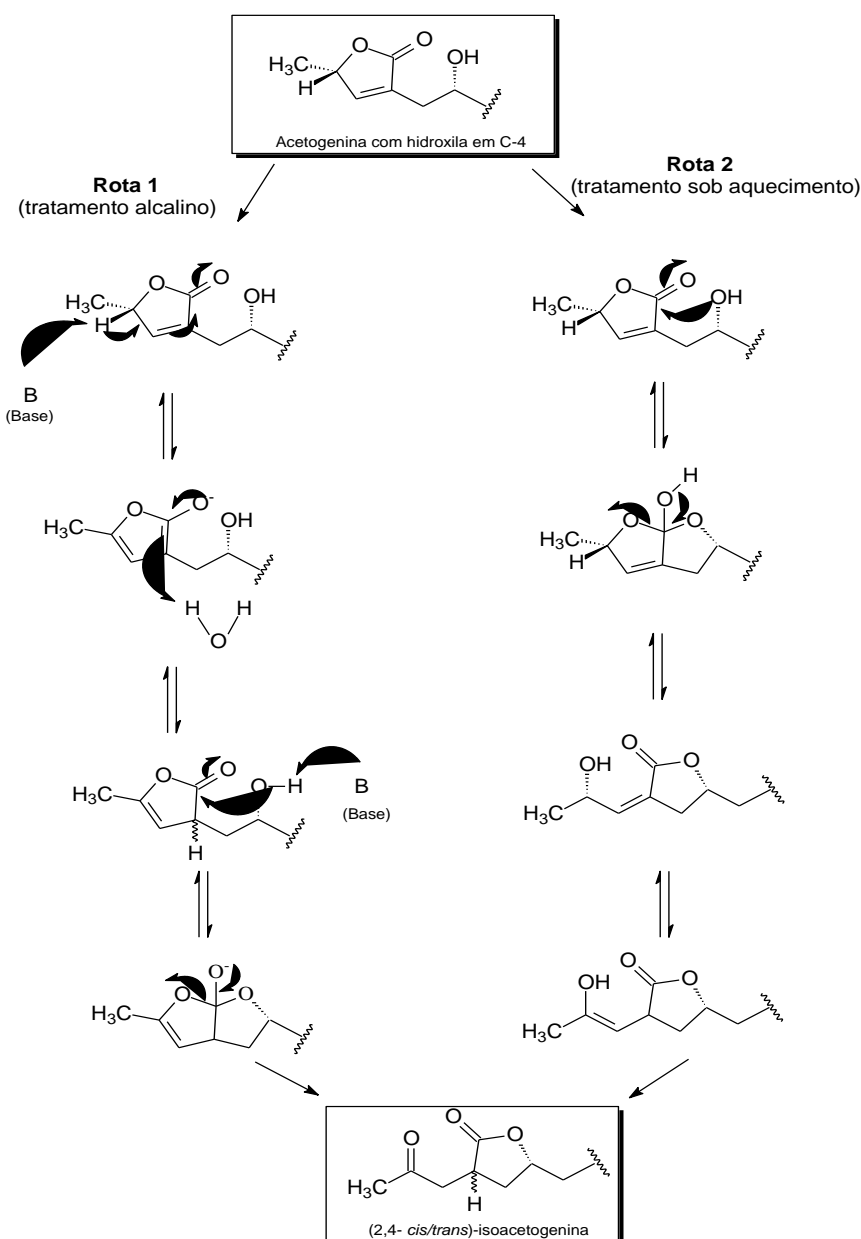


Figura 66. Mecanismo de translactonização das acetogeninas com hidroxila em C-4 (DURET *et al.*, 1994).

Com o propósito de apurar a presença destes artefatos na fração em clorofórmio das raízes de *Annona dioica* e com base no pressuposto que a presença do meio alcalino conferido pelos alcaloides poderia está influenciando a translactonização das acetogeninas com hidroxilas no átomo de C-4, foi realizada uma nova extração da fração clorofórmica com ácido clorídrico a 0.5N (descrita na p. 87), concomitante com a reação de Mayer, sendo observada a formação de um precipitado e turvação do meio, estas características são um indicativo positivo para a presença de alcaloides. Portanto, estes argumentos reforçam que parte das acetogeninas hidroxiladas no átomo de C-4 foram convertidas na sua correspondente mistura de diastereoisômeros de “iso-acetogenina”, uma vez que também foram isoladas acetogeninas hidroxiladas no átomo de C-4.

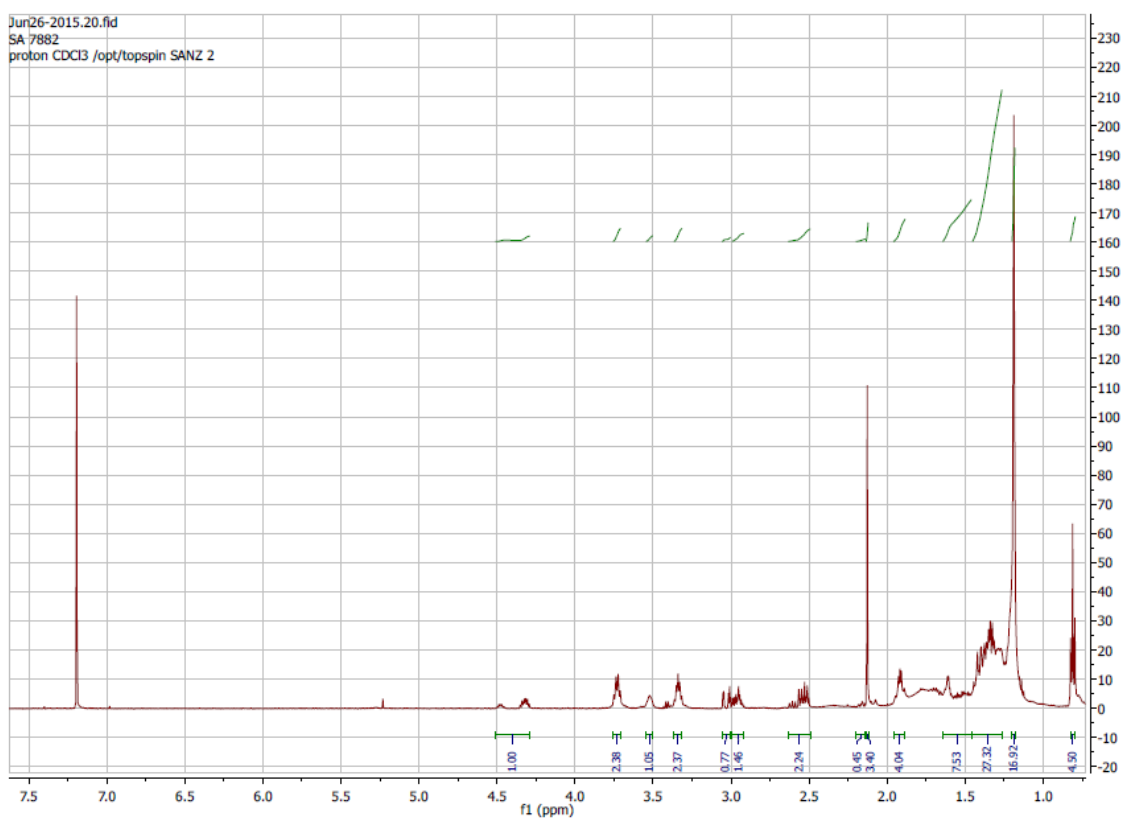


Figura 67. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de A5.

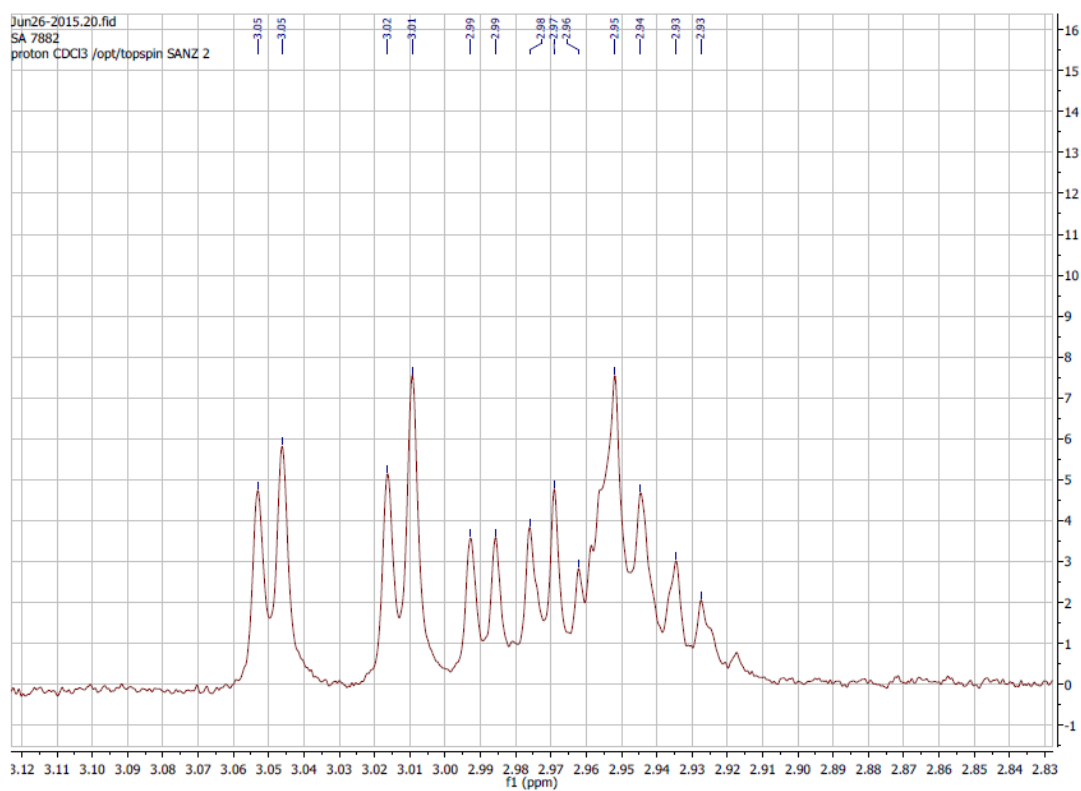


Figura 70. Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de **A5**.

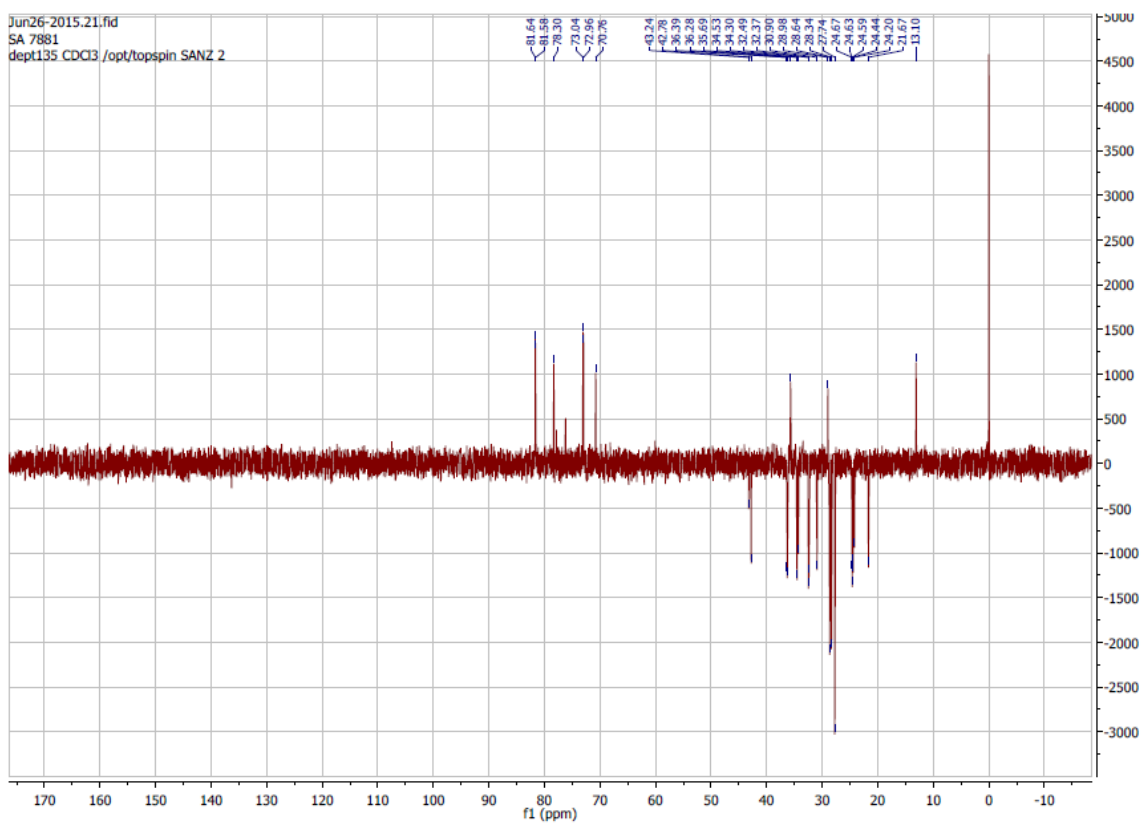


Figura 71. Espectro DEPT 135 (500 MHz) em CDCl_3 de **A5**.

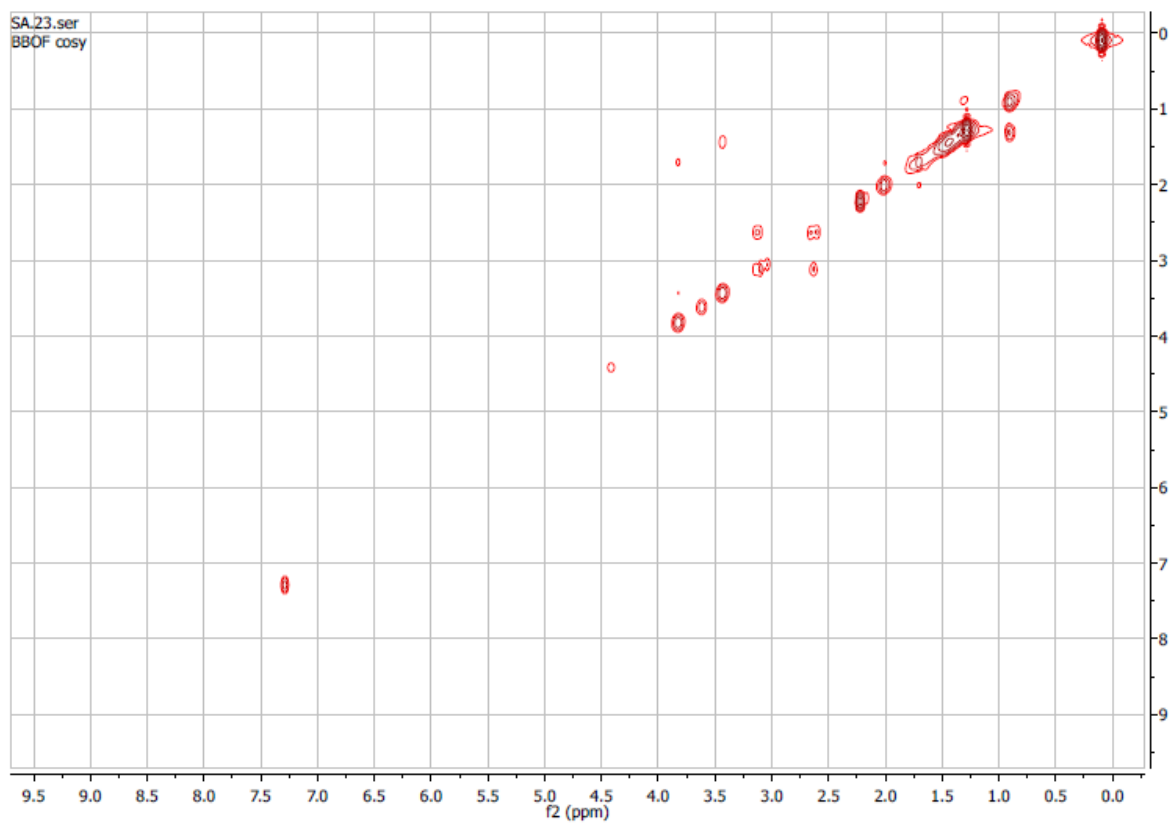


Figura 72. Mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY em CDCl_3 de **A5**.

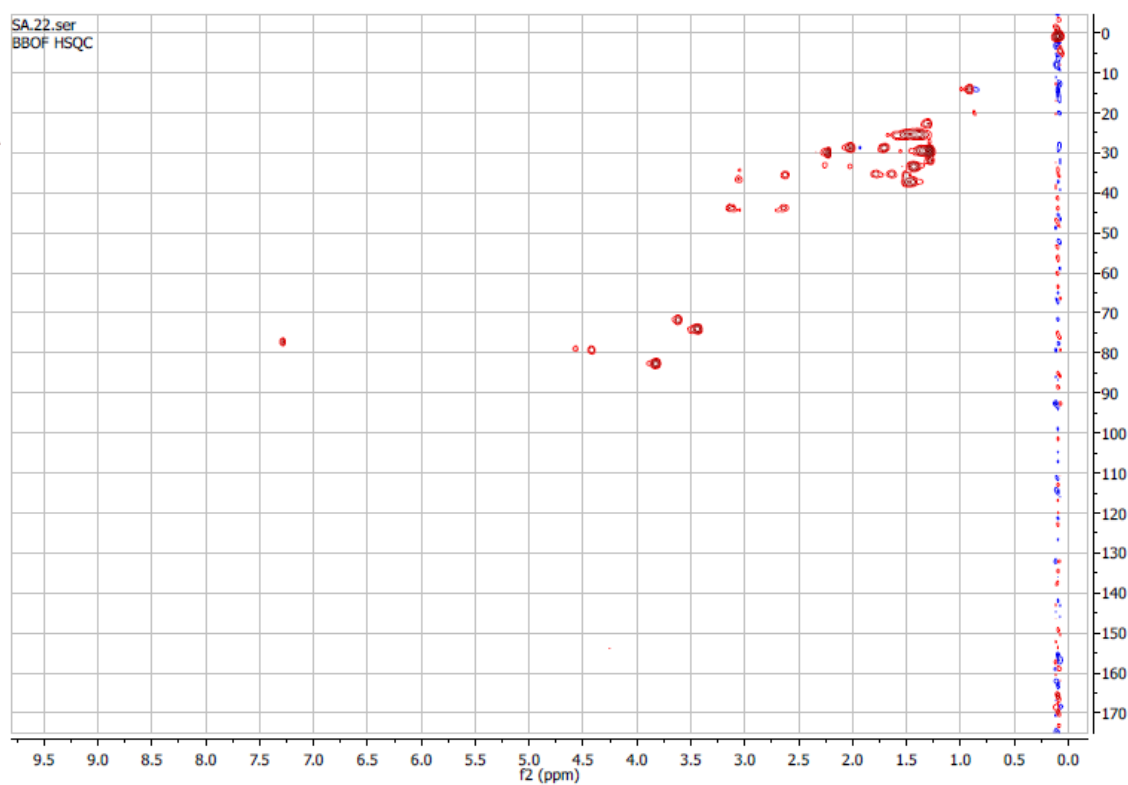


Figura 73. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de **A5**.

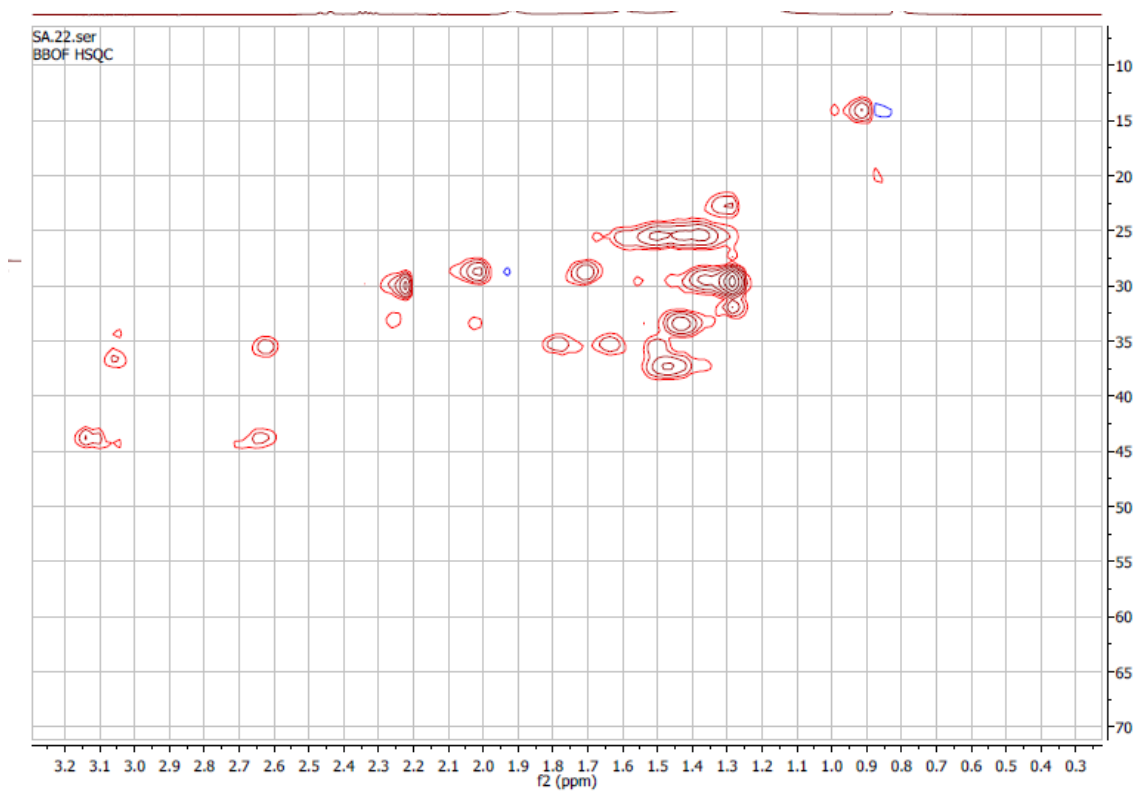


Figura 74. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de **A5**.

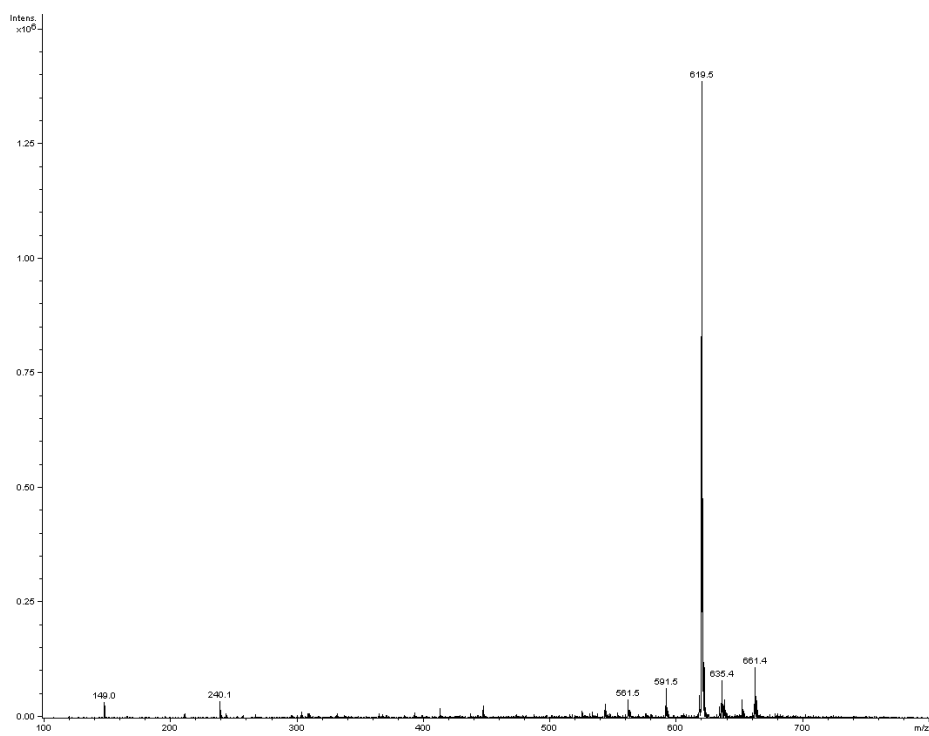


Figura 75. Espectro de massas ESI-MS de **A5**.

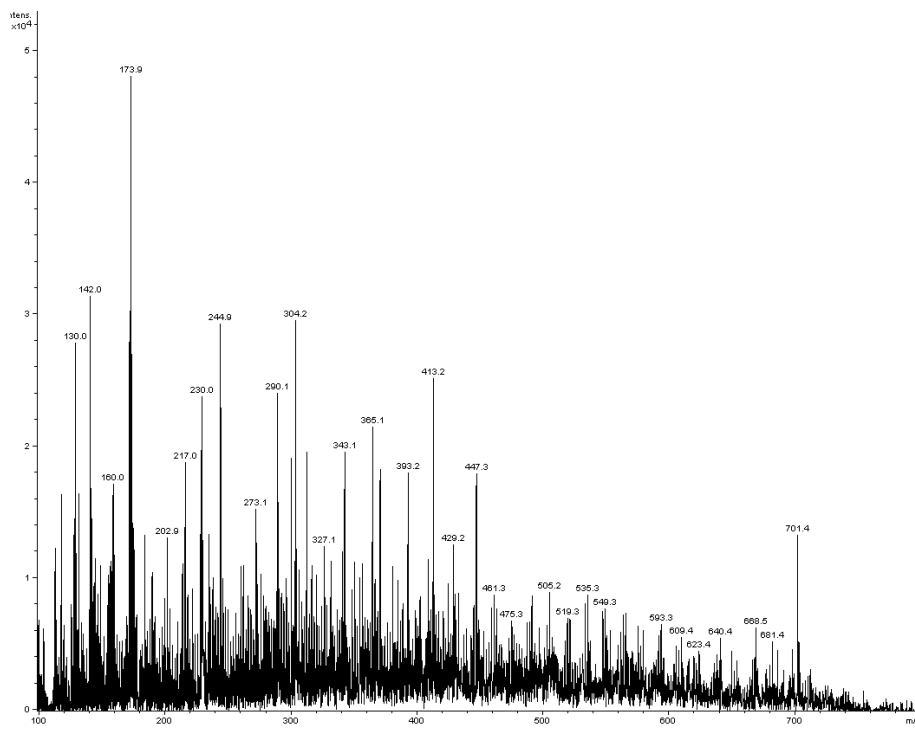
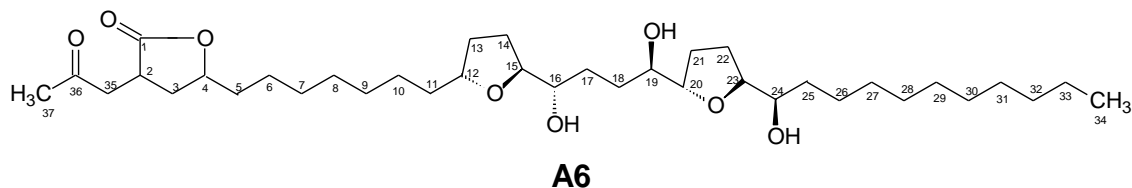


Figura 76. Ampliação do espectro de massas ESI-MS de **A5**.

5.1.6 Identificação da substância A6



A substância **A6** presente na fração clorofórmica de *Annona dioica*, foi isolada com um aspecto de cera incolor. Apresentou teste negativo para acetogeninas pela coloração rosa-violeta demonstrada em solução do reagente de Kedde, que sugere a ausência do anel γ -lactônico α,β -insaturado.

Na análise do espectro na região do Infravermelho (**Figura 77**), observa-se a existência de duas bandas de absorção em $1751,8\text{ cm}^{-1}$ e em $1716,4\text{ cm}^{-1}$ que corresponde à presença de dois grupos carbonílicos distintos. Também, pode ser observada uma banda de absorção em $3418,0\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença do grupo hidroxila, que são característicos grupos funcionais presentes nas estruturas das acetogeninas. As absorções em $2918,5\text{ cm}^{-1}$ e $2851,4\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de ligação H-Csp^3 e, a em $1056,7\text{ cm}^{-1}$ indica a presença de C-O.

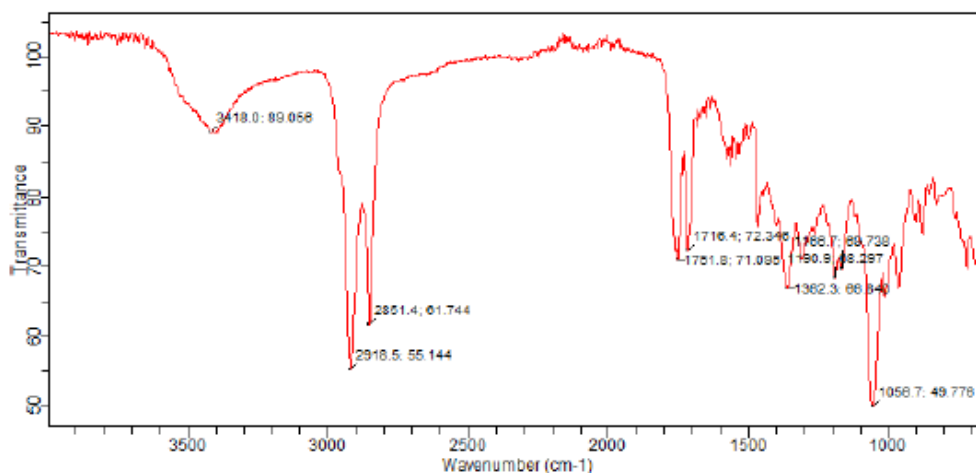


Figura 77. Espectro de infravermelho da isocherimolina-1 (**A6**).

O espectro de RMN ^1H de **A6** (**Figuras 80-83**, p. 162 e 163), corrobora com os dados descritos acima e permite estabelecer com precisão a ausência de um sistema γ -metil γ -lactona α,β -insaturada na estrutura, e a presença de

um sistema α -oxo- γ -lactona saturada, característico das “iso-acetogeninas”. Observa-se um simpleto característico em δ_H 2,22, correspondente a metila terminal no átomo de CH₃-37.

Estas substâncias sempre são isoladas como misturas de diastereoisômeros *cis* e *trans*, dependendo se os átomos de H-2 e H-4 se encontram ou não no mesmo plano, portanto mistura de 2,4-*cis* e 2,4-*trans*. Por esta razão, os sinais dos átomos de H-2, H-3, H-4 e H-35 (33) aparecem desdobrados (DURET *et al.*, 1994, CAVÉ *et al.*, 1997). Assim, no espectro de RMN ¹H de **A6 (Figuras 80-83, p. 162 e 163)** os sinais em δ_H 3,02 e δ_H 3,04, se referem aos átomos de H-2 *cis* e *trans*, respectivamente. E, sinais em δ_H 4,41 e δ_H 4,57, se referem aos átomos de H-4 *cis* e *trans*, respectivamente. Além disso, os átomos de H-3 e H-35 de cada diastereoisômeros não são equivalentes, logo no espectro de RMN ¹H de **A6 (Figuras 80-83, p. 162 e 163)** pode-se distinguir os átomos de H-3 *cis* α em δ_H 1,75 e β em δ_H 1,49; H-3 *trans* α em δ_H 2,60 e β em δ_H 1,60; H-35 *cis* α em δ_H 2,64 e β em δ_H 3,15 e H-35 *trans* α em δ_H 2,70 e β em δ_H 3,08. O espectro COSY de **A6 (Figura 86, p. 165)** mostra as correlações correspondentes às interações spin-spin homonucleares destes átomos de hidrogênios.

A análise do espectro de RMN ¹³C e RMN ¹³C-DEPT de **A6 (Figuras 84 e 85, p. 164)** revelou a presença de alguns pares de sinais, devido à mistura de diastereoisômeros, com deslocamentos químicos em: δ_C 178,80 e 178,28 (C-1); δ_C 37,72 e 34,46 (CH-2); δ_C 79,31 e 78,91 (CH-4); δ_C 44,27 e 43,83 (CH₂-35); δ_C 205,58 e 205,52 (C-36) e, δ_C 29,93 e 29,69 (CH₃-37). Desta maneira, as atribuições dos sinais de deslocamentos químicos referentes ao sistema α -oxo- γ -lactona saturada foram confirmados através do mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figuras 87-89, p. 165 e 166**).

Assim, o sistema bis-tetrahidrofurânico não-adjacente foi sugerido pela presença de quatro sinais em δ_C 82,01 (CH-15), δ_C 83,30 (CH-20), δ_C 82,20 (CH-23) e de um sinal típico na região de δ_C 79, em δ_C 79,36 (CH-12). Os três átomos de carbonos carbinólicos em δ_C 74,55 (CH-16), δ_C 74,47 (CH-19), δ_C 71,57 (CH-24), são observados do espectro RMN ¹³C e RMN ¹³C-DEPT (**Figuras 84 e 85, p. 164**) em consonância com os sinais correspondentes aos

átomos de hidrogênio observados no espectro RMN ^1H (**Figuras 80-83, p. 162 e 163**) em δ_{H} 3,9 (m, H-12, H-15, H-20, H-23 e H-24), δ_{H} 3,42 (m, H-16 e H-19). As correlações observadas no mapa de correlação HSQC (**Figuras 87-89, p. 165 e 166**) confirmam os deslocamentos químicos propostos.

Para estabelecer a configuração relativa do sistema bis-THF não-adjacente, foi realizada uma análise comparativa entre os dados citados com os modelos descritos na literatura (CAVÉ et al., 1997; CORTES et al., 1993). Dessa forma, permitiu propor a configuração relativa do sistema bis-THF não-adjacente como sendo *trans/threo-threo/trans/erythro* para a acetogenina **A6**, semelhante à cherimolina-1.

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbonos, no espectro de RMN ^{13}C e RMN ^{13}C -DEPT (**Figuras 84 e 85, p. 164**), da parte não funcionalizada, estão de acordo com os dados da literatura (CH₂-5 a CH₂-11, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-21, CH₂-22 e CH₂-26 a CH₂-31: δ_{C} 29,69-29,37; CH₂-13, CH₂-18: δ_{C} 32,29-25,22). No espectro de RMN ^1H os sinais correspondentes a esses átomos de hidrogênios aparecem em δ_{H} 2,02-1,28. As demais atribuições de valores dos deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C encontram-se sumarizadas na **Tabela 29, p. 160 e Figura 78**, e confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (**Figuras 87-89, p. 165 e 166**).

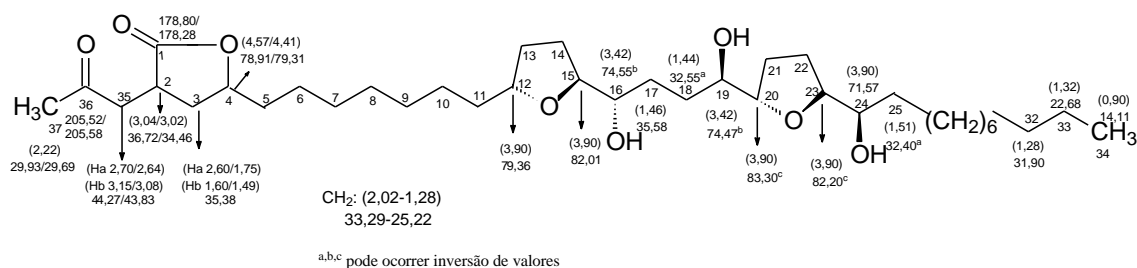


Figura 78. Deslocamentos químicos de RMN ^1H (entre parêntesis) de RMN ^{13}C da isocherimolina-1 (**A6**).

O espectro de massas ESI-MS (**Figura 90 e 91, p. 167**) apresentou o pico do íon molecular $[\text{M}^+\text{Na}]^+$ de m/z 661,4 indicando M^+ de m/z 638 (638,475770 cal), consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$, confirmando a proposta estrutural da acetogenina **A6**. O espectro também revelou picos que podem ser justificados por íons correspondentes à perda de moléculas de

água. É importante destacar que o pico em m/z 359,1 ($[M^+ - 2H_2O]^+$) (360,25 cal) permite confirmar a posição de um anel mono-tetrahidrofurânico entre os átomos de carbonos C-19/C-24 e o pico em m/z 290,2 ($[M^+ - 1H_2O]^+$) (290,21 cal) permite confirmar a posição de um anel mono-tetrahidrofurânico entre os átomos de carbonos C-12/C-16, propondo desta forma um sistema bis-tetrahidrofuranico não adjacente. Além disso, o pico em m/z 339,1 (338,22 cal) confirma a posição do grupo hidroxila na cadeia hidrocarbônica em C-16, atribuído à clivagem entre os átomos de carbonos C-16/C-17 (**Figura 79**).

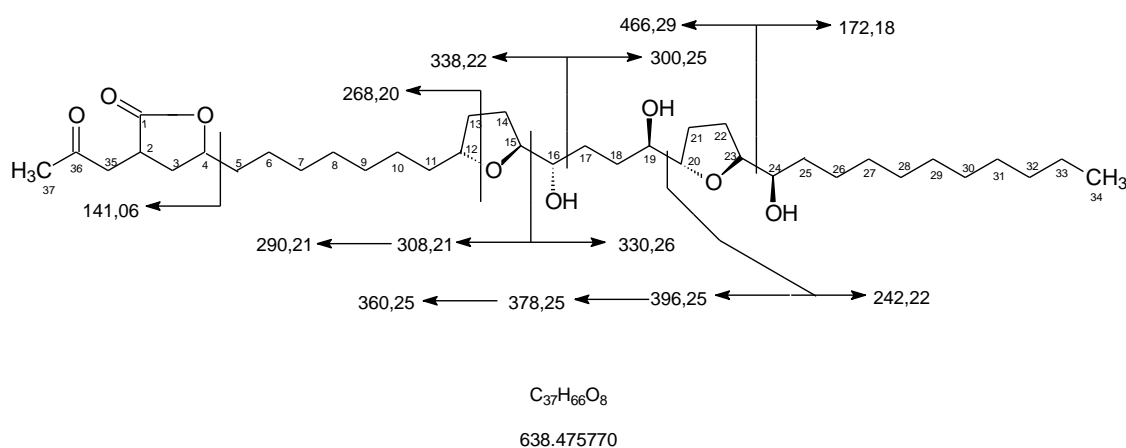


Figura 79. Proposta de fragmentação para os principais íons da isocherimolina-1 (**A6**).

A comparação dos dados de RMN 1H e RMN ^{13}C com dados de literatura confirmou de forma inequívoca que a acetogenina **A6** trata-se da isocherimolina-1, também conhecida como bullatalicinona, isolada pela primeira vez das cascas da espécie *Annona bullata* (HUI et al., 1991).

Tabela 29. Dados de RMN 1H (300 MHz), ^{13}C (500 MHz) da acetogenina **A6**, em $CDCl_3$ (δ 7,26) em comparação com os dados de literatura para a isocherimolina-1 em $CDCl_3$. Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (entre parêntesis) estão em Hz.

	Substância A6		Isocherimolina-1 (Hui et al., 1991)	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
C				
1	178,80/178,28	-	177,01	-
36	205,52/205,58	-	203,99	-

CH				
2	36,72/34,46	3,04/3,02 (m)	36,5-23,0	2,61/2,72
4	78,91/79,31	4,57 (m) 4,41 (dddd, J= 9,3; 7,4;5,0;5,0)	78,45/78,1 8	4,06
12	79,36	3,90 (m)	75,50	3,78 (m)
15	82,01	3,90 (m)	83,75	3,70 (m)
16	74,55 ^a	3,42 (m)	72,10	3,62 (m)
19	74,47 ^a	3,42 (m)	74,85	3,43 (m)
20	83,30 ^b	3,90 (m)	82,61	3,81 (m)
23	82,20 ^b	3,90 (m)	82,88	3,70 (m)
24	71,57	3,90 (m)	74,82	3,36 (m)
CH₂				
3a	35,38	2,60 (ddd, J= 9,3;9,0;3,6) /1,7 (m)	36,5-23,0	1,98
3b		1,60/1,49 (m)		1,71
5-11	33,29-25,22	2,02-1,28 (m)	36,5-23,0	1,95-1,20
13-14	33,29-25,22	2,02-1,28 (m)	36,5-23,0	1,95-1,20
17	35,58	1,46 (m)	36,5-23,0	1,95-1,20
18	32,55 ^c	1,40 (m)	36,5-23,0	1,95-1,20
21-22	33,29-25,22	2,02-1,28 (m)	36,5-23,0	1,95-1,20
25	32,40 ^c	1,51 (m)	36,5-23,0	1,95-1,20
26-31	33,29-25,22	2,02-1,28 (m)	36,5-23,0	1,95-1,20
32	31,90	1,28 (m)	36,5-23,0	1,95-1,20
33	22,68	1,32 (m)	36,5-23,0	1,95-1,20
35a	43,44	2,70 (dd, J=19,0;7,5) 2,64 (dd, J=19,0;7,5)	43,79	1,88
35b	44,27	3,15(dd, J=18,5; 3,5) 3,08(dd, J=18,5; 3,5)	44,16	2,62 2,52
CH₃				
34	14,11	0,90 (t, J=7,0)	14,37	0,93
37	29,93/29,69	2,22 (s)	36,94	2,0

^{a,b,c} pode ocorrer inversão de valores

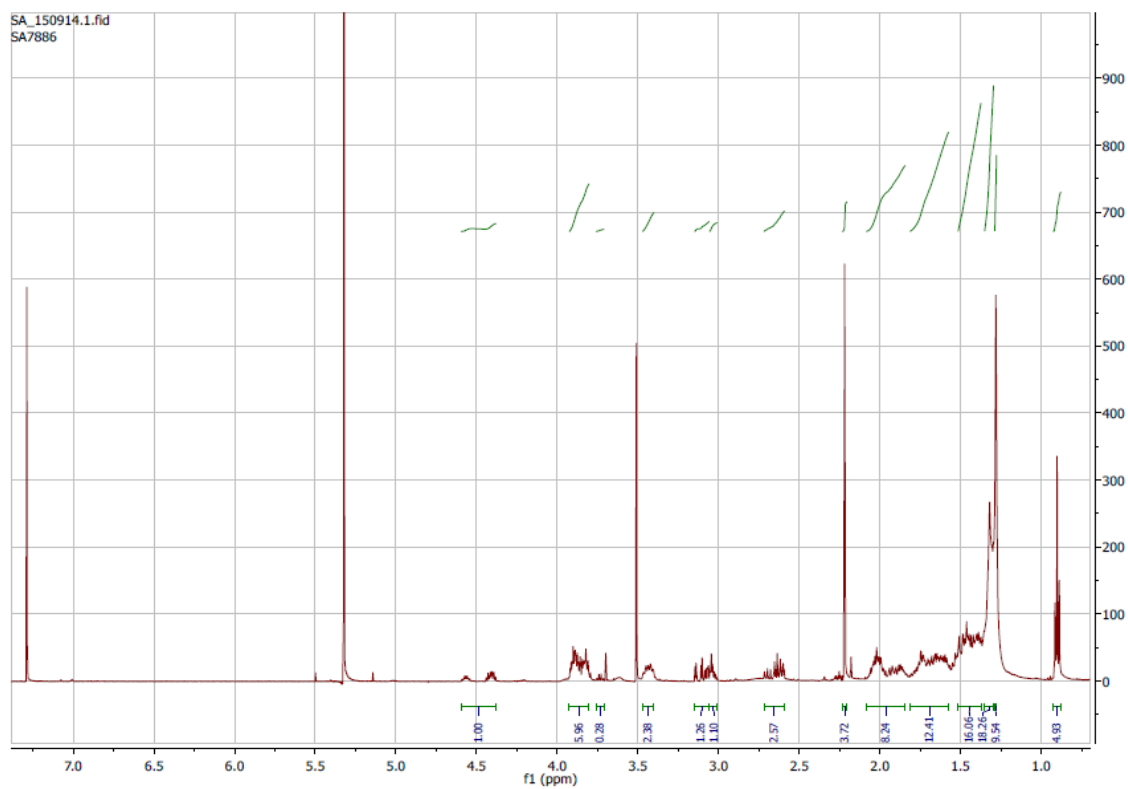


Figura 80. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de **A6**.

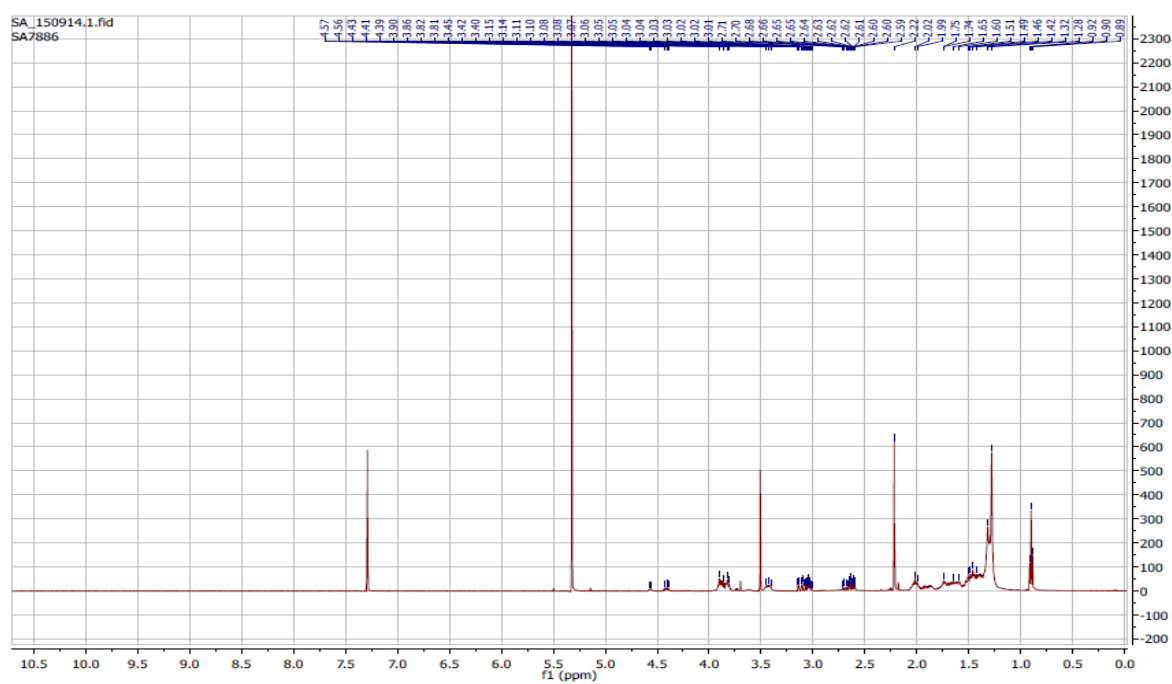


Figura 81. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de **A6**.

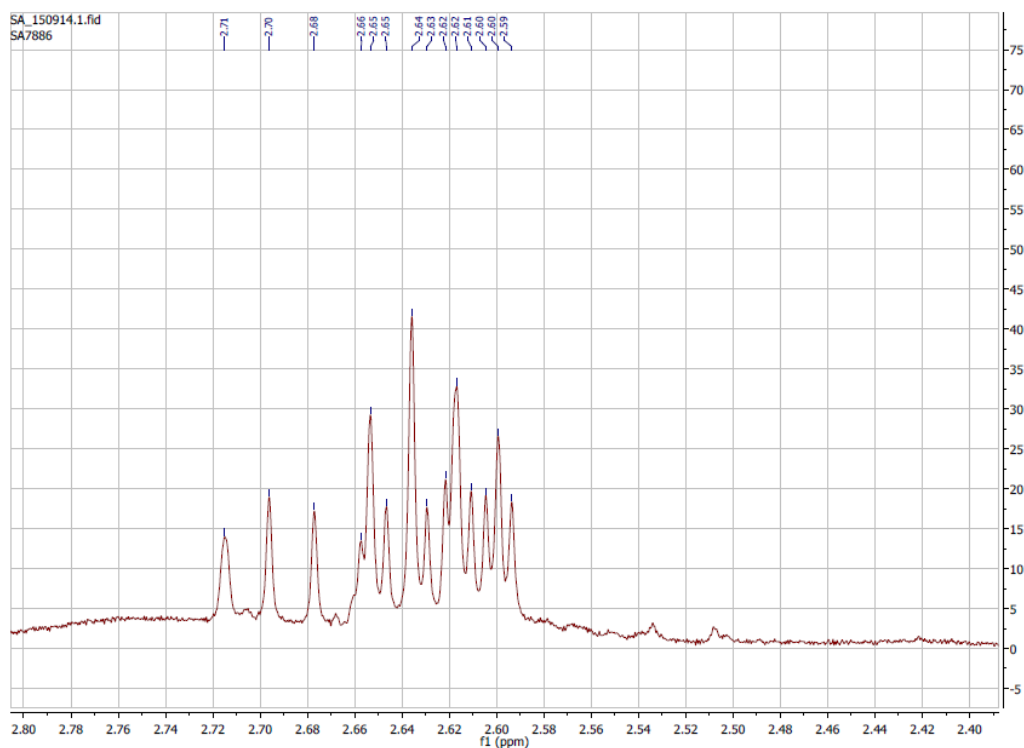


Figura 82. Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de **A6**.

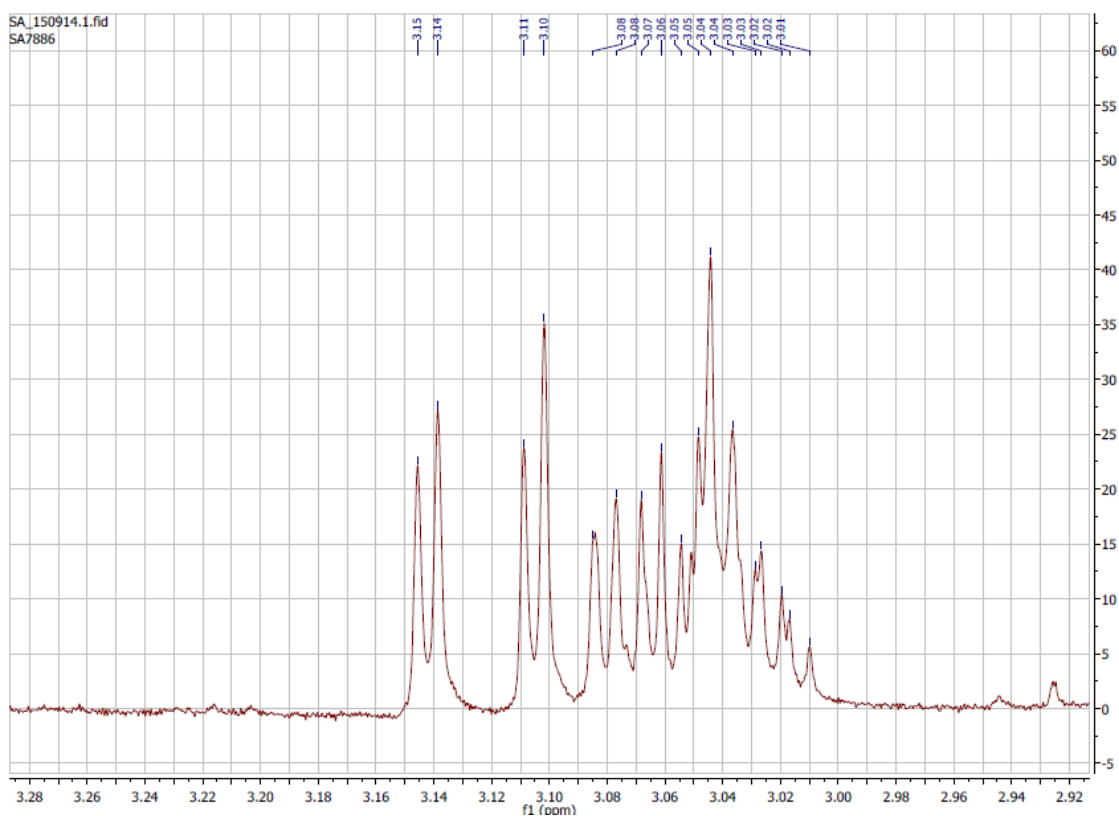


Figura 83. Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 de **A6**.

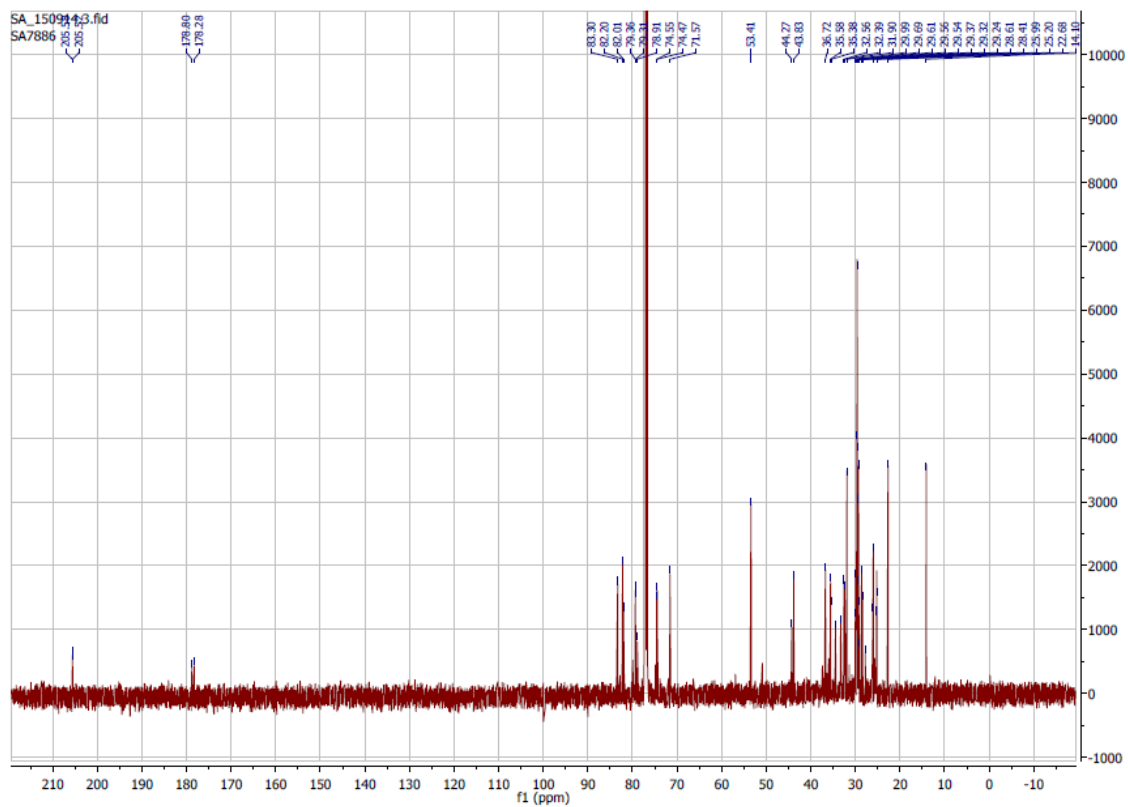


Figura 84. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz) em CDCl_3 de A6.

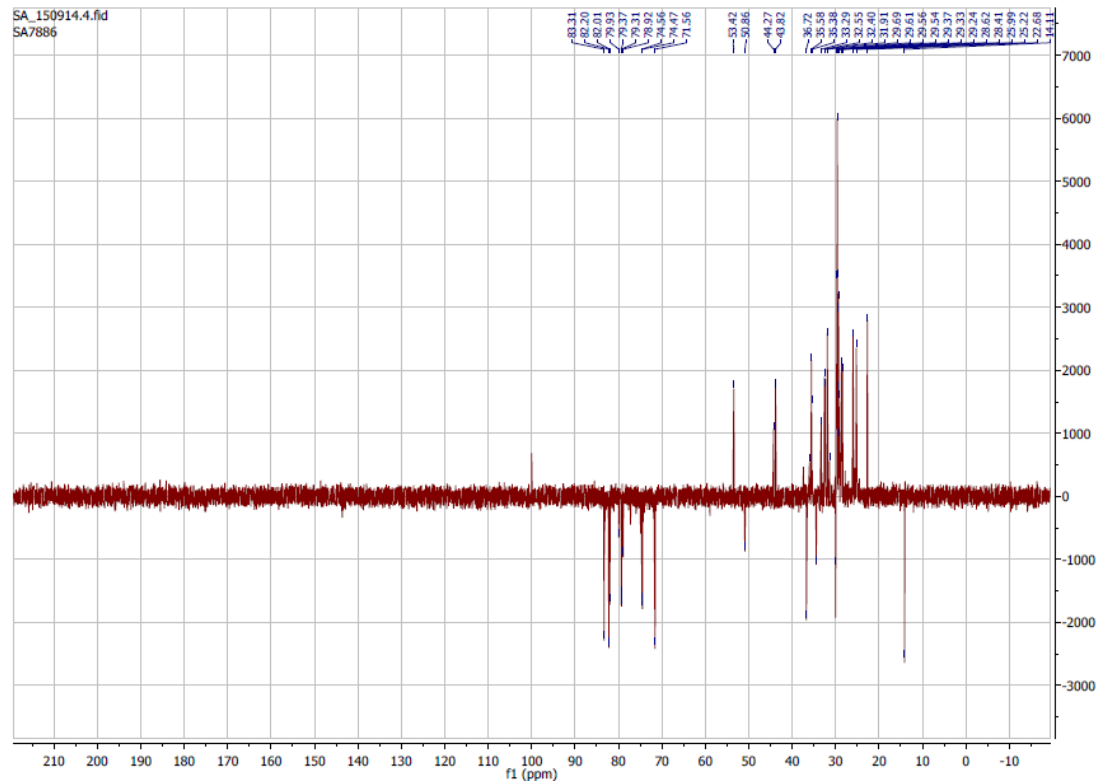


Figura 85. Espectro DEPT 135 (500 MHz) em CDCl_3 de A6.

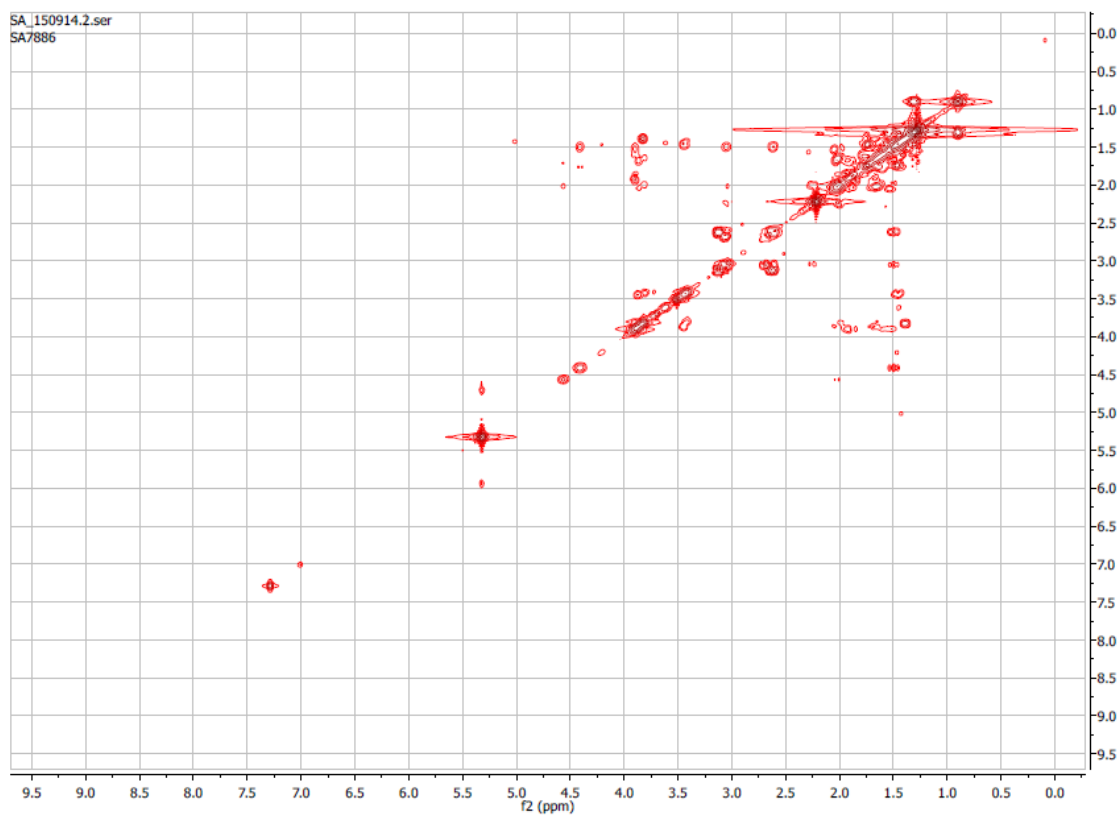


Figura 86. Mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY em CDCl_3 de **A6**.

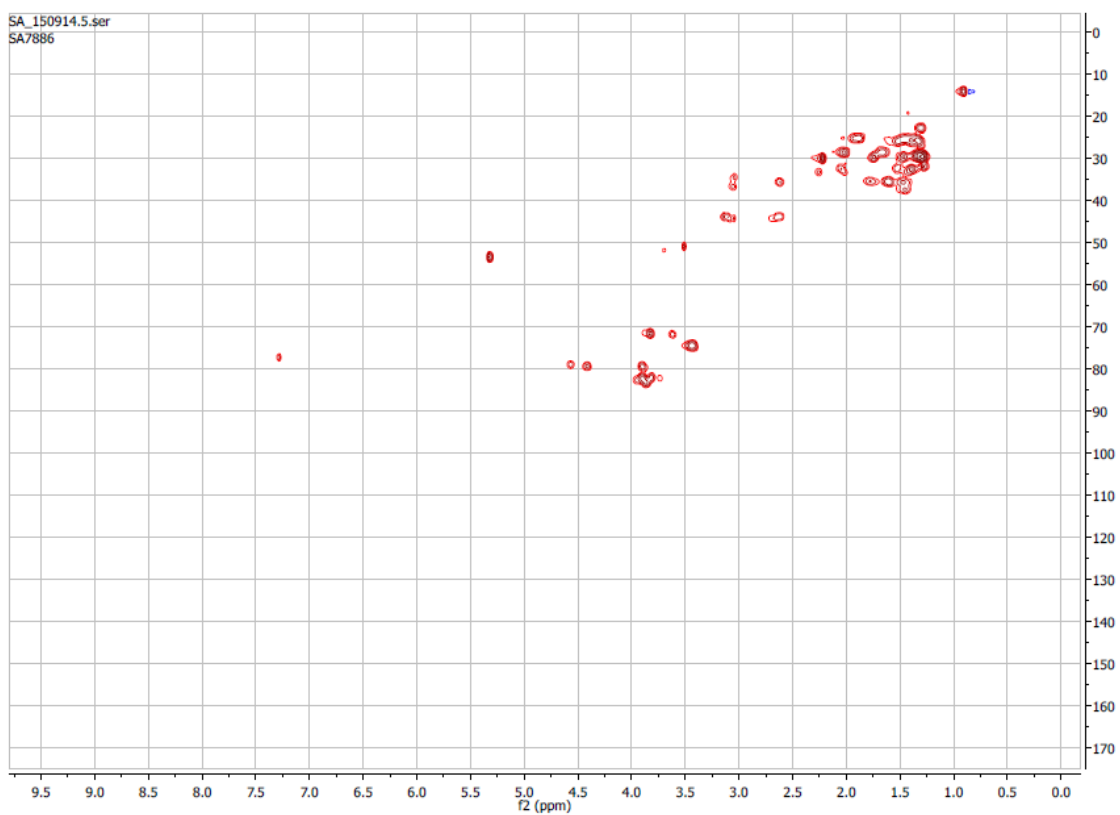


Figura 87. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de **A6**.

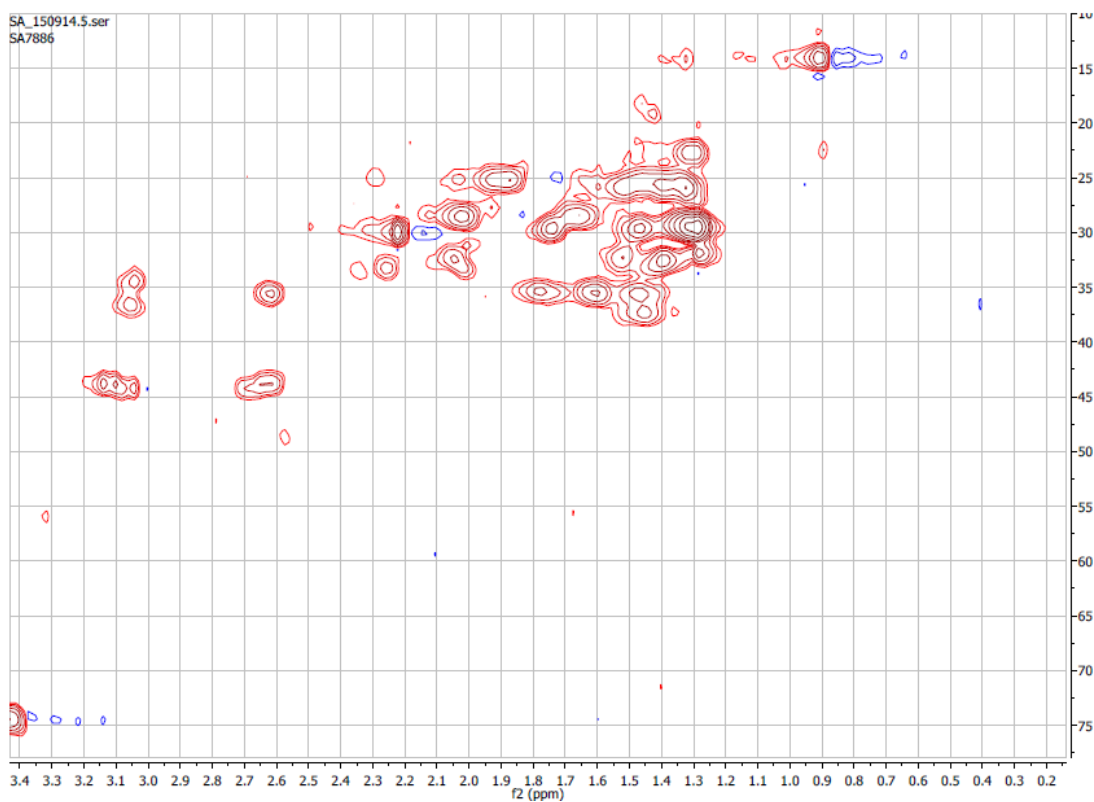


Figura 88. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de A6.

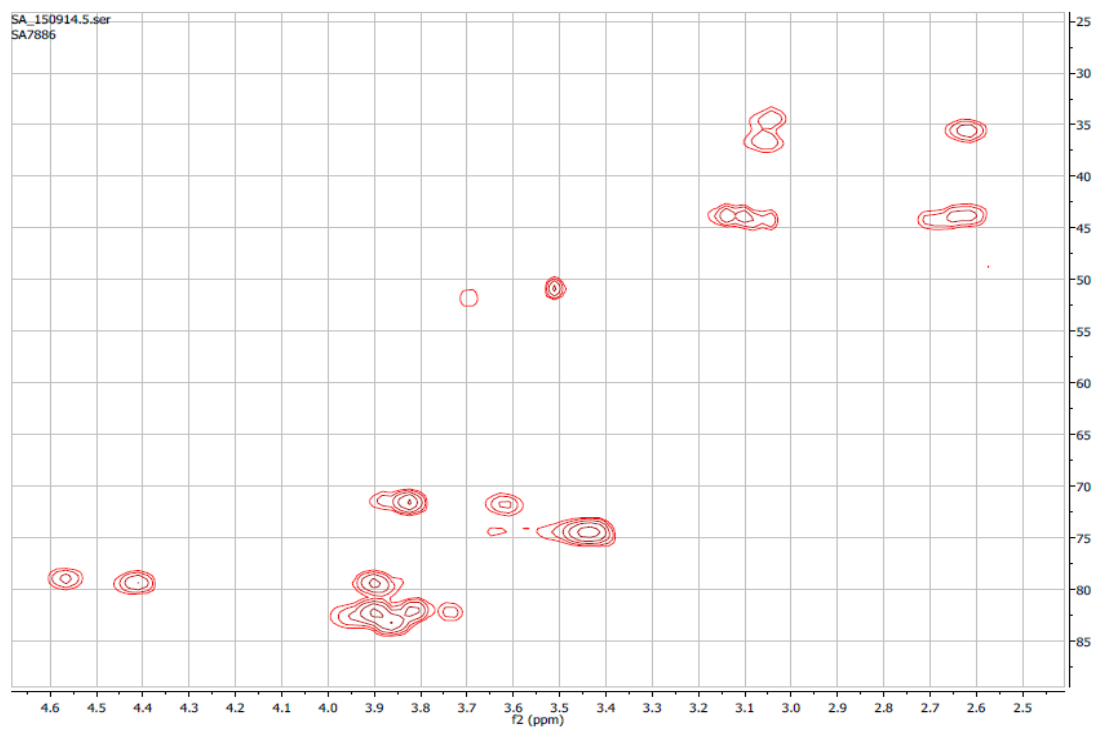


Figura 89. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de A6.

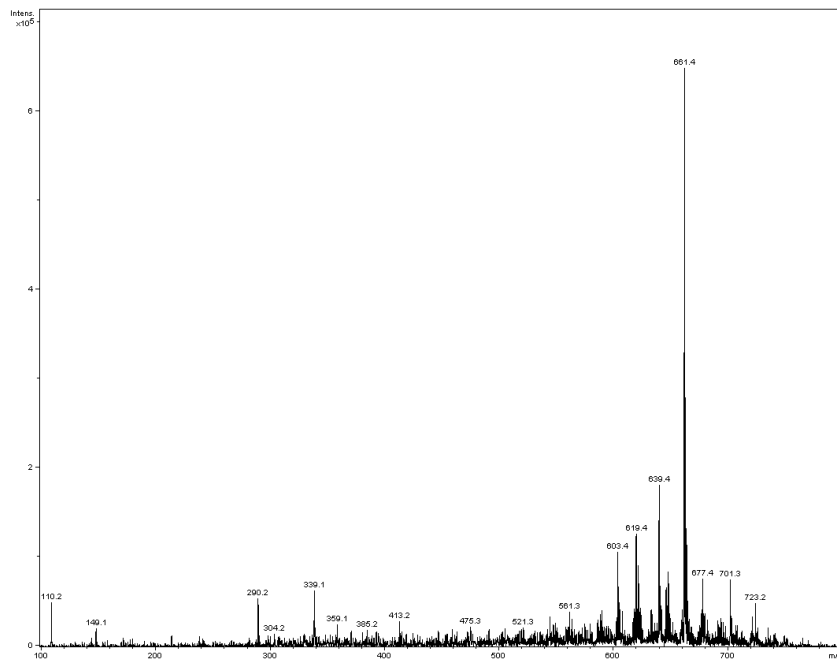


Figura 90. Espectro de massas ESI-MS de **A6**.

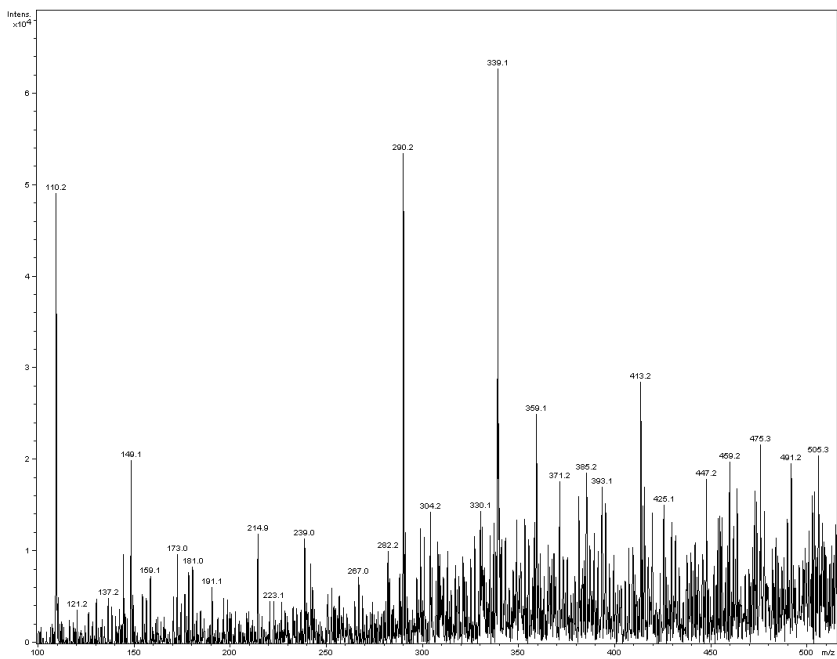


Figura 91. Ampliação do espectro de massas ESI-MS de **A6**.

5.2 Avaliação da atividade biológica das frações das espécies *A. dioica*, *A. acutiflora* e *A. dolabripetala*

5.2.1 Avaliação do efeito das frações na viabilidade celular de células neoplásicas e de origem não tumoral

O câncer é uma condição patológica com crescente prevalência e incidência. Contudo, estudos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos, revelando descobertas promissoras cujo objetivo é desenvolver opções de tratamentos individualizados, que sejam mais seletivos e menos tóxicos.

Entre as diversas formas para o tratamento da doença, os fármacos quimioterápicos são as opções em maior uso, onde a maioria destes é oriundo dos produtos naturais. De fato, em decorrência da valorização da farmacologia dos produtos de origem vegetal estar intimamente conectada à sua aplicação na terapia do câncer, os dados quimiosistemáticos e conhecimentos etnobotânicos têm sido utilizados como principais estratégias na seleção das espécies de plantas para a descoberta de novos fármacos (LAUTIE et al., 2008).

Portanto, com base em dados da literatura e em estudos prévios, objetivamos, inicialmente, investigar neste trabalho a atividade citotóxica de três espécies do gênero *Annona*, que pertence a família Annonaceae: *A. dioica*, *A. acutiflora* e *A. dolabripetala*. Embora, seja de conhecimento que várias espécies deste gênero, como *A. muricata* e *A. purpurea*, são empregadas na medicina popular para efeitos anti-cancer no México, por exemplo, as espécies em estudos não têm menção quanto a isto (CHAVEZ & MATA, 1998; CAMACHO et al., 2003). Mas, é de nosso interesse investigar o potencial biológico destas espécies, através de ensaios de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células tumorais humanas, como forma de contribuição para a farmacologia do gênero *Annona* e também como maneira de guiar o estudo fitoquímico na busca das substâncias que mais contribui para o carácter citotóxico conhecido entre as espécies do gênero *Annona*, as acetogeninas.

Desse modo, a atividade citotóxica das frações obtidas das três espécies de *Annonas* estudadas foram avaliadas através do micro-ensaio colorimétrico

utilizando MTT que avalia a função celular à nível mitocondrial (MOSMMANN, 1983).

No *screening* inicial as frações hexânica, clorofórmica e metanólica das folhas da espécie *A. acutiflora*, as frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica das raízes da espécie *A. dioica* e, as frações hexânica, clorofórmica e metanólica das folhas da espécie *A. dolabripetala*, foram avaliadas quanto à citotoxicidade no período de incubação de 48 horas nas linhagens de células neoplásicas U-937 e THP-1.

Analisando os resultados demonstrados nas **Figuras 92 e 93, p. 170 e 171**, verifica-se, de forma geral, que as frações resultantes das espécies *A. dioica* e *A. acutiflora* apresentam os resultados mais promissores, por serem capazes de reduzir de maneira significativa a viabilidade celular das linhagens neoplásicas U-937 e THP-1 após 48 horas de incubação de maneira concentração dependente. O mesmo não ocorreu para as frações da espécie *A. dolabripetala*, que foram capazes de interferir na viabilidade das células U-937 somente na maior concentração, e para a linhagem THP-1 não foi capaz de interferir na viabilidade das células nem na maior concentração.

O DMSO (dimetilsulfóxido), veículo utilizado para a dissolução das frações, não expos efeito citotóxico sobre as células mantidas no cultivo e, o emprego deste como solvente nas frações não foi fator interferente nos resultados, pois os dados obtidos mostram leitura semelhantes entre DMSO e controle celular.

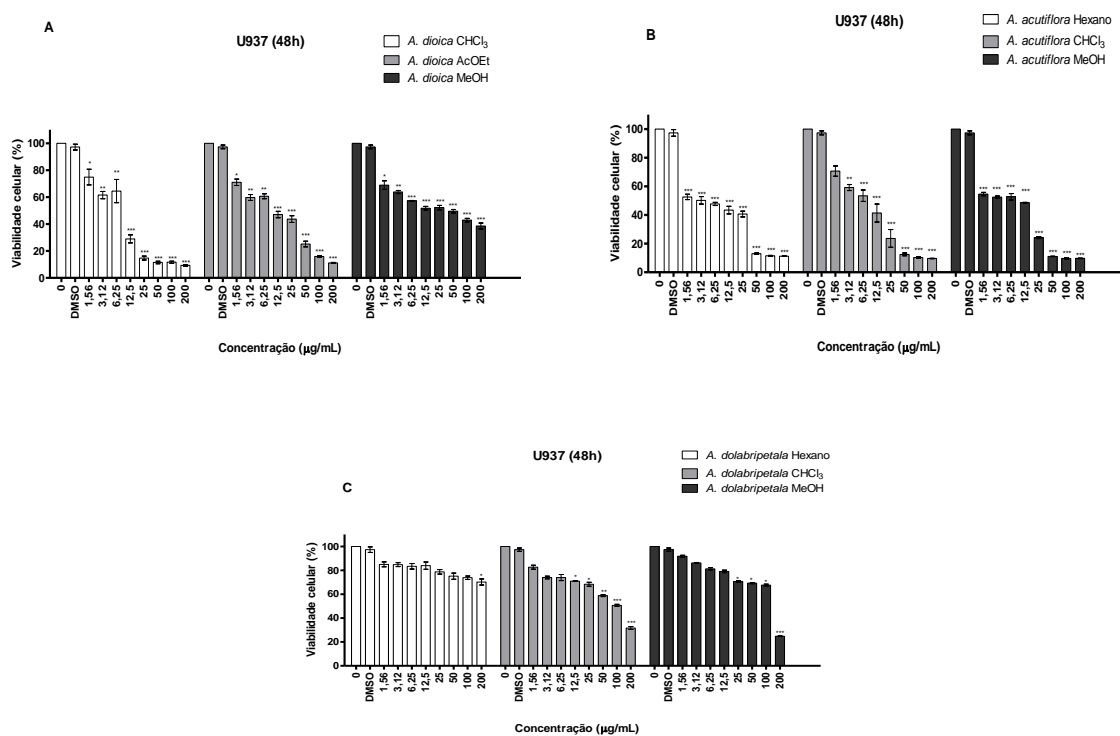


Figura 92. Avaliação da viabilidade celular da linhagem U-937 pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as frações de *A. dioica* (A), *A. acutiflora* (B) e *A. dolabripetala* (C). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

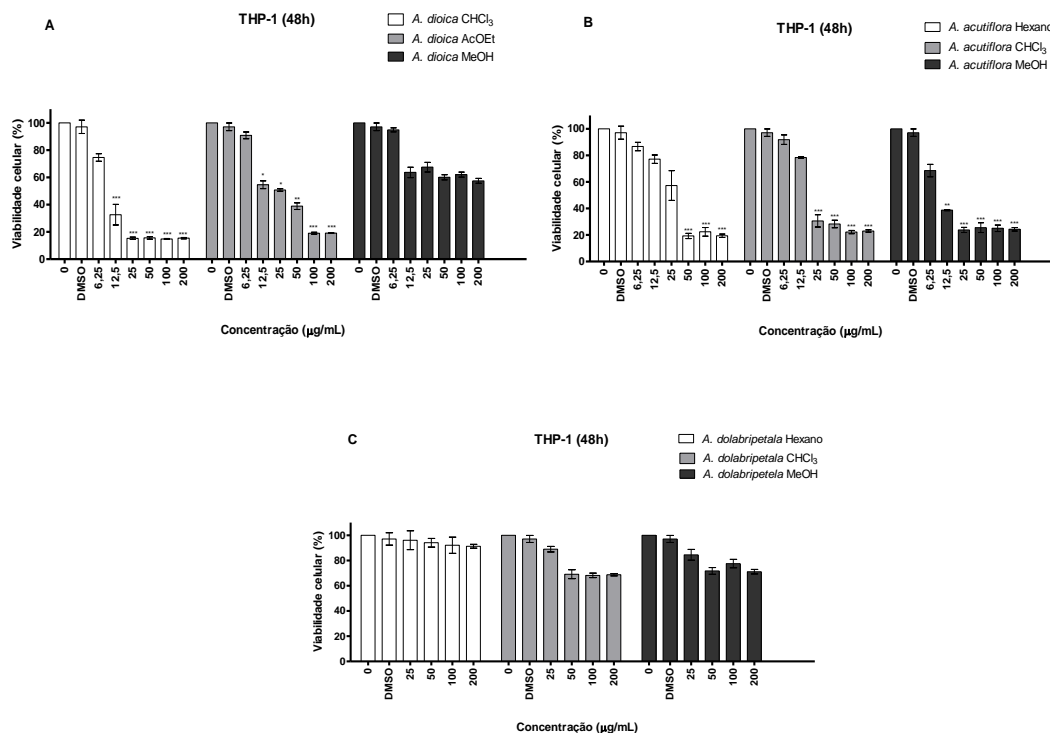


Figura 93. Avaliação da viabilidade celular da linhagem THP-1, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as frações de *A. dioica* (A), *A. acutiflora* (B) e *A. dolabripetala* (C). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

Com a finalidade de verificar a seletividade das frações para as células neoplásicas, foi avaliada a viabilidade em células de origem não tumoral. No caso, foram utilizadas as células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), submetidas às mesmas condições experimentais através do ensaio de MTT, como mostrado na **Figura 94, p. 172**.

Segundo as análises, as frações resultantes das espécies *A. dioica* e *A. acutiflora* apresentaram a capacidade de reduzir de maneira significativa a viabilidade das células mononucleares, após 48 horas de incubação de maneira concentração dependente.

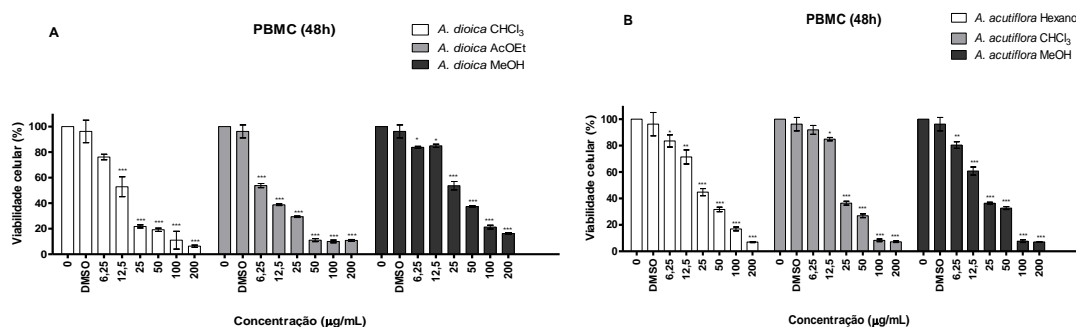


Figura 94. Avaliação da viabilidade celular das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as frações de *A. dioica* (A) e *A. acutiflora* (B). O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

Portanto, para efeito de uma melhor comparação da atividade entre as frações, foi calculada a concentração inibitória necessária para a morte de 50% das células (IC₅₀). Os valores de IC₅₀ referentes para cada fração em cultura de células neoplásicas e as PBMCs, expressos em µg/mL, estão representados na **Tabela 30**.

Tabela 30. IC₅₀ (µg/mL) das frações sobre a viabilidade celular baseado no ensaio de citotoxicidade celular por MTT.

Frações	IC ₅₀ (µg/mL)		
	U-937	THP-1	PBMC
<i>A. dioica</i> CHCl ₃	6,83±1,05	10,01±1,10	13,42 ±1,06
<i>A. dioica</i> AcOEt	10,97±1,12	26,66±1,10	8,81±1,08
<i>A. dioica</i> MeOH	34,24±1,27	>200	33,93±1,06
<i>A. acutiflora</i> Hexano	6,07±1,20	28,57±1,09	24,45±1,03
<i>A. acutiflora</i> CHCl ₃	6,99±1,11	24,70±1,13	23,85±1,06
<i>A. acutiflora</i> MeOH	6,07±1,17	12,07±1,19	18,91±1,06
<i>A. dolabripetala</i> Hexano	>200	>200	ND*
<i>A. dolabripetala</i> CHCl ₃	77,29±1,16	>200	ND*
<i>A. dolabripetala</i> MeOH	112,3±1,20	>200	ND*

ND*: não determinado

As frações obtidas a partir de espécies vegetais são consideradas ativas quando exibem $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ (SUFFNESS & PEZZUTO, 1990). Assim, a potência citotóxica das frações em clorofórmio e em acetato de etila da espécie *A. dioica* na linhagem U-937 e, a fração em clorofórmio na linhagem THP-1, é posto em destaque, e, principalmente, a fração em clorofórmio, por apresentar $IC_{50} = 6,83 \pm 1,05 \mu\text{g/mL}$ na U-937. Da mesma maneira, é notória a forte atividade das frações hexânica, clorofórmica e metanólica da espécie *A. acutiflora*, com IC_{50} na faixa de 6-7 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem U-937. As frações da espécie *A. dolabripetala* apresentaram IC_{50} maior que 20 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem U-937 e THP-1, portanto, consideradas inativas, sendo excluídas do ensaio de citotoxicidade com as células PBMCs e dos ensaios subsequentes. A linhagem de célula neoplásica U-937 foi mais sensível do que a THP-1 para todas as frações testadas das três espécies.

Um estudo feito por Martins (2014) com as frações em hexano, diclorometano e etanol das raízes de *A. dioica* também demonstrou a potente atividade citotóxica desta espécie, principalmente, da fração em diclorometano na linhagens tumorais de melanoma murino ($IC_{50} = 3,44 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, B16-F10), adenocarcinoma de próstata ($IC_{50} = 3,22 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$, PC-3), adenocarcinoma de rim ($IC_{50} = 5,02 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$, 786-0), adenocarcinoma de cólon ($IC_{50} = 4,87 \pm 1,72 \mu\text{g/mL}$, HT-29), adenocarcinoma de mama ($IC_{50} = 2,13 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$, MCF-7), melanoma humano ($IC_{50} = 3,43 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$, UACC-62), adenocarcinoma de ovário resistente ($IC_{50} = 0,24 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$, NCI-ADR-RES), fibroblasto murino ($IC_{50} = 4,60 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$, NHI-3T3) (MARTINS, 2014).

Entretanto, na avaliação das frações com atividade anticâncer é geralmente utilizado o índice de seletividade (IS). O IS corresponde à razão entre o valor da IC_{50} de cada amostra-teste na linhagem de células não tumorais e o valor da IC_{50} de cada amostra na linhagem de células neoplásicas. As amostras com $IS \geq 2,0$ serão consideradas seletivas, inferindo-se que a amostra é duas vezes mais citotóxica para a linhagem neoplásica em relação às células normais (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991). A **Tabela 31, p. 174** indica os valores de IS (Índice de Seletividade) para as frações avaliadas em relação à linhagem de células não tumoral PBMC.

Tabela 31. Índice de Seletividade das amostras estudadas nas linhagens neoplásicas U-937 e THP-1.

Frações	Índice de seletividade (IS)	
	U-937	THP-1
<i>A. dioica</i> CHCl ₃	1,96	1,34
<i>A. dioica</i> AcOEt	0,80	0,33
<i>A. dioica</i> MeOH	0,99	<0,16
<i>A. acutiflora</i> Hexano	4,02	0,85
<i>A. acutiflora</i> CHCl ₃	3,41	0,96
<i>A. acutiflora</i> MeOH	3,11	1,56

Quando verificado os valores de IS das frações testadas referentes às espécies *A. dioica* e *A. acutiflora*, observa-se que as frações de *A. acutiflora* exibiram bons IS para a linhagem U-937.

Uma vez que as frações de *A. acutiflora* e *A. dolabripetala* não possuem estudos que demonstram seu potencial citotóxico em células tumorais humanas, os dados obtidos fazem o primeiro registro de citotoxicidade *in vitro* em linhagens neoplásicas humanas e de origem não tumoral para estas espécies e, corroboram agregando mais conhecimento junto às outras espécies deste mesmo gênero que já foram estudadas.

Um estudo de Chen e colaboradores (2012b) demonstrou que a fração em acetato de etila das sementes de *A. squamosa* apresentou IC₅₀ = 3,2 µg/mL nas células A-549 (adenocarcinoma de pulmão) e IC₅₀ = 2,5 x 10⁻¹ µg/mL nas células MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Já na espécie *A. muricata*, Zorofchian e colaboradores (2014) relatou que o extrato em acetato de etila das folhas exibiu valores de IC₅₀ 11,43 ± 1,87 µg/mL e 8,98 ± 1,24 µg/mL nas células HT-29 (carcinoma coloretal) e HCT-116 (carcinoma coloretal), respectivamente. Outro estudo, com o extrato etanólico das folhas de *A. muricata*, apresentou IC₅₀ = 2,5 µg/mL na linhagem K562 (leucemia mieloide crônica) (EZIRIM et al., 2013).

Assim, os resultados obtidos nesta triagem de citotoxicidade forneceram informações preliminares importantes para ajudar a selecionar as frações destas espécies com maior atividade antitumoral para os estudos futuros.

5.2.2 Avaliação da apoptose pela análise da fragmentação do DNA

A morte celular envolvida em consequência da atividade citotóxica dessas frações pode ser compreendida em dois dos processos mais conhecidos e bem estudados, a necrose ou apoptose. Sabe-se que estes dois mecanismos de morte celular são caracterizados por diferenças morfológicas e bioquímicas.

Por ser um processo seletivo central para diversos processos biológicos sem provocar resposta inflamatória no local, o desenvolvimento de novos fármacos quimioterápicos tem enfoque na indução de apoptose. Sendo assim, para avaliar a morte celular induzida por estas frações de forma bem simples e dar seguimento ao estudo fitoquímico, escolhemos aplicar uma metodologia que analisa a fragmentação do DNA, realizada por eletroforese em gel de agarose que verifica de maneira qualitativa estes eventos.

A fragmentação internucleossomal do DNA em oligonucleotídeos no padrão *laddering*, por consequência da ação das endonucleases intracelulares ativadas, é uma característica bioquímica chave da apoptose (ABEND, 2003). Assim, como a fragmentação do DNA é um evento tardio no processo de apoptose, nesse experimento, as células U-937 e THP-1 foram incubadas durante 24 horas com as respectivas concentrações das frações mais promissoras das espécies *A. dioica* (CHCl₃, AcOEt, MeOH) e *A. acutiflora* (Hexano, CHCl₃, MeOH), que resultaria o processo de morte celular neste período de tempo.

Na **Figura 95, p. 176**, observa-se, após o tratamento de 24 horas, que todas as frações na concentração de 12,5 µg/mL foram capazes de induzir a fragmentação do DNA na linhagem U-937, deixando claro a presença de fragmentos oligonucleossomais, resultantes da ativação das endonucleases, que quebram o DNA nos nucleossomas e dá origem a um padrão de

fragmentação repetitivo, típico de apoptose. A concentração de 6,25 µg/mL (dados não mostrados) não foi capaz de produzir nenhum efeito sobre as células, sendo equivalente ao controle, por isso a dose foi dobrada.

No controle (CTL), onde as células foram cultivadas somente com meio de cultura DMEM/F-12 suplementado com 20 µg/mL de gentamicina e 10 % de soro fetal bovino, as células permanecem vivas, e por isso não é aferido padrão algum de fragmentação. Ao contrário, no processo de necrose, se veria a quebra randômica do DNA, o que não gera qualquer padrão repetitivo.

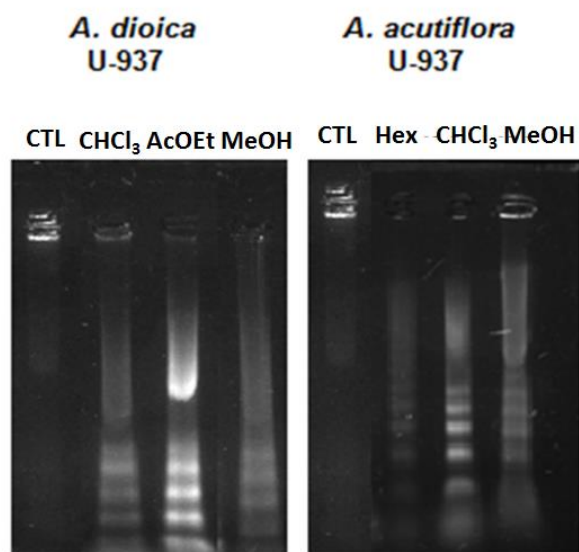


Figura 95. Eletroforese em gel de agarose para detecção da fragmentação do DNA em oligonucleotídeos na linhagem U-937, após tratamento com 12,5 µg/mL das frações das raízes de *A. dioica* (CHCl₃, AcOEt, MeOH) e das folhas de *A. acutiflora* (Hexano, CHCl₃, MeOH) durante 24 horas. CTL= controle.

Na linhagem THP-1, o efeito destas frações foi primeiramente investigado na concentração de 6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL (dados não mostrados), porém, essas concentrações não foram capazes de produzir nenhum efeito sobre as células. Nota-se na **Figura 96, p. 177**, que apenas na concentração de 25 µg/mL, após o tratamento de 24 horas com as frações de *A. dioica* e *A. acutiflora*, foi verificado o padrão de fragmentação característico do processo de apoptose, evidenciando uma maior resistência dessa linhagem. Este ensaio com a linhagem THP-1 não foi realizado com a fração MeOH de *A. dioica*, pois esta apresentou IC₅₀ >200 µg/mL.

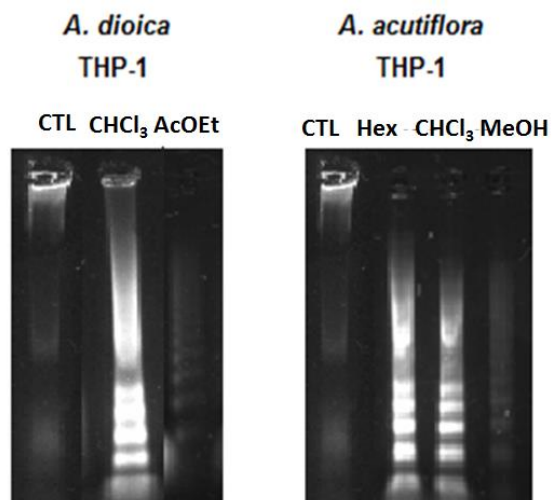


Figura 96. Eletroforese em gel de agarose para detecção de fragmentação do DNA em oligonucleotídeos na linhagem THP-1, após tratamento com 25 µg/mL das frações das raízes de *A. dioica* (CHCl₃, AcOEt) e das folhas de *A. acutiflora* (Hexano, CHCl₃, MeOH) durante 24 horas. CTL= controle.

Estes registros são as primeiras presunções de morte celular por apoptose induzida pelas frações das espécies *A. dioica* e *A. acutiflora*, embora outras avaliações em diferentes espécies de *Annona* também demonstraram que seus respectivos extratos e frações foram capazes de induzirem apoptose. Por exemplo, Ezirim e colaboradores (2013) mostraram que o extrato etanólico de *A. muricata* induziu apoptose nas células K562 (leucemia mieloide crônica) através da atividade de caspase-3. Já Pieme e colaboradores (2014), ao avaliarem o extrato etanólico das folhas e raízes de *A. muricata* mostraram a indução de apoptose associando a despolarização de membrana mitocondrial e com a avaliação do ciclo celular nas células HL-60 (leucemia promielocítica). Para a espécie *A. squamosa*, há relatos em que o extrato aquoso das sementes induz apoptose nas células AK-5 (câncer histiocítico), demonstrado pela atividade de caspase-3, fragmentação de DNA e pelo ensaio de Anexina-V (PARDHASARADHI et al., 2004).

As observações descritas acima em conjunto com a análise dos valores de IC₅₀ verificados e principalmente, com perfil cromatográfico e relação quantidade de massa *versus* complexidade de cada fração, norteou a escolha da fração clorofórmica da espécie *A. dioica* para o estudo preliminar

fitoquímico, por mostrar-se com um potencial eficiente e por representar mais fielmente as acetogeninas como componentes químicos, para que assim, além de ser notificada a atividade biológica desta fração, fosse também reconhecido o metabólito ou metabólitos que contribuíram para este propósito.

5.3 Avaliação da atividade biológica das acetogeninas

5.3.1 Avaliação do efeito das acetogeninas na viabilidade celular de células neoplásicas e de origem não tumoral

Com fundamentos embasados na atividade *in vitro* provada, a fração clorofórmica da espécie *A. dioica* se apresentou mais adequada para uma análise químico-farmacológica, onde foi rastreada a presença das acetogeninas (ACGs). O estudo fitoquímico desta fração conduziu ao isolamento de 6 ACGs (**item 5.1, p.101**), que somadas às substâncias cedidas, paraguaína e paraguaína acetilada, representaram três tipos diferentes de esqueletos básicos para o estudo da atividade biológica e possível relação estrutura-atividade (REA): (a) esqueleto mono-tetrahydrofurânico (THF) - annonacina e isoannonacina, (b) esqueleto bis-tetrahydrofurânico (THF) adjacente - esquamocina, motrilina, paraguaína e paraguaína acetilada; (c) esqueleto bis-tetrahydrofurânico (THF) não adjacente – cherimolina-1 e isocherimolina-1. A substância paraguaína, até o momento, só foi isolada nas raízes da espécie *A. dioica* (**Figura 102, p. 186**) (VEGA, 2006).

Apesar de alguns estudos já terem documentado a atividade citotóxica das ACGs, incluso da motrilina, esquamocina, annonacina, isoannonacina, cherimolina-1 e isocherimolina-1, em vários tipos de linhagens de células tumorais mostrando seu alto potencial citotóxico, como pode ser analisado no levantamento bibliográfico (**Tabela 3, p. 39**), este trabalho preconizou a investigação da REA estabelecendo dados sobre a citotoxicidade em células neoplásicas e não tumorais correlacionando com o mecanismo da indução de morte celular envolvido e utilizando as mesmas condições experimentais. Esta condição permite uma melhor avaliação da REA.

Com o objetivo de fornecer dados que corroborem outros trabalhos de REA citotóxica das ACGs e direcionar o despertado interesse associado na busca por uma melhor atividade citotóxica para certos tipos de câncer e que fornecem

um bom índice de seletividade, foi realizado um estudo de citotoxicidade em linhagens de células neoplásicas ainda não testadas para ACGs.

Desse modo, atividade citotóxica das ACGs foi avaliada sobre a viabilidade das linhagens neoplásicas humanas U-937 (linfoma histiocítico), THP-1 (leucemia monocítica aguda), COLO 205 (adenocarcinoma de cólon) e NCI-H460 (carcinoma de pulmão), no tempo de 48 horas de incubação de maneira concentração dependente através do micro-ensaio colorimétrico utilizando MTT, um dos ensaios mais utilizados na rotina da triagem de fármacos antitumorais pelo Instituto Nacional do Câncer (MOSMMANN, 1983).

Analisando os resultados apresentados nas **Figuras 97-100, p. 179-183**, verifica-se, de forma geral, que os diversos tipos de ACGs avaliadas exibem distintos níveis de atividade citotóxica para diferentes tipos de células neoplásicas humanas. O DMSO (dimetilsulfóxido), veículo utilizado para a dissolução das substâncias, não afetou a viabilidade celular das linhagens testadas e, o emprego deste como solvente nas frações não foi fator interferente nos resultados, pois os dados obtidos mostram leitura semelhantes entre DMSO e o controle celular.

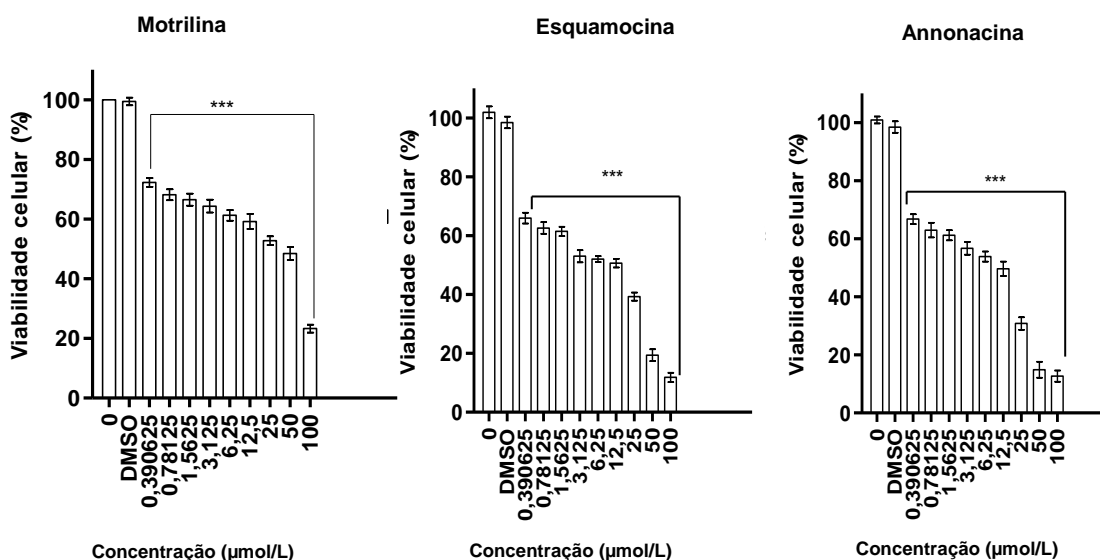


Figura 97. Avaliação da viabilidade celular da linhagem U-937, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

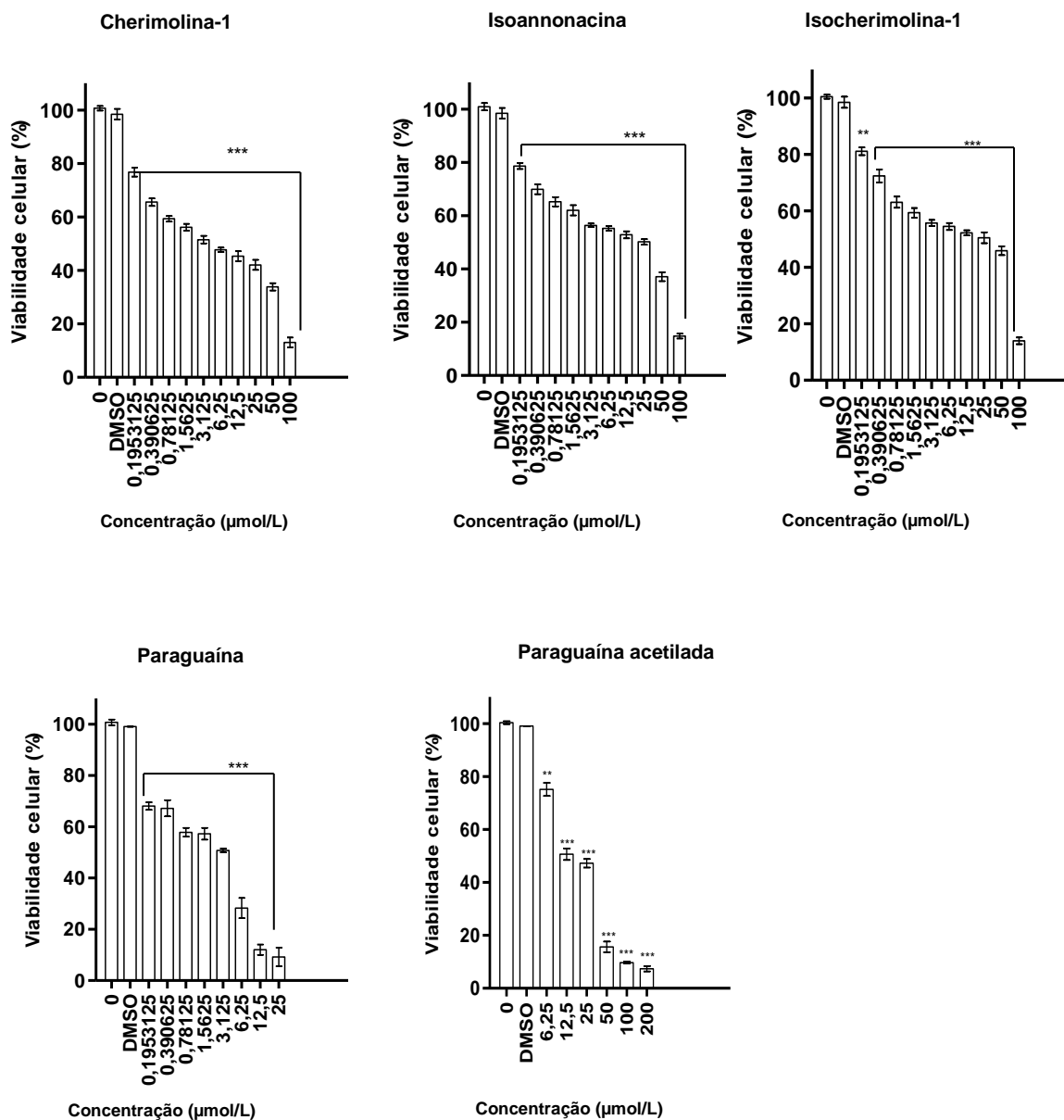


Figura 97. Avaliação da viabilidade celular da linhagem U-937, pelo ensaio de MTT ($n=3$), após 48 horas de incubac o com as substâncias. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero). (Cont.)

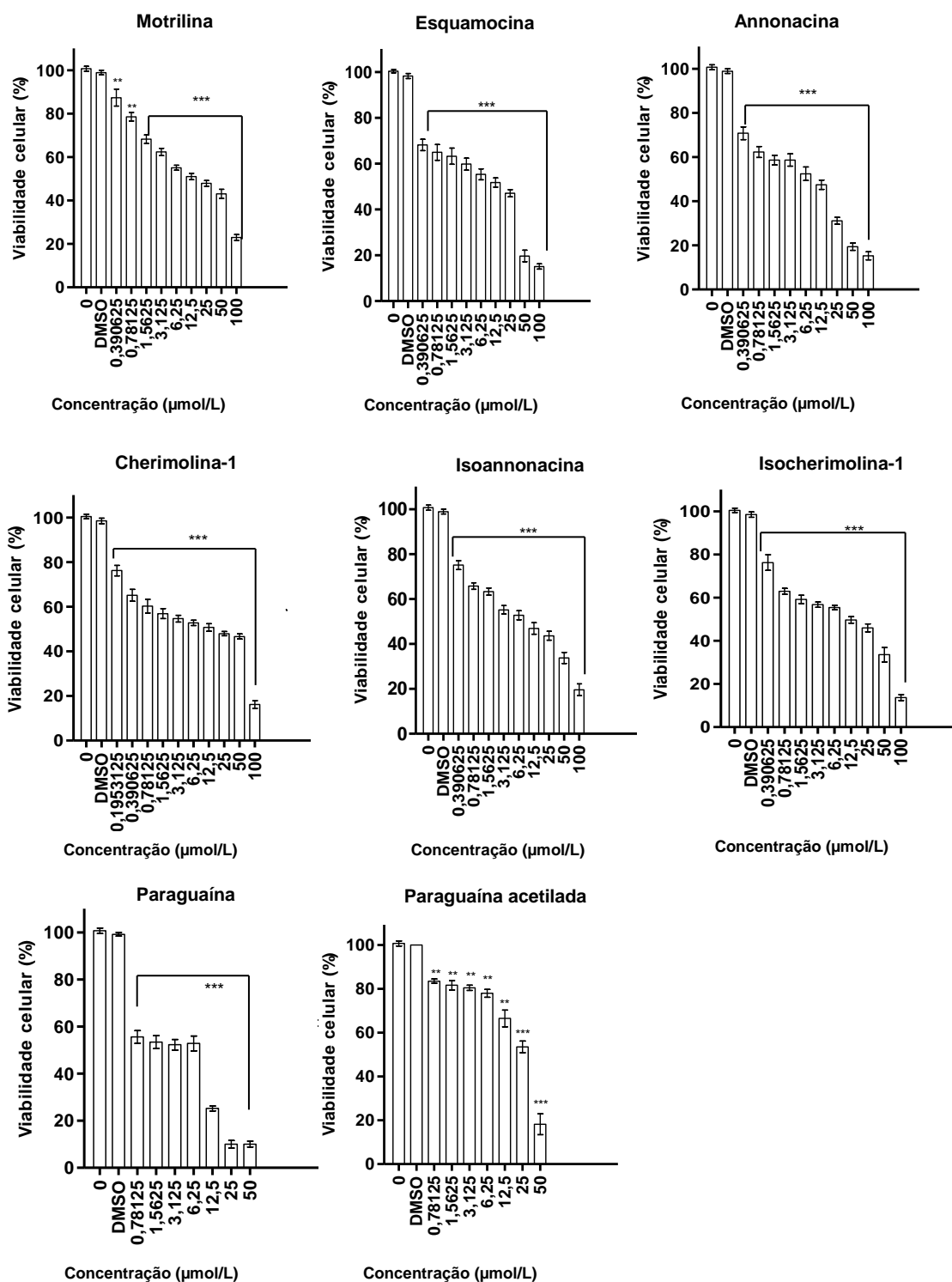


Figura 98. Avalia o da viabilidade celular da linhagem THP-1, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubac o com as substâncias. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentra o do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em rela o ao controle negativo (zero).

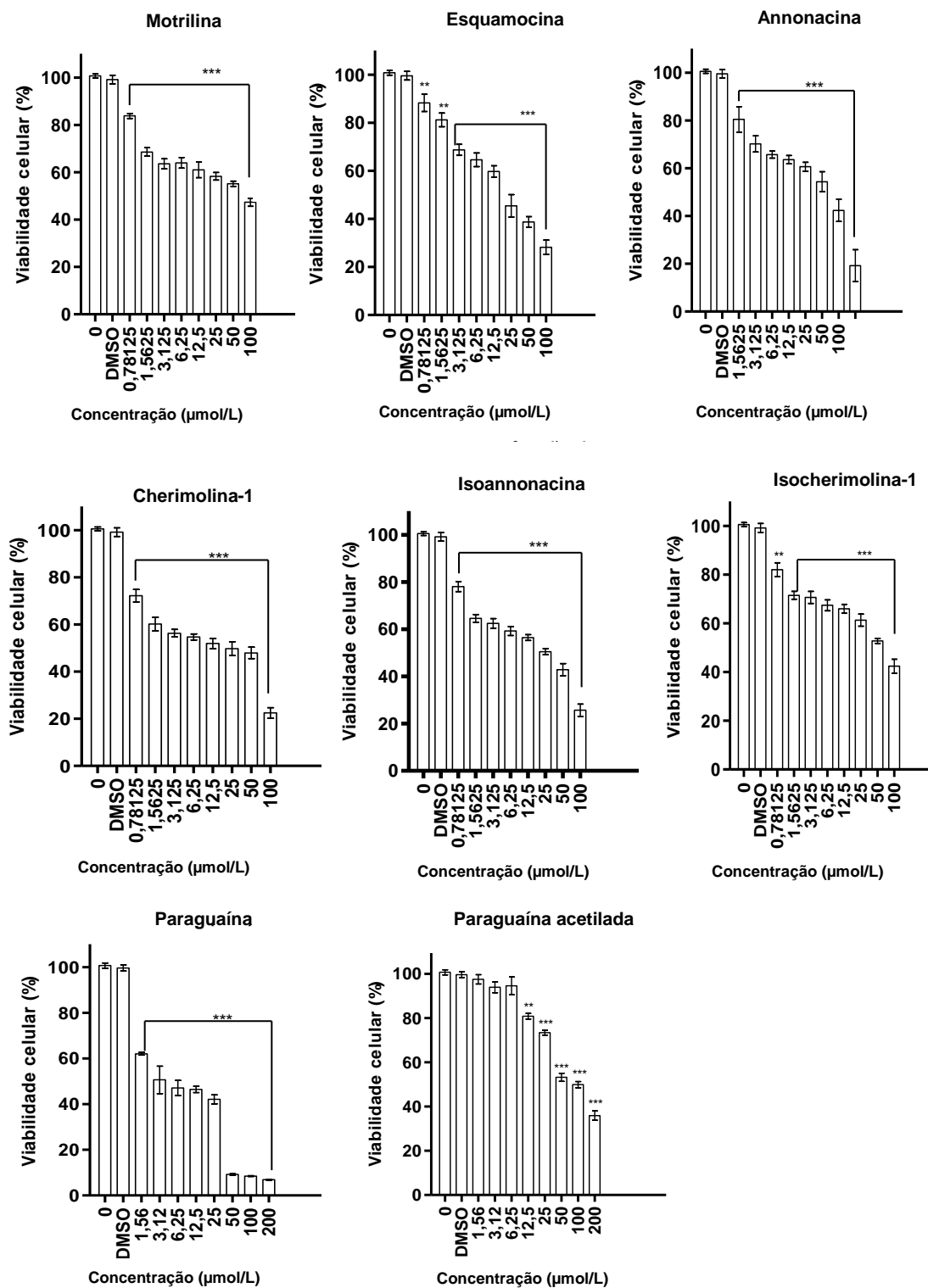


Figura 99. Avaliação da viabilidade celular da linhagem NCI-H460, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias. A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

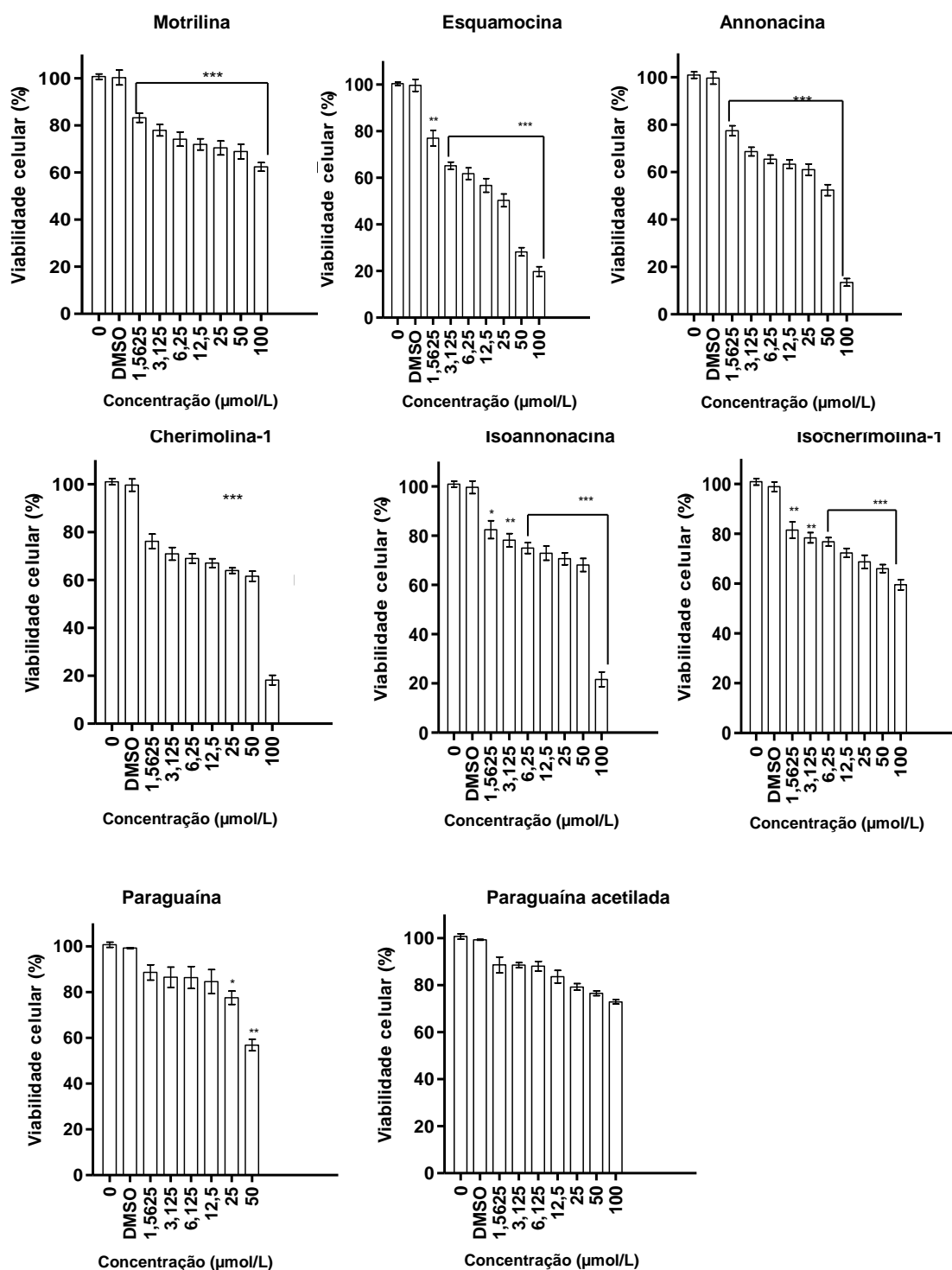


Figura 100. Avalia o da viabilidade celular da linhagem COLO 205, pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubac o com as substâncias. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentra o do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em rela o ao controle negativo (zero).

Com a finalidade de verificar a seletividade das substâncias para as células neoplásicas, foi avaliada a viabilidade em células de origem não tumoral. No caso, foram utilizadas as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), nas mesmas condições através do ensaio de MTT, como mostrado na **Figura 101**.

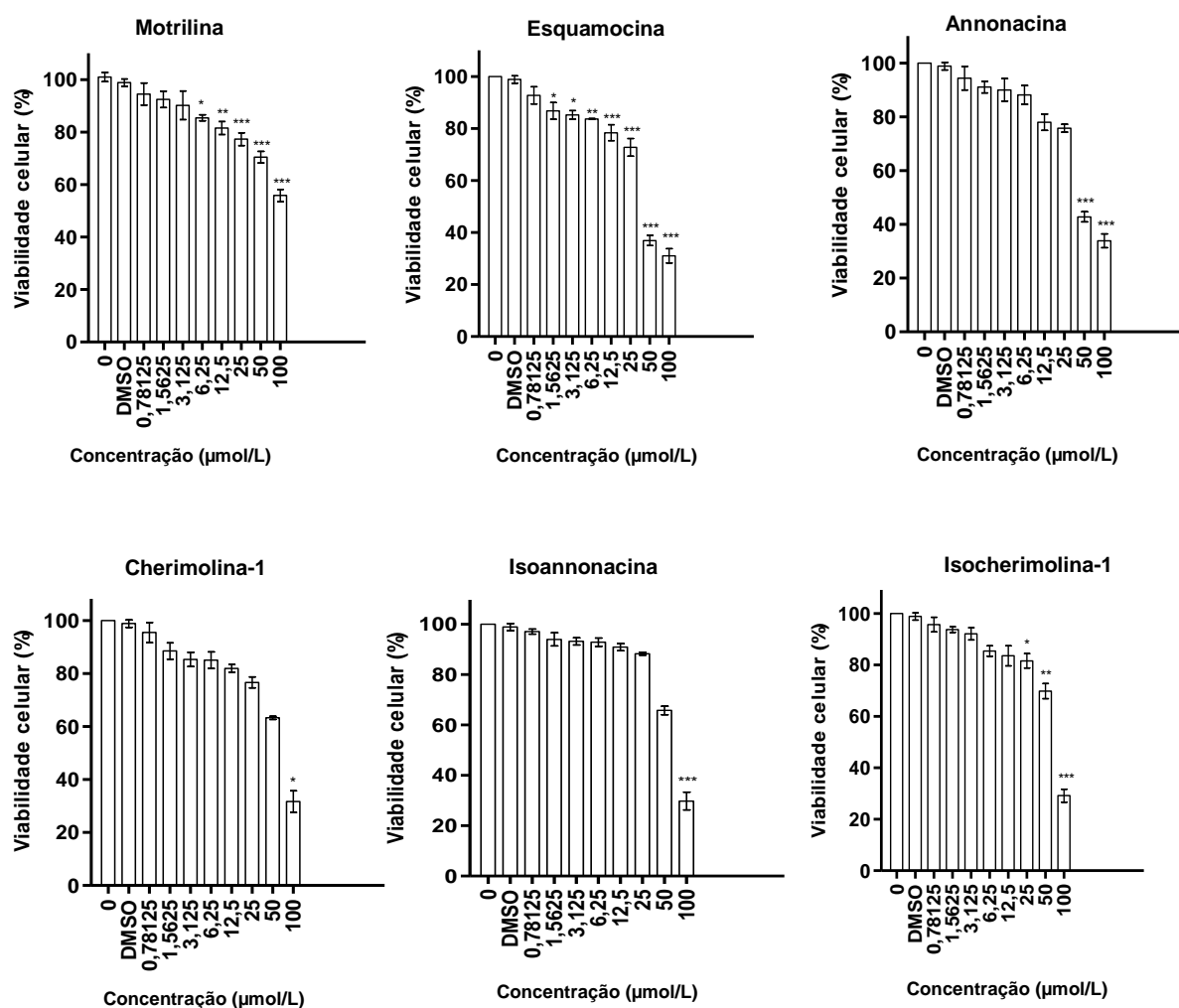


Figura 101. Avaliação da viabilidade celular da linhagem de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubação com as substâncias. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero).

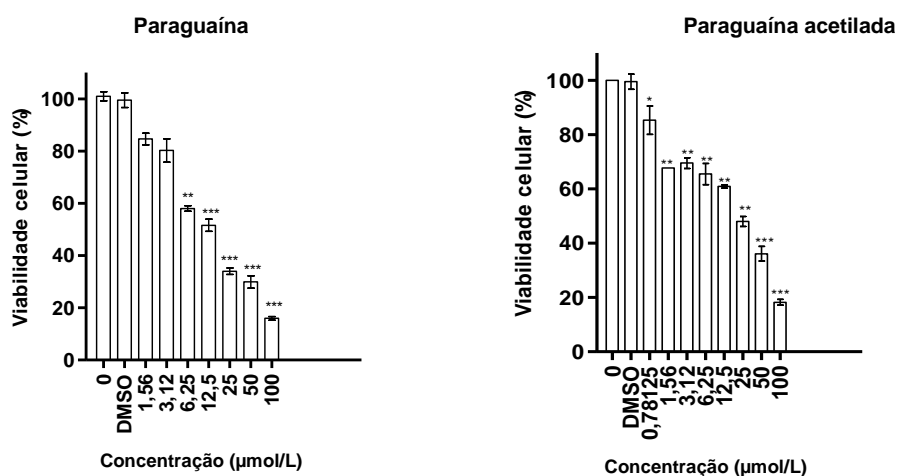


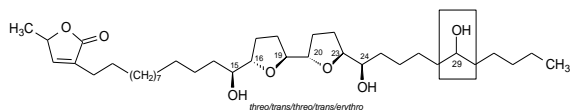
Figura 101. Avaliação da viabilidade celular da linhagem de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), pelo ensaio de MTT (n=3), após 48 horas de incubaq o com as substâncias. O zero significa o controle negativo do teste (células e meio de cultura). A concentração do DMSO foi de 0,2%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (zero). (Cont.)

Para efeito de uma melhor comparação da atividade entre as substâncias e relacioná-las com suas estruturas químicas, foi calculada a concentração inibitória necessária para a morte de 50% das células (IC₅₀). Os valores de IC₅₀ referentes para cada substância em cultura de células neoplásicas e as PBMCs, expressos em  mol/L, estão representados na **Tabela 32, p. 186**. As estruturas químicas das substâncias testadas se encontram na **Figura 102, p. 186**.

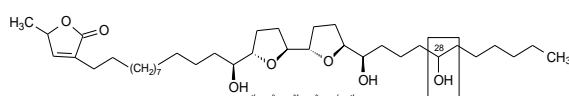
Tabela 32. Avaliação da atividade citotóxica das ACGs em diferentes linhagens celulares. Resultados expressos em IC₅₀ (μmol/L).

Acetogenina	IC ₅₀ (μmol/L)				
	U-937	THP-1	NCI-H460	COLO 205	PBMC
Motrilina	21,17±1,15	15,26±1,09	60,12±1,26	>100	>100
Esquamocina	6,39±1,12	8,48±1,10	20,64±1,06	15,63±1,06	42,19±1,08
Annonacina	6,00±1,11	6,22±1,11	20,09±1,10	26,20±1,11	49,52±1,08
Cherimolina-1	6,09±1,11	10,07±1,19	14,90±1,19	37,31±1,14	66,72±1,12
Isoannonacina	10,53±1,14	9,17±1,11	18,21±1,14	54,05±1,14	67,02±1,04
Isocherimolina-1	11,49±1,16	9,05±1,13	56,17±1,18	>100	69,67±1,18
Paraguáina	2,30±1,22	3,63±1,21	6,61±1,18	62,38±1,28	13,36 ±1,10
Paraguáina acetilada	16,12±1,20	20,40±1,13	85,56±1,06	>100	20,06±1,17
Doxorrubicina	2,25±1,03	1,96±1,15	>100	>100	26,92 ±1,21

ACETOGENINAS BIS-THF ADJACENTES

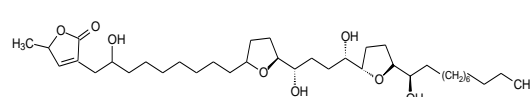


Motrilina

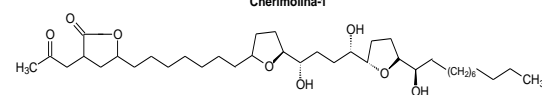


Esquamocina

ACETOGENINAS BIS-THF NÃO-ADJACENTES

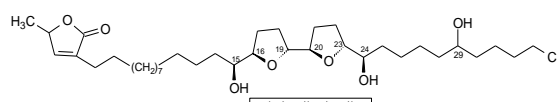


Cherimolina-1

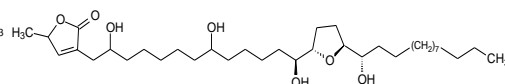


Isocherimolina-1

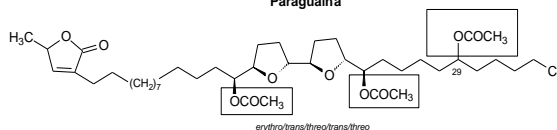
ACETOGENINAS MONO-THF



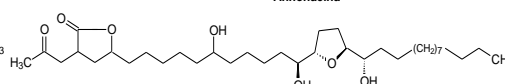
Paraguáina



Annonacina



Paraguáina acetilada



Isoannonacina

Figura 102. Acetogeninas isoladas de *A. dioica*.

Como mostra a **Tabela 32, p. 186** os dados da atividade citotóxica das ACGs apresentam valores de IC_{50} entre 2,30 - >100 $\mu\text{mol/L}$. A fim de estabelecer um critério para notificar a relevância do potencial citotóxico das ACGs em questão, empregamos os parâmetros do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), que em seu programa de triagem de fármacos anticâncer, considera como potente atividade antineoplásica os valores de IC_{50} menores 10 $\mu\text{mol/L}$ ou o equivalente a menos que 4,0 - 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (SUFFNESS & DOUROS, 1982).

Em geral, estudos já descritos na literatura embasados na tentativa de estabelecer a relação estrutura-atividade das ACGs citotóxicas, mostram o grupo bis-THF adjacente como o mais potente, seguido do bis-THF não adjacente. As ACGs mono-THF mostram potência intermediária. Portanto, analisando o efeito citotóxico das ACGs bis-THF adjacentes motrilina, esquamocina, paraguaína e seu derivado acetilado, a paraguaína foi a ACG que apresentou maior atividade citotóxica neste grupo, bem como, quando comparada com as ACGs dos grupos mono-THF e bis-THF não adjacentes testadas.

A paraguaína exibiu elevado potencial citotóxico nas linhagens U-937 ($IC_{50} = 2,30 \pm 1,22 \mu\text{mol/L}$), THP-1 ($IC_{50} = 3,63 \pm 1,21 \mu\text{mol/L}$) e NCI-H460 ($IC_{50} = 6,61 \pm 1,18 \mu\text{mol/L}$) por apresentar valores IC_{50} expressivamente menores que 10 $\mu\text{mol/L}$. Entre todas as moléculas testadas, a paraguaína foi a única substância ativa para a linhagem NCI-H460, conhecida por ser uma linhagem celular resistente, incluindo para o controle positivo, doxorubicina, deste ensaio, como demonstrado por PESIC e colaboradores (2006). Observa-se que a paraguaína quando acetilada tem atividade reduzida, apresentando IC_{50} acima de 10 $\mu\text{mol/L}$ nas quatro linhagens neoplásicas. Outros trabalhos que fizeram reações de acetilações em ACGs, similarmente retrataram a mesma tendência (ROBLOT et al., 1993; SAAD et al., 1991).

A ACG bis-THF esquamocina, foi mais citotóxica em todas as linhagens quando comparada à motrilina, e apresentou maior citotoxicidade para as linhagens U-937 ($IC_{50} = 6,39 \pm 1,12 \mu\text{mol/L}$) e THP-1 ($IC_{50} = 8,48 \pm 1,10 \mu\text{mol/L}$).

No entanto, podemos observar na **Figura 102, p. 186** que paraguaína, motrilina e esquamocina são bastante parecidas estruturalmente. A paraguaína

tem uma estrutura similar a motrilina, apresentando diferenças apenas na configuração relativa dos centros quirais do sistema bis-THF entre os átomos de carbonos C-15 e C-16/ C-16 e C-19/ C-19 e C-20/ C-20 e C-23/ C-23 e C-24, sendo *erythro/trans/threo/trans/threo*, respectivamente. Já a motrilina possui configuração *threo/trans/threo/trans/erythro* entre os átomos de carbonos C-15 e C-16/ C-16 e C-19/ C-19 e C-20/ C-20 e C-23/ C-23 e C-24, respectivamente.

Em geral, as ACGs bis-THF adjacentes *threo/trans/threo/trans/erythro* são as mais abundantes na natureza e, como consequência possuem mais estudos sobre a relação estrutura-atividade, mantendo sempre o perfil de serem as mais ativas quando comparadas com outras configurações relativas de ACGs deste grupo como *threo/cis/threo/cis/erythro* e *threo/trans/threo/trans/threo* (Miyoshi et al., 1998). Em contra partida, as ACGs bis-THF adjacentes *erythro/trans/threo/trans/threo* são raramente isoladas e até o momento não têm dados relativos à atividade citotóxica, sendo este o primeiro relato.

Porém, nesta investigação, os dados indicam que a paraguína com configuração relativa *erythro/trans/threo/trans/threo* exibiu valores de IC₅₀ atraentes despertando outras perspectivas a respeito da influencia da configuração relativa dos centros quirais na atividade.

Em relação à diferença estrutural entre a esquamocina e a motrilina, ambas de configuração *threo/trans/threo/trans/erythro*, a única alteração é a posição de um dos grupos hidroxila. Na motrilina, o grupo hidroxila está no átomo de C-29, enquanto a esquamocina, apresenta o grupo hidroxila no átomo de C-28 (**Figura 102, p. 186**). Esta mudança de posição do grupo hidroxila reduziu significativamente o efeito da atividade citotóxica da motrilina nas quatro linhagens de células neoplásicas avaliadas.

Esta averiguação também foi demonstrada por Tormo e colaboradores (2005) que detalhou este mesmo tipo de análise comparando a rolliniastatina-2 (**18**) (hidroxilada no átomo de C-4) (**Figura 103, p. 189**), esquamocina (hidroxilada no átomo de C-28) e motrilina (hidroxilada no átomo de C-29) nas linhagens tumorais MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HepG2 (carcinoma hepatocelular), HT-29 (carcinoma coloretal) e A-549 (adenocarcinoma de pulmão), onde demonstrou, como regra geral, que quando a estrutura é

idêntica e a única diferença entre as moléculas é a mudança na posição da hidroxila, a atividade citotóxica segue a seguinte ordem: C-28 > C-4 > C-29.

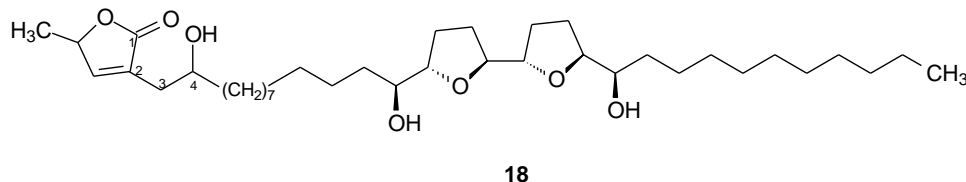


Figura 103. Estrutura da acetogenina citotóxica rolliniastatina-2 (**18**).

A ACG com sistema bis-THF não adjacente cherimolina-1 exibiu boa atividade para a linhagem U-937 ($IC_{50} = 6,09 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$), equivalente a bis-THF adjacente esquamocina e a mono-THF annonacina. Em contrapartida, a isocherimolina-1, não foi considerada ativa para a linhagem U-937 ($IC_{50} = 11,49 \pm 1,16 \mu\text{mol/L}$), porém manifestou atividade para a THP-1 ($IC_{50} = 9,05 \pm 1,13 \mu\text{mol/L}$). Ambas ACGs não foram ativas nas linhagens NCI-H460 e COLO 205, mas independente disso a cherimolina-1 foi mais ativa para estas duas linhagens que a isocherimolina-1.

Investigando a atividade da ACG mono-THF annonacina, constata-se que ela se comporta tão eficiente quanto às bis-THF adjacentes e as bis-THF não adjacentes nas linhagens U-937 ($IC_{50} = 6,00 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$) e THP-1 ($IC_{50} = 6,22 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$), apesar de estudos prévios sugerirem que as ACGs mono-THF são sempre menos potentes que as ACGs bis-THF. Porém, nossos dados demonstraram que este grupo de substâncias também pode exercer uma atividade citotóxica eficaz no mesmo nível das ACGs bis-THF, corroborando com alguns trabalhos que também ratificaram estes resultados (TORMO et al., 2005; YANG et al., 2009).

Quando comparada à isoannonacina, a annonacina apresentou maior atividade citotóxica. Novamente, é observada a mesma relação descrita anteriormente entre a cherimolina-1 e seu isotipo isocherimolina-1.

Ao analisar outros trabalhos que compararam a citotoxicidade de ACGs com seu respectivo esqueleto iso-ACG, nota-se que dependendo da linhagem celular, uma pode ser mais ativa que a outra, logo não existe um preceito indicativo que

revele um padrão de resposta à citotoxicidade entre elas, validando, desta maneira, estes dados (WU et al., 1995d; ZENG et al., 1996a; XU et al., 1989; WOO et al., 1999; DURET et al., 1994).

Assim, este estudo mostra que as iso-ACGs isoannonacina e isocherimolina-1 mostraram menor potencia citotóxica para as linhagens U-937, THP-1, NCI-H460 e COLO 205, salvo duas exceções: isocherimolina-1 na linhagem THP-1 e isoannonacina em NCI-H460.

A respeito do controle positivo utilizado, a doxorrubicina, um fármaco usado na clínica para terapia de alguns tipos de câncer como carcinoma de pulmão e mama, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, tumor de Wilms, leucemia linfoblástica aguda e leucemia mieloblástica aguda, nota-se que ela foi mais eficaz do que todas as acetogeninas testadas nas linhagens U-937 e THP-1, contudo a paraguaína expressou valores de IC_{50} bastante equivalentes para estas duas linhagens, além de apresentar uma excepcional atividade na linhagem NCI-H460 ($IC_{50} = 6,61 \pm 1,18 \mu\text{mol/L}$) em relação à doxorrubicina ($IC_{50} = >100 \mu\text{mol/L}$).

Em resumo, a análise completa dos dados permite deduzir que as linhagens tumorais mais sensíveis a estas ACGs foram U-937 e THP-1 tanto para as ACGs bis-THF adjacentes quanto para bis-THF não adjacente e mono-THF. Sem dúvida, as linhagens resistentes NCI-H460 e COLO 205 não são sensíveis a estas ACGs, com exceção a paraguaína em NCI-H460. É interessante apontar, que a configuração relativa dos centros assimétricos é um fator essencial para a atividade, e a presença de um grupo hidroxila na posição C-28 incrementa a atividade citotóxica.

Apesar de terem sido realizados vários trabalhos sobre a atividade citotóxica das ACGs em diversas linhagens de células tumorais, ainda não foi possível estabelecer de maneira definitiva uma REA devido à complexidade e variedade de modelos estruturais que compõem as ACGs e, deve se levar em conta que segundo a linhagem tumoral testada, as ACGs se comportam de maneira distinta anunciando tendências citotóxicas diferentes pelo fato das células apresentarem mecanismos bioquímicos complexos diferenciados, segundo o tipo de linhagem tumoral a ser considerada. Isto posto, a aplicação das

ACGs como possíveis agentes antitumorais requer um conhecimento maior das condições metabólicas nas quais se desenvolve cada tipo de tumor.

Após ser provada a citotoxicidade das ACGs, estas substâncias foram avaliadas neste trabalho, pela primeira vez na literatura, quanto a citotoxicidade em linhagens de células normais humanas (PBMCs) e, sendo estabelecido o índice de seletividade (IS). O IS para as ACGs motrilina, esquamocina, annonacina, cherimolina-1, isoannonacina, isocherimolina-1, paraguaína, paraguaína acetilada e o controle positivo doxorrubicina são apresentados na **Tabela 33**.

Tabela 33. Índice de Seletividade das amostras estudadas entre as diferentes linhagens neoplásicas.

Acetogenina	Índice de seletividade (IS)			
	U-937	THP-1	NCI-H460	COLO 205
Motrilina	>4	> 4	>1,66	>1
Esquamocina	6,60	4,97	2,04	2,69
Annonacina	8,25	7,96	2,46	1,89
Cherimolina-1	10,95	6,62	4,47	1,78
Isoannonacina	6,36	7,30	3,68	1,23
Isocherimolina-1	6,06	7,69	1,24	<0,69
Paraguaína	5,80	3,68	2,02	0,21
Paraguaína acetilada	1,24	0,98	0,23	<0,2
Doxorrubicina	11,96	13,73	<0,26	<0,26

Levando somente em consideração as substâncias consideradas ativas ($IC_{50} < 10 \mu\text{mol/L}$) em suas respectivas linhagens, os resultados mostraram que as ACGs esquamocina para linhagem U-937 e THP-1, annonacina para U-937 e THP-1, cherimolina-1 para U-937, isoannonacina para THP-1, isocherimolina-1 para THP-1 e paraguaína para U-937, THP-1 e NCI-H460, exibiram alto índice de seletividade com valores superiores a 2.

Estes achados somados a teoria Londershausen e colaboradores (1991) de que, no geral, em razões das ACGs serem conhecidas como inibidoras do

complexo mitocondrial I e inibidoras das NADH oxidase, dentre elas as aqui estudadas esquamocina, annonacina, cherimolina-1 e isocherimolina-1, conseqüentemente elas acabam bloqueando dois mecanismos que resultam na produção de ATP (ZAFRA-POLO et al, 1996). Isso, vinculado ao fato da alta demanda de ATP pelas células tumorais poderia explicar a maior sensibilidade das linhagens de células neoplásicas em relação às células não tumorais pelas ACGs (JEWESS, 1994).

Assim, o fato de que as células normais (PBMCs) podem suportar concentrações de ACGs melhor do que as células de linhagem tumoral, indica a possibilidade de estudos destas moléculas como agentes antitumorais.

5.3.2 Avaliação do tipo de morte celular mediada pelas substâncias

O potencial das ACGs como agentes citotóxicos e indutores de apoptose foi demonstrado por alguns estudos com diferentes linhagens celulares e modelos animais (XUE et al., 2014; LU et al., 2006; ZHU et al., 2002; ZHU et al., 2001; RAYNAUD et al., 1999, KO et al., 2001; CHEN et al., 2004). Assim, após realizar o *screening* inicial sobre a viabilidade em células neoplásicas e, visando certificar a ação das ACGs isoladas da espécie *A. dioica* no tipo de morte celular induzida, elegemos a linhagem U-937 pelo fato da maioria das substâncias apresentar maior atividade para esta linhagem e também sugerir ótimos dados de índice de seletividade.

Neste contexto, diversas técnicas quantitativas e qualitativas podem ser empregadas a fim de demonstrar com maior precisão o mecanismo de morte celular induzida pelas substâncias. Neste trabalho, levamos em consideração as metodologias recomendadas pelo comitê de nomenclatura de morte celular (NCCD) (GALLUZZI et al., 2012).

5.3.2.1 Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo

Nos estágios tardios da apoptose o DNA é clivado por endonucleases em fragmentos de 200 pb ou múltiplos. O processamento das amostras, como descrito no item **4.2.2.6.3**, remove o DNA fragmentado e as células com baixo

conteúdo de DNA aparecem numa região chamada de sub-G1 do histograma (GONG et al., 1994). Essas células, além de apresentarem hipercondensação da cromatina, têm ainda, menor quantidade de DNA devido à quebra e perda de material nuclear e, conseqüentemente, menor emissão de fluorescência. A presença da população celular na região sub-G1, decorrente da perda do DNA, pode ser interpretada como morte celular por apoptose.

Diante do efeito citotóxico expressado pelas acetogeninas testadas, investigou-se os efeitos das substâncias motrilina, esquamocina, annonacina, cherimolina-1, isoannonacina, isocherimolina-1, paraguaína e paraguaína acetilada (**Figura 102, p. 186**), na progressão do ciclo da linhagem neoplásica humana U-937, nas respectivas concentrações consideradas como mais ativas. Após o período de tratamento de 24 horas, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (IP). A análise foi realizada em citômetro de fluxo e gerou histogramas, nos quais o conteúdo de DNA está representado no eixo X e o número de eventos adquiridos no eixo Y.

Na análise da progressão do ciclo celular nas células U-937, verifica-se no histograma referente ao controle celular uma representação típica de células em crescimento. O primeiro pico representa a quantidade de células na fase G1 com 43,38% de células, e o segundo nas fases G2/M com 17,28% de células, enquanto que a depressão entre os dois picos representa a fase de síntese (S) de DNA com 37,37% de células. A porcentagem de células do controle (não tratadas) em sub-G1 foi de 1,89% (**Figura 104, p. 194**).

Nos histogramas referentes ao tratamento com todas as substâncias, observou-se uma alteração do perfil, em relação ao controle não tratado, com o incremento da população de células em sub-G1 e uma redução do número de células nas fases G1, S e G2/M. A potenciação dose-dependente do efeito de todas as substâncias sobre a fragmentação do DNA é bastante evidente (**Figura 104, p. 194**).

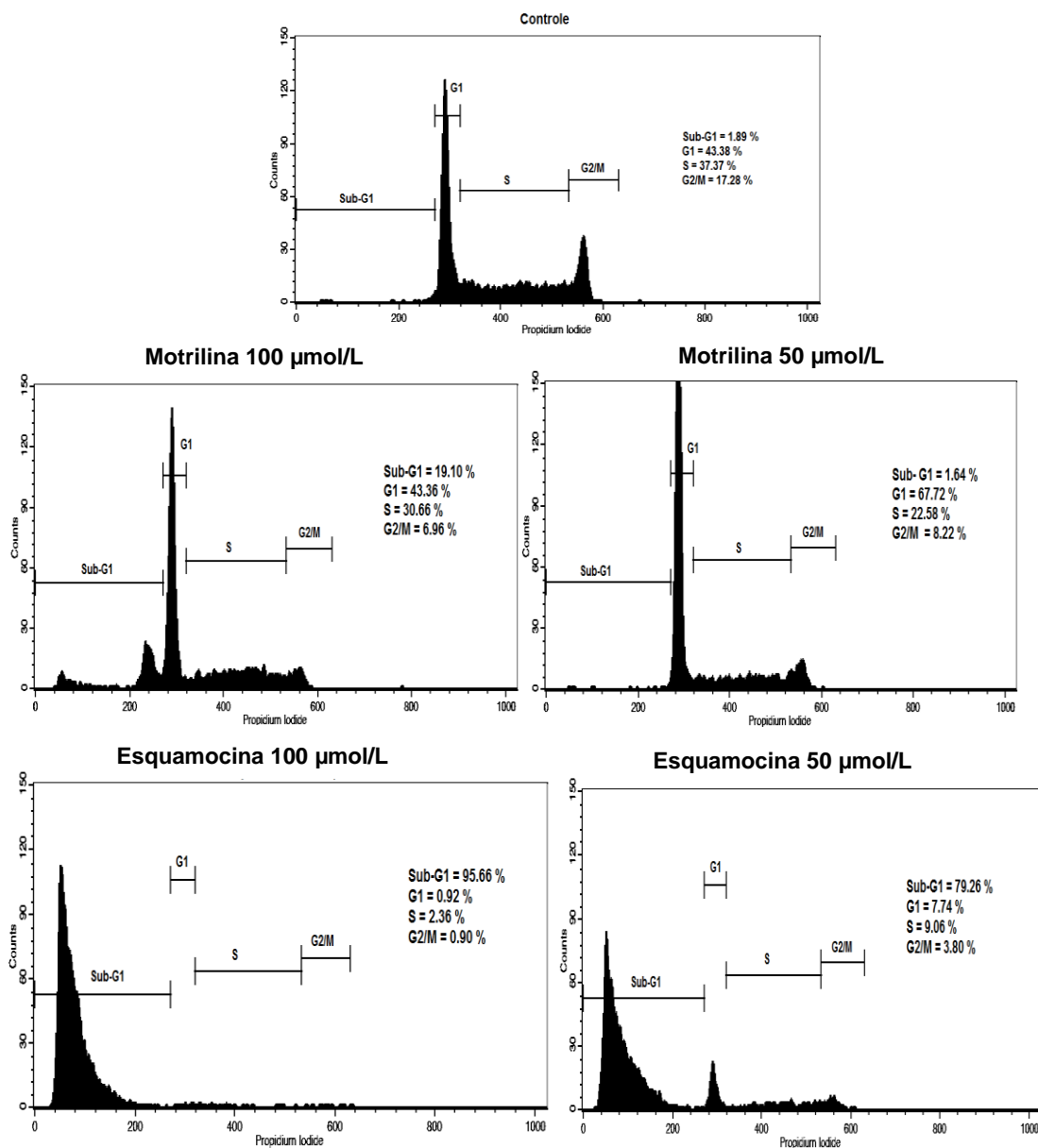


Figura 104. Histograma referente à distribuição da população de células da linhagem U-937 coradas com iodeto de propídeo por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias.

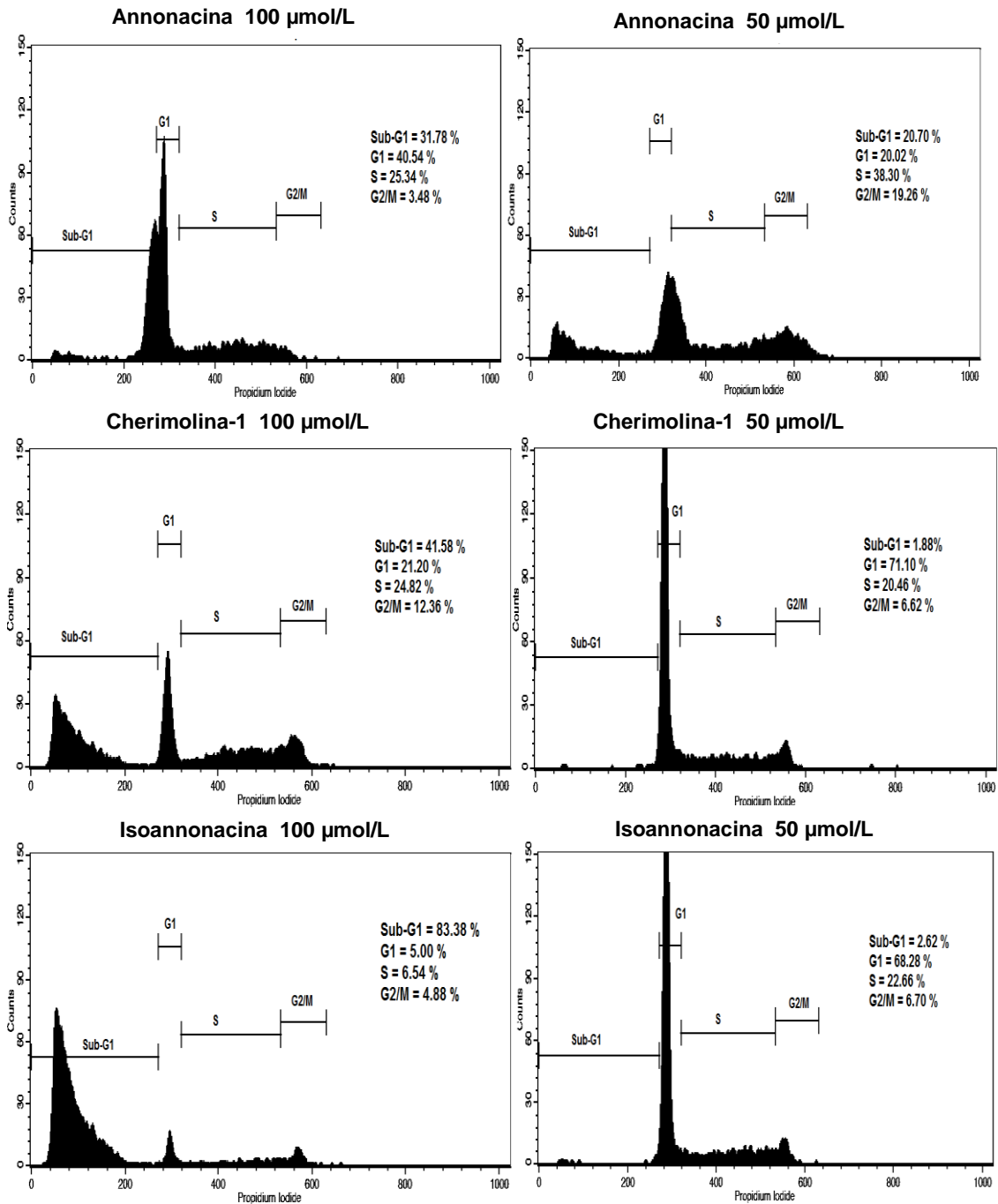


Figura 104. Histograma referente à distribuição da população de células da linhagem U-937 coradas com iodeto de propídeo por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias. (Cont.)

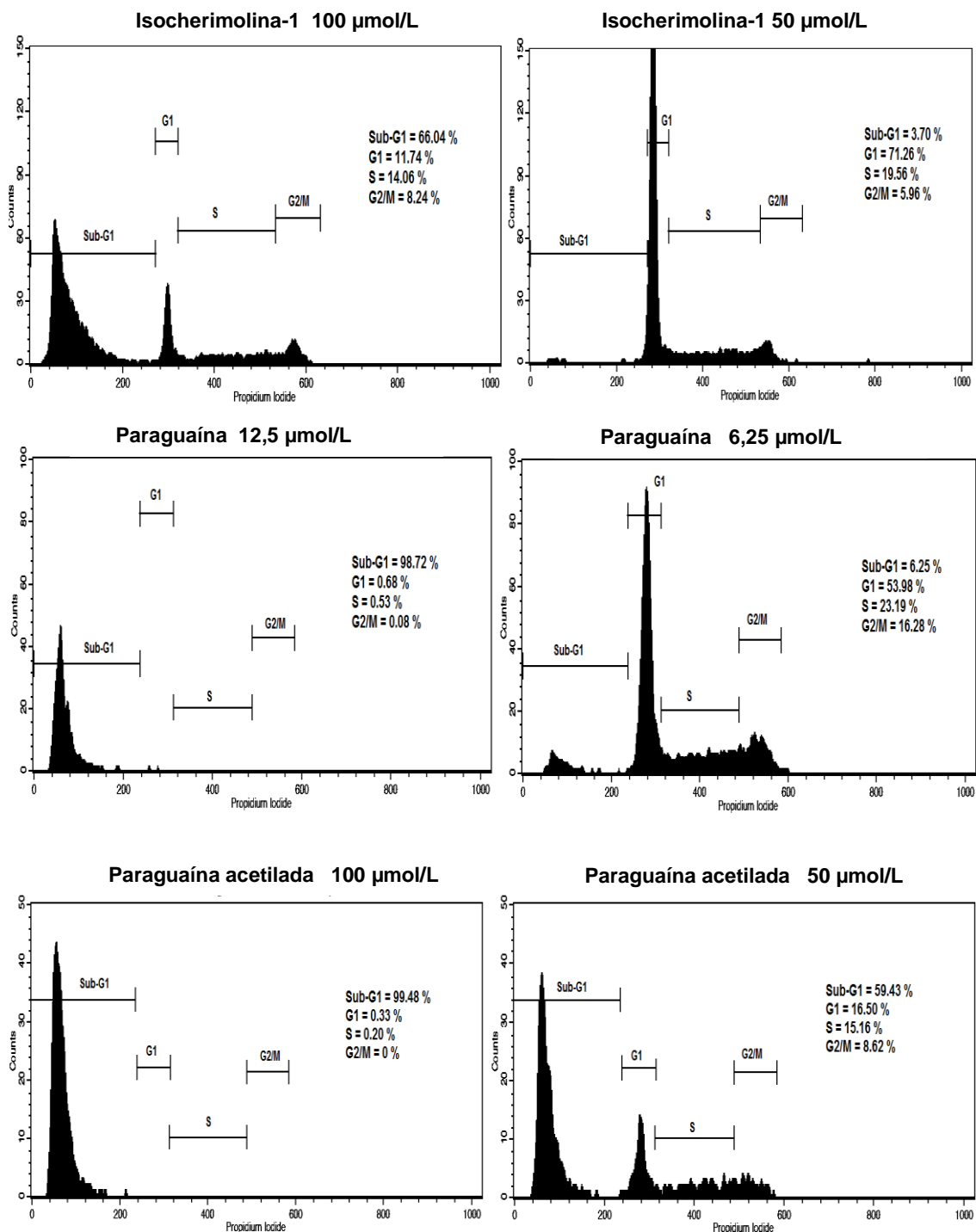


Figura 104. Histograma referente à distribuição da população de células da linhagem U-937 coradas com iodeto de propídeo por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias. (Cont.)

Pode-se observar que os resultados mais expressivos foram com a ACG bis-THF adjacente paraguáina, por promover um deslocamento acentuado da população de células neoplásicas para sub-G1 em concentrações bem inferiores em relação às demais acetogeninas, mostrando 98,72% das células nesta região quando tratadas na concentração de 12,5 $\mu\text{mol/L}$, chegando a deter quase a totalidade de células viáveis e, 6,25% de células com 6,25 $\mu\text{mol/L}$ (**Figura 104, p. 194**).

Como pode ser visto na **Figura 104, p. 194**, todas as outras substâncias foram tratadas nas concentrações de 100 $\mu\text{mol/L}$ e 50 $\mu\text{mol/L}$. O efeito da paraguáina também foi investigado nessas concentrações (dados não mostrados), porém, a fim de verificar se esse efeito continuava intenso em menores concentrações, reduzimos as doses e obtivemos bons resultados e a mantivemos nos ensaios subsequentes.

Nessa conjuntura, a avaliação dos efeitos na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$ da esquamocina e paraguáina acetilada foram os mais atraentes, incrementando a população de células na região sub-G1 em 79,26% e 59,43%, respectivamente. A potencialização do efeito dose-dependente destas duas substâncias sobre a fragmentação do DNA é bastante evidente, com o aumento do pico sub-G1 nos histogramas acima de 95% na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$.

O tratamento com 100 $\mu\text{mol/L}$ das substâncias isoannonacina, isocherimolina-1 e cherimolina-1 deslocou boa parte da população celular para sub-G1, sendo 83,38%, 66,04% e 41,58% das células nesta região, respectivamente. Porém, na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$, as três substâncias induziram pouca fragmentação do DNA em relação ao controle, com menos de 4% de fragmentação. Além disso, é interessante observar que o efeito da annonacina na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ não foi capaz de ser tão eficaz como estas substâncias, contudo, em 50 $\mu\text{mol/L}$ foi possível verificar um pico de 20,70% de células em sub-G1. No conjunto de todas as acetogeninas analisadas, a motrilina foi a menos ativa, por apresentar somente 19,10% de células com fragmentação de DNA na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$.

O relato da indução de fragmentação de DNA demonstrada na região sub-G1 foi averiguado por outros autores para as acetogeninas

desacetilivaricina (**19**) em células SW480 (câncer coloretal), anomontacina (**20**) (**Figura 105**) nas células Hep G2 (carcinoma hepatocelular), incluso para esquamocina em células K562 (leucemia mieloide crônica) e na linhagem leucêmica HL-60 (leucemia promielocítica) e, annonacina nas células MCF-7 (adenocarcinoma de mama) (XUE et al., 2014; LU et al., 2006; ZHU et al., 2002; ZHU et al., 2001; RAYNAUD et al., 1999, KO et al., 2011; CHEN et al., 2004).

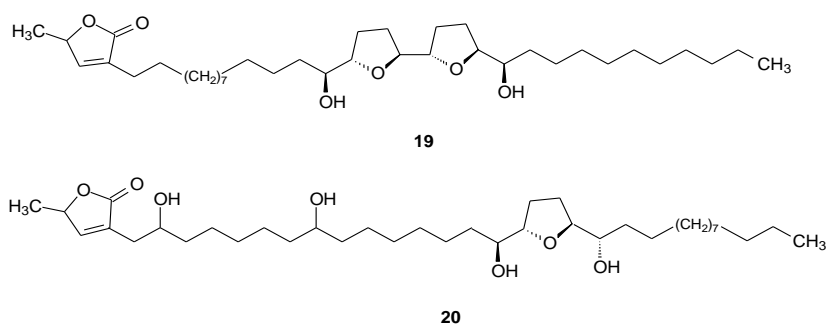


Figura 105. Estruturas das acetogeninas desacetilivaricina (**19**) e anomontacina (**20**).

Com relação aos dados aqui descritos, a presença da população celular na região sub-G1, após o estímulo com todas acetogeninas testadas, sugere que elas exercem seu efeito citotóxico através de uma indução de morte celular por apoptose em suas específicas concentrações.

5.3.2.2 Avaliação da Externalização de fosfatidilserina através da marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (IP)

Com base no princípio de que a contagem do DNA sub-diploide é sugestivo de apoptose, uma demonstração isolada deste estudo sem a comprovação de eventos bioquímicos associados à apoptose não é suficiente para confirmar esta suposição.

A dupla marcação com anexina V e IP constitui um método *in vitro* já bem estabelecido na investigação dos tipos de morte celular e permite a distinção entre apoptose e a necrose. A anexina V é uma proteína de ligação de fosfolípídeos e exibe alta afinidade para ligação seletiva com a

fosfatidilserina translocada para a membrana externa das células em apoptose (RIEGER et al., 2011).

A fim de confirmar a morte celular por apoptose induzida pelas ACGs, realizou-se este ensaio na linhagem U-937 com as substâncias motrilina, esquamocina, annonacina, cherimolina-1, isoannonacina, isocherimolina-1, paraguaína e paraguaína acetilada (**Figura 102, p. 186**), nas respectivas concentrações estimadas como as mais ativas, no tempo de 12 horas.

O controle, sem tratamento, apresenta a maior porcentagem de células no quadrante inferior esquerdo (92,55%), indicando que estas células não foram significativamente marcadas por anexina V-FITC ou IP, portanto referente a população de células viáveis (**Figura 106, p. 200**).

O tratamento com 6,25 $\mu\text{mol/L}$ de paraguaína induziu apoptose em 29,43%. No entanto, esta marcação foi incrementada com o tratamento com 12,5 $\mu\text{mol/L}$, correspondendo a 69,32% das células em apoptose inicial e 15,23% em apoptose tardia.

O tratamento com 100 $\mu\text{mol/L}$ de esquamocina, isoannonacina e paraguaína acetilada levou a consideráveis diferenças na marcação das células com anexina-V, em que independente do fato das células estarem em apoptose inicial ou tardia, o efeito é observado em mais de 60% da população celular. Entretanto, apenas a esquamocina induziu alterações pronunciadas (23,7% - apoptose inicial e tardia) na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$.

A 100 $\mu\text{mol/L}$, cherimolina-1 e isocherimolina-1 induziram sutis diferenças quanto à marcação das células com anexina-V em relação ao controle. E, o tratamento com motrilina não provocou algum efeito significativo, pois nas duas concentrações avaliadas expressou um perfil de marcação semelhante ao controle, levando a crer que o tempo de 12 horas não foi o suficiente para induzir o estímulo.

Em todas as análises, as taxas de necrose não excederam os 2 % para todas as substâncias em todas as concentrações testadas.

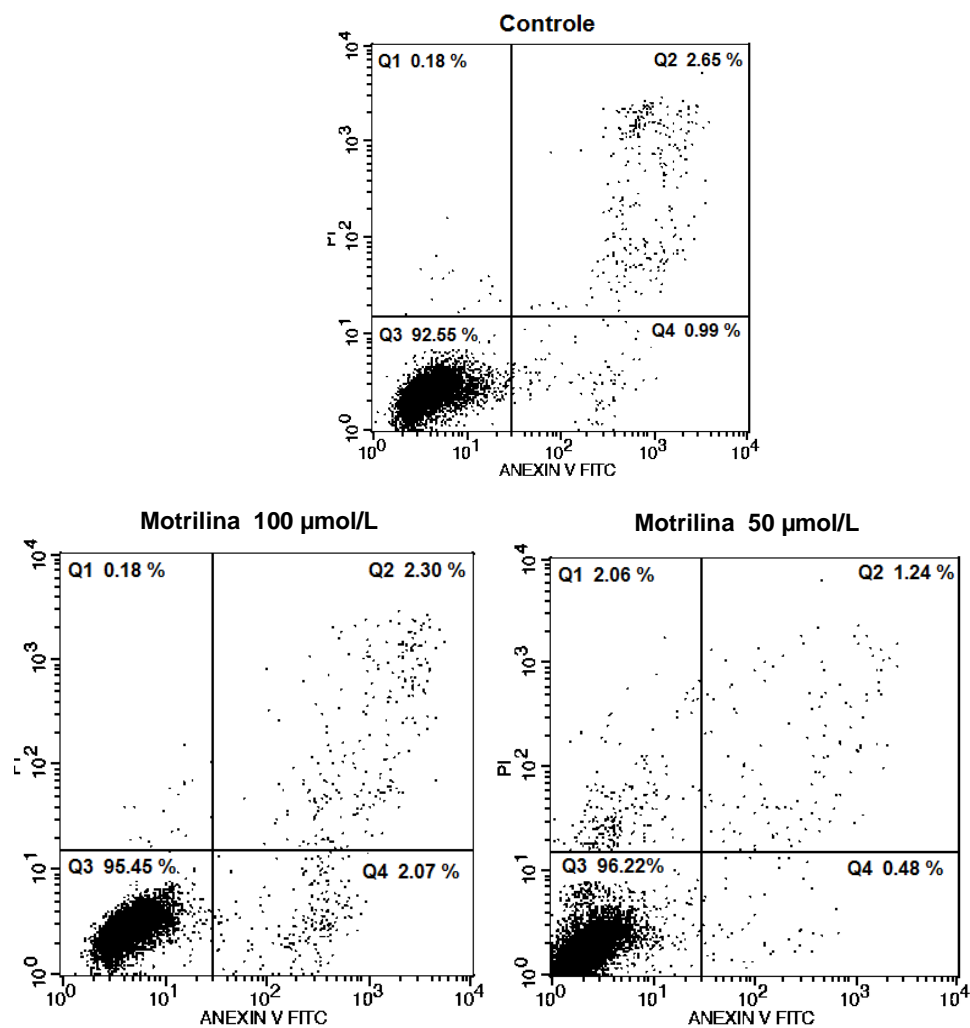


Figura 106. Avaliação da morte celular, através da marcação com Anexina VFITC e Iodeto de propídeo (PI), por citometria de fluxo na linhagem U-937, após 12 horas de incubação com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias.

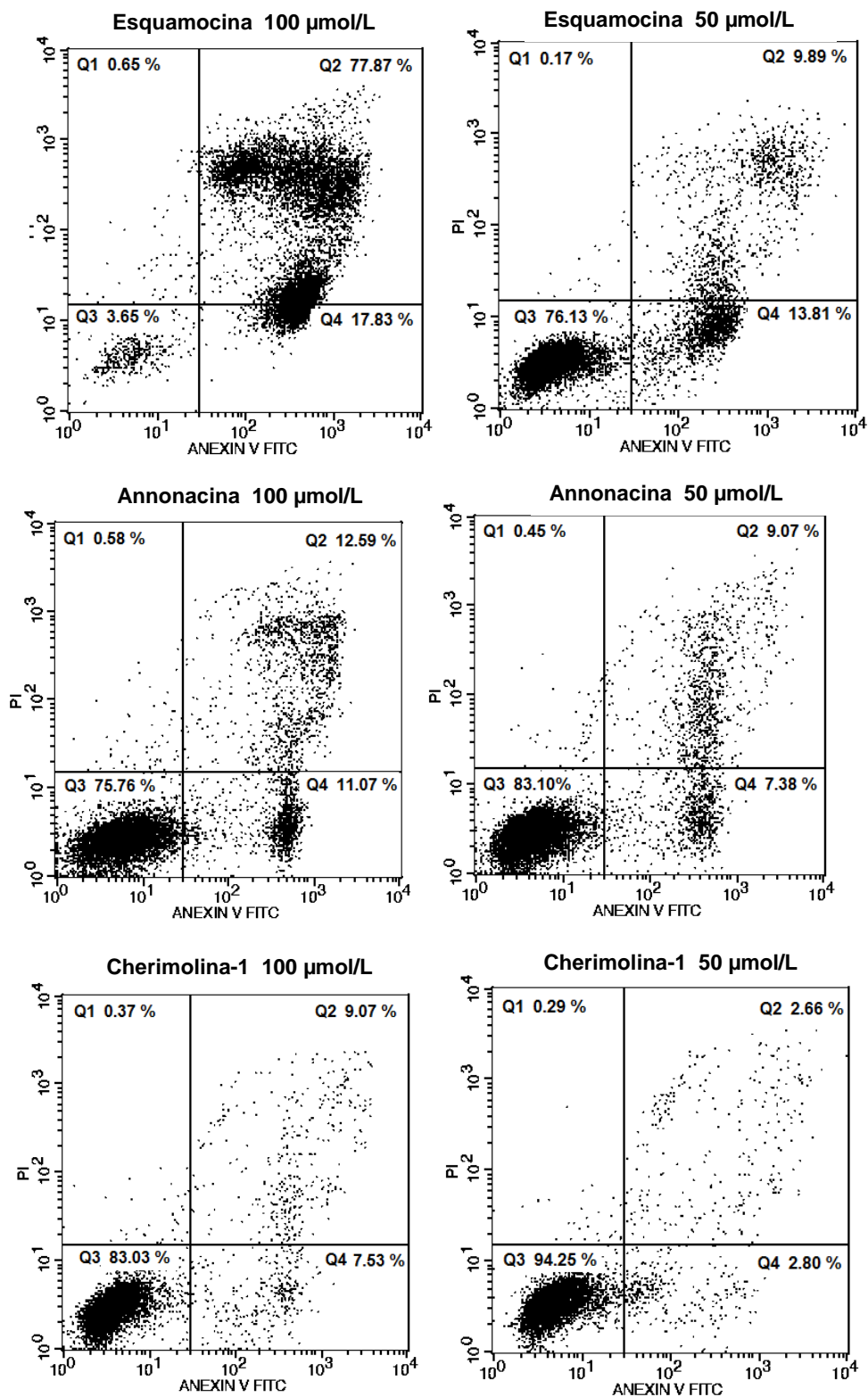


Figura 106. Avaliação da morte celular, através da marcação com Anexina VFITC e iodeto de propídeo (IP), por citometria de fluxo na linhagem U-937, após 12 horas de incubação com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias. (Cont.)

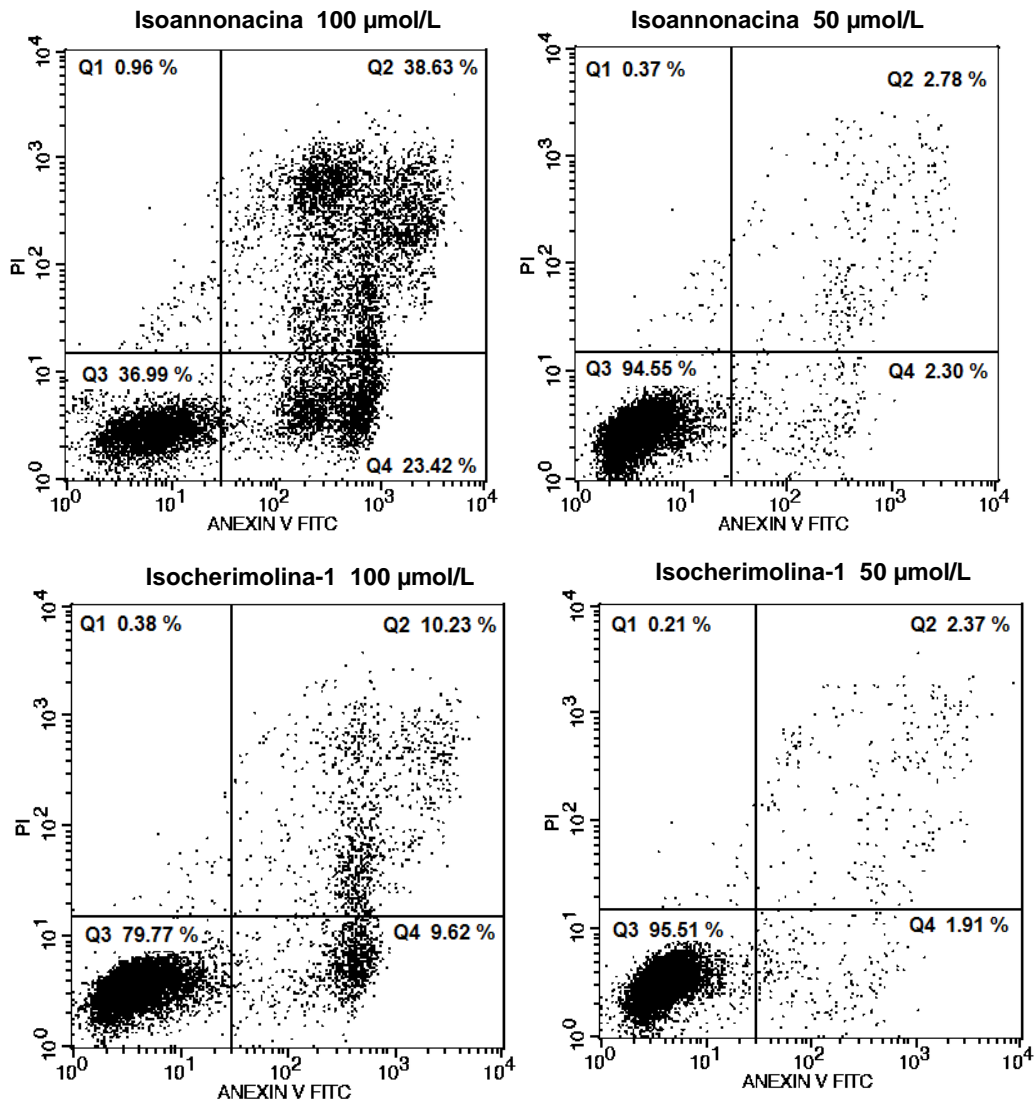


Figura 106. Avaliação da morte celular, através da marcação com Anexina VFITC e Iodeto de propídeo (IP), por citometria de fluxo na linhagem U-937, após 12 horas de incubação com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias. (Cont.)

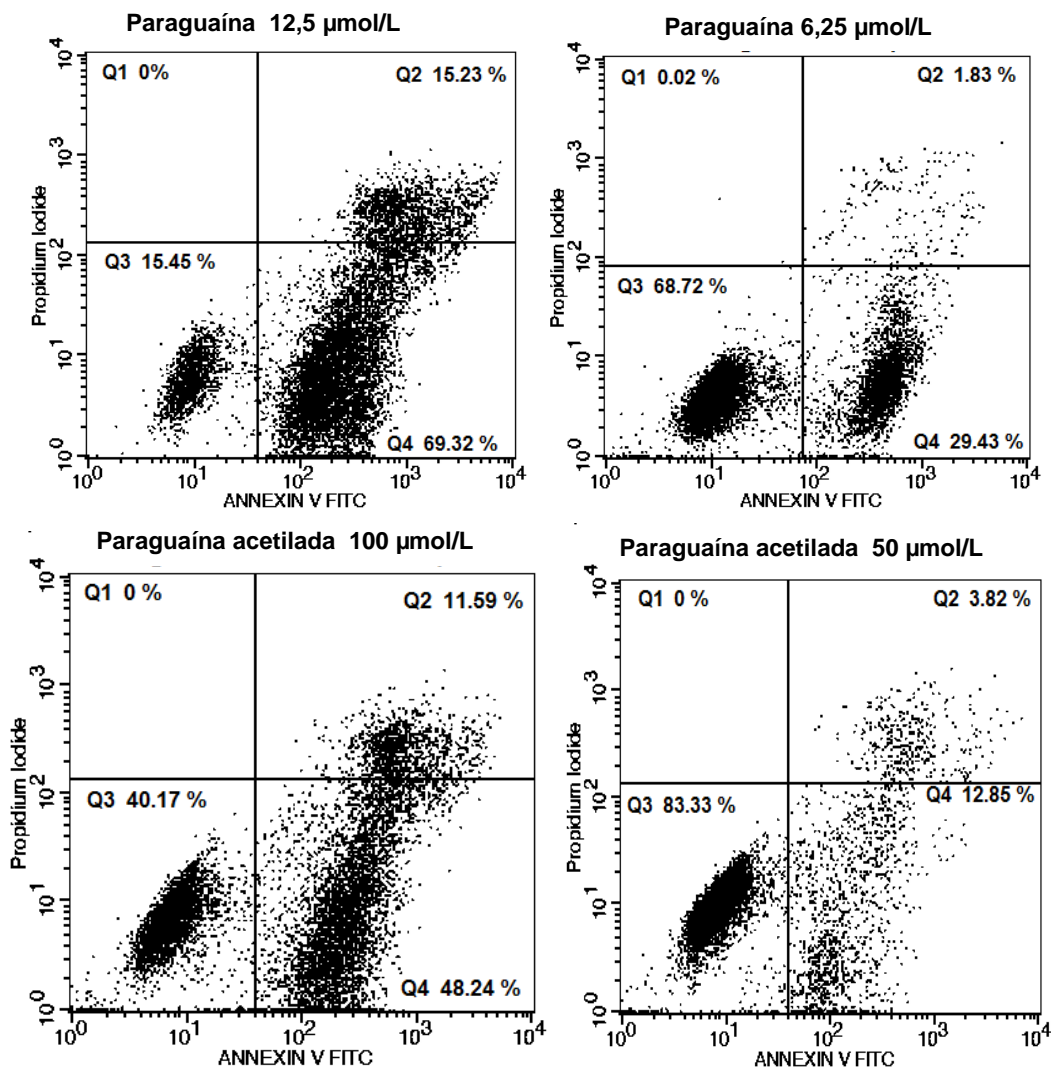


Figura 106. Avaliação da morte celular, através da marcação com Anexina VFITC e Iodeto de propídeo (IP), por citometria de fluxo na linhagem U-937, após 12 horas de incubação com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias. (Cont.)

5.3.2.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

É bem estabelecido na literatura que células em processo de apoptose podem ter duas prováveis vias de ativação: a via mitocondrial (intrínseca) e a via dos receptores de morte (extrínseca). Porém, a via de ativação intrínseca é um dos principais alvos para o estudo de drogas com atividade antitumoral (PATHANIA et al., 2009; FREZZA & GOTTLIEB, 2009). Quando ativada pode

deflagrar o processo de apoptose (NARITA et al., 1998; DESAGHER et al., 1999).

Neste sentido, e na intenção de identificar a via induzida pelas substâncias isoladas, a avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada utilizando o marcador catiônico lipofílico fluorescente JC-1 que difunde livremente para o interior da célula. Na mitocôndria, que apresenta potencial de membrana normal, a carga residual negativa da matriz mitocondrial, gerada pelo bombeamento de prótons para o espaço intermembranoso, permite o acúmulo deste fluorocromo no interior da mitocôndria. Quando a concentração do JC-1 se torna elevada na matriz mitocondrial ele forma agregados que fluorescem na região do vermelho. Caso contrário, em células onde ocorreu o colapso do potencial de membrana mitocondrial (PMM) não ocorre a formação de agregados de JC-1 e a forma monomérica do JC-1, no citoplasma, emite fluorescência verde (COSSARIZZA et al., 1993). O citômetro de fluxo quantifica as células que possuem PMM alterado por meio do detector FL1 (fluorescência 1) que capta luz na região do verde (510-527 nm) e células com mitocôndria normal através do detector FL2 (fluorescência 2) que capta luz na região do vermelho (585-590 nm) (VIANA, 2012).

Para iniciar esse experimento, as concentrações e o tempo de incubação referentes a cada substância foram escolhidos baseados nos experimentos anteriores, já que a exposição de fosfatidilserina começa acontecer um pouco antes disso e a fragmentação do DNA acontece depois. Assim sendo, as células U-937 foram tratadas com as substâncias motrilina, esquamocina, annonacina, cherimolina-1, isoannonacina, isocherimolina-1, paraguaína e paraguaína acetilada (**Figura 102, p. 186**), nas respectivas concentrações estimadas como as mais ativas, no tempo de 12 horas.

Na **Figura 108, p. 206**, verifica-se, no controle, que a população celular se concentra predominantemente no quadrante “Q2” (97,82% da população celular), que corresponde a região do gráfico *Dot-plot* onde se encontram células com mitocôndrias viáveis (FL2).

Quando avaliadas, quase todas as substâncias testadas exprimiram um significativo deslocamento da população celular do quadrante “Q2” para o

quadrante “Q4”, onde se identifica as células com dissipação do PMM (FL1). Sobretudo, o efeito mais pronunciado foi o da ACG bis-THF adjacente paraguaína, que induziu a redução do potencial de ação da membrana mitocondrial em 65,68% na concentração de 12,5 $\mu\text{mol/L}$.

Ao analisar o efeito das demais substâncias nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{mol/L}$, em destaque, a ação da ACG bis-THF adjacente esquamocina proporciona a despolarização do PMM em 98,90% das células na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ e 29,85% com 50 $\mu\text{mol/L}$. No entanto foi possível observar que o tempo de 12 horas não foi o suficiente para que ocorra a perda do PMM em quase 100% das células quando tratadas com as outras substâncias. Por exemplo, a paraguaína acetilada, isoannonacina, annonacina e isocherimolina-1, foram capazes de acarretar o colapso do PMM de modo considerável apenas na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, causando esse efeito na faixa de 20-55% das células. Já as células tratadas com motrilina e cherimolina-1 não sofreram despolarização na membrana significativamente nem para maior concentração testada, de 100 $\mu\text{mol/L}$ no tempo de 12 horas.

Nossos resultados são coerentes com fato da citotoxicidade das ACGs, em geral, ser mediada pela capacidade de alterar as funções mitocondriais, sendo conhecidas como potentes inibidoras do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (ZAFRA-POLO et al., 1998).

As conformações estruturais das ACGs testadas neste trabalho são compatíveis com a hipótese estabelecida por Shimada e colaboradores (1998) de que para atravessar a membrana e agir na mitocôndria, os anéis THF interagem fortemente com as terminações polares dos fosfolípidos de membranas lipossomais. Foi proposto que estes anéis atuariam como âncora hidrofílica na membrana para otimizar a posição e conformação dos grupos funcionais das ACGs, sendo a lactona terminal junto com parte do domínio espaçador, a parte da molécula que se interagiria diretamente com o sítio ativo da enzima do complexo I, através de uma difusão da cadeia lateral no interior da membrana mitocondrial (**Figura 107, p. 206**). Por outra parte, Konno e colaboradores (2004) apoiando o modelo descrito acima, apresentou que os grupos hidroxilas também são importantes, devido a possível formação de pontes intermoleculares com o oxigênio dos fosfolípidos de membrana. Os

resultados expostos neste trabalho são consistentes com este conceito.

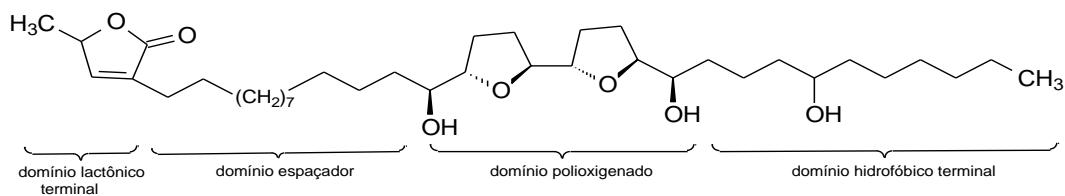


Figura 107. Requerimentos estruturais de acetogeninas com ação na mitocôndria.

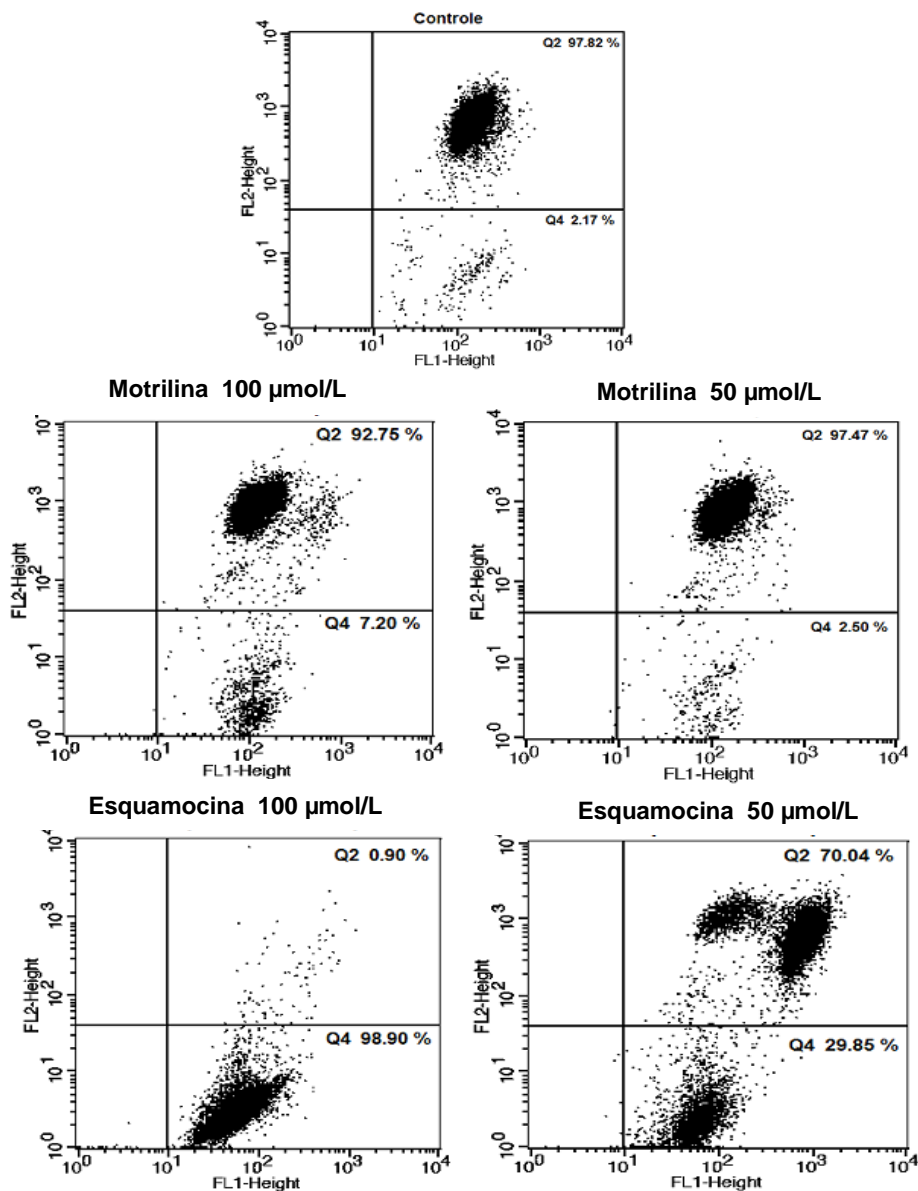


Figura 108. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial através da marcação com JC-1, por citometria de fluxo na linhagem U937, após a incubação de 12 horas com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias.

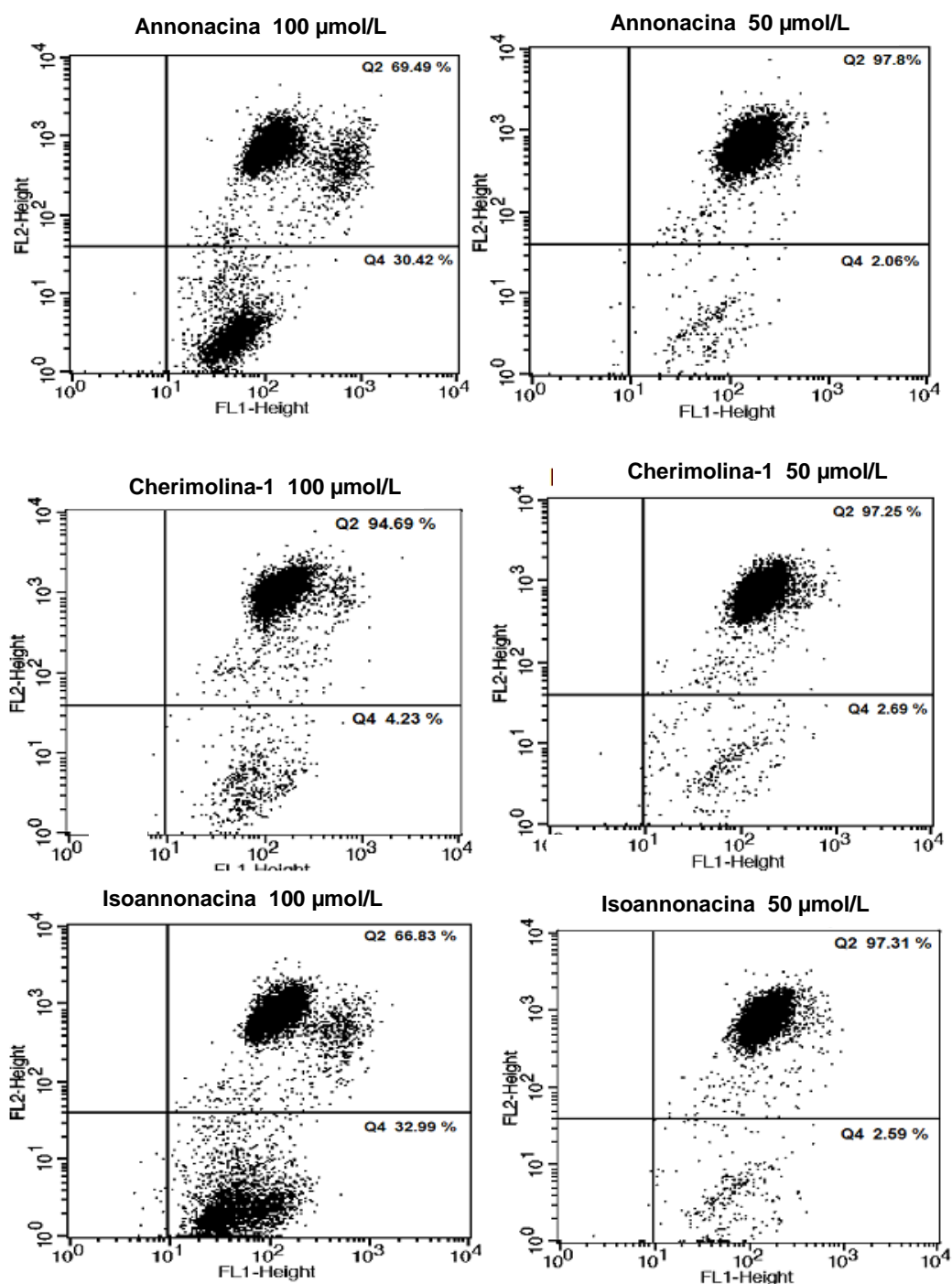


Figura 108. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial através da marcação com JC-1, por citometria de fluxo na linhagem U937, após a incubação de 12 horas com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias (Cont.)

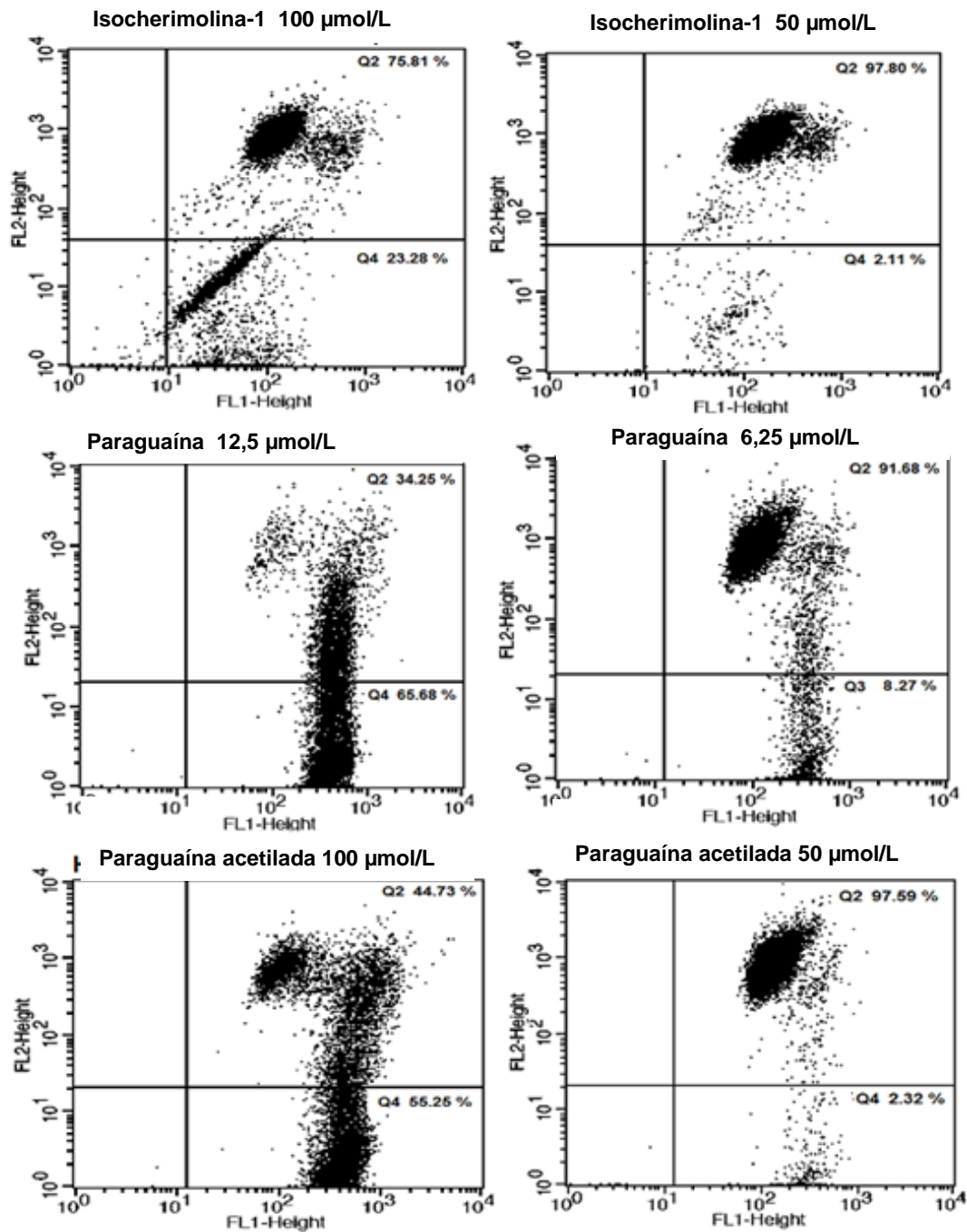


Figura 108. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial através da marcação com JC-1, por citometria de fluxo na linhagem U937, após a incubação de 12 horas com as substâncias, nas respectivas concentrações ativas. Células controle não foram submetidas ao tratamento com as substâncias. (Cont.)

5.3.2.4 Detecção da atividade das caspases

Pelo fato dos resultados apresentados anteriormente sugerirem a ativação da morte celular por apoptose por via intrínseca (mitocondrial) nas células U937 após o tratamento com as acetogeninas e, por demonstrar alterações características típicas deste tipo morte celular, é importante constatar que umas das grandes marcas bioquímicas para o desencadeamento deste processo, é a ativação das caspases. As caspases podem ser divididas em iniciadoras (caspase-8 e -9) ou executoras (caspases-3, 6 e -7), sendo as executoras as responsáveis pela ativação de mecanismos que levam às mudanças de morfologia celular e fragmentação do DNA. Este fenômeno demarca, necessariamente, o comprometimento irreversível da célula à morte.

Baseado nessa premissa e verificando os resultados já analisados, observa-se que todas as substâncias parecem atuar da mesma maneira em suas respectivas concentrações ativas, permitindo inferir o sinal apoptótico induzido por elas. Porém, dentre as oito acetogeninas testadas, a bis-THF adjacente paraguaína se destaca como a substância mais ativa em todos os ensaios (**Figura 102, p. 186**). Portanto, esta ACG foi selecionada para o ensaio que demonstra a ativação das caspases 3 e 9.

Assim, a fim de investigar o envolvimento das caspases na citotoxicidade induzida pela paraguaína, as células da linhagem U-937 foram incubadas com esta substância na concentração de 12,5 $\mu\text{mol/L}$ e o experimento foi conduzido nas células tratadas por 7 horas com o propósito de verificar a atividade da caspase iniciadora 9 e da caspase executora 3, que desempenham um papel crítico na culminação da apoptose. Os resultados obtidos demonstraram a ativação da caspase-3 e -9, por ser observado um acréscimo estatisticamente significativo da atividade em relação ao controle negativo (**Figura 109, p. 210**).

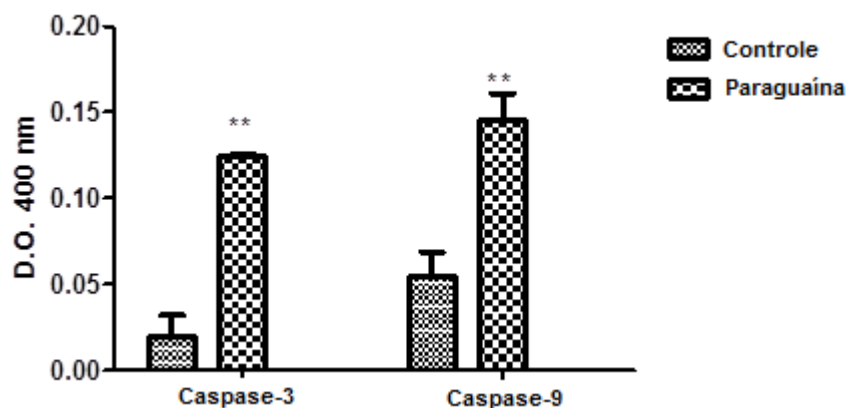


Figura 109. Avalia o da atividade das caspases 3 e 9 em células U-937 após incubac o com a paraguai na por 7 horas (n=2). A atividade das caspases foi avaliada utilizando o *Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)*. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 valores estatisticamente significantes em rela o ao controle sem tratamento.

Estes resultados confirmam que a paraguai na induz morte celular por apoptose, uma vez que, a caspase-3, cuja ativa o foi demonstrada 7 horas após o tratamento,   considerada como promotora da apoptose por clivar substratos específicos intracelulares como PARP (uma enzima nuclear envolvida no reparo do DNA), um inibidor de ativa o de caspases (ICAD) e estar envolvida na degrada o de diversas estruturas celulares resultando em altera es fenotípicas características da apoptose. Tendo como exemplos, a exposi o de fosfatidilserina, manifestada após 12 horas de tratamento,   dependente da atividade da caspase efetora 3 e, a fragmenta o do DNA exposta após 24 horas   consequência das endonucleases que são ativadas pela caspase-3. Portanto a ativa o da caspase-3 na linhagem U-937 está de acordo com as altera es celulares averiguadas nestas células.

A ativa o da caspase-9 foi demonstrada 7 horas após o tratamento com a paraguai na. A caspase-9   uma caspase iniciadora da via intrínseca, e sua ativa o ocorre por meio da clivagem pelo apoptossoma, que   formado, entre outros compostos, pelo citocromo c liberado da mitocôndria após a perda do seu potencial de membrana, responsável pelo desencadeamento da cascata apoptótica e culminando na ativa o da caspase-3 (DORTA, 2007).

Tendo em conta estes resultados, se sugere, que a via intrínseca pode

ser responsável pelo modo de ação do mecanismo de morte celular induzido pela paraguaína.

Da mesma forma, outros trabalhos demonstraram a ativação de caspases pelas acetogeninas. Xue e colaboradores (2014) relataram que a desacetiluváricina ativou caspase-3 nas células SW480 (adenocarcinoma de colon). Do mesmo modo, a esquamocina e annonacina proporcionaram a ativação da caspase-3, nas linhagens HL-60 (leucemia promielocítica) e T24 (cancer de bexiga), respectivamente (XUE et al., 2014; ZHU et al., 2001; YUAN et al., 2003). Também, foi demonstrado num mesmo estudo a ativação de caspase-9 pela ação da cherimolina-1, motrilina, rolliniastatina-1 e laherradurina na linhagem HepG2 (hepatocarcinoma) (DE PEDRO, et al., 2013).

Ao considerar todos os fundamentos e a compilação das evidências obtidas e discutidas neste trabalho, confrontados com os relatos da literatura de que as espécies do gênero *Annona* e suas ACGs possuem atividade citotóxica em várias linhagens tumorais, sendo algumas ACGs até reportadas como indutoras de apoptose, podemos propor as referidas como possíveis candidatas para novos fármacos antitumorais.

Nossos resultados, primeiramente, mostraram a forte atividade citotóxica das frações das espécies *A. dioica* e *A. acutiflora*. Posteriormente, revelaram a citotoxicidade direcionada às células tumorais, ainda não testadas, principalmente, da esquamocina, annonacina, cherimolina-1 e paraguaína nas linhagens U-937 e THP-1 e, o factível mecanismo intrínseco na indução de apoptose ativado por todas as acetogeninas, com exceção a motrilina que induziu alterações insuficiente para provar tal fato. Não sendo, portanto, constatado nenhuma correlação de taxas na indução de necrose por nenhuma substância.

Até o momento, de todas as moléculas aqui testadas foram encontrados registros de trabalhos que relacionaram a esquamocina, annonacina, cherimolina-1 e motrilina como indutoras de apoptose (LU et al., 2006; ZHU et al., 2002; ZHU et al., 2001; RAYNAUD et al., 1999; KO et al., 2011; YUAN et al., 2003; DE PEDRO et al., 2013). Sendo este o primeiro relato de provável indução de apoptose das acetogeninas, isocherimolina-1, isoannonacina e

paraguáína e, o segundo estudo que compara simultaneamente ACGs na avaliação de morte celular.

Paralelamente aos estudos referentes à atividade antineoplásica, é de grande relevância as evidências de que algumas das acetogeninas isoladas neste trabalho possuem outras atividades biológicas. Por exemplo, foi relatada a atividade antileishmaniose para a esquamocina, annonacina, isoannonacina e cherimolina-1 (RAYNAUD-LE GRANDIC et al., 2004). A parte disso, annonacina também apresenta atividade antiparkinson e inibidora do complexo mitocondrial I (LE VEN et al., 2011; YAMADA et al., 2014). Já a cherimolina-1 tem atividades antimicrobiana e inibidora do complexo mitocondrial I (CORTES et al., 1984; ESTORNELL et al., 1997).

Em síntese, nesta presente investigação, e em se tratar dos refinamentos dos testes realizados com linhagem U-937 (linfoma histiocítico), sugere que ACGs pertencentes a três diferentes grupos de esqueletos básicos aqui abordados (mono-THF, bis-THF adjacentes e bis-THF não adjacentes), principalmente, a bis-THF adjacente paraguáína por apresentar um potencial, para a continuidade dos estudos na investigação da possibilidade de utilização desta ACG na terapia do câncer de linfoma histiocítico, termo antigo que hoje se refere aos linfomas não Hodgkin.

O câncer, apesar de todas as pesquisas e avanços conquistados, ainda é uma das preocupações mais latentes na área da saúde em nível mundial. Porém, a descoberta de novos fármacos é dificultada por obstáculos como heterogeneidade do tumor e toxicidade para o paciente. Quimioterápicos derivados dos produtos naturais têm contribuído para o progresso na clínica estabelecendo o seu valor. No entanto, além de conhecer a química e a importância biológica das substâncias biofabricadas pelo metabolismo secundário dos vegetais, é importante procurar compreender as interfaces de explorar racionalmente o repertório químico oferecido pela natureza, preservando-a, no intuito de, proporcionar e perpetuar para todas as gerações os recursos naturais como a fonte básica para cura de doenças.

Assim, este trabalho ratifica a potência farmacológica dos produtos naturais, em particular das acetogeninas, e abre um amplo campo de perspectivas para estudos *in vivo* e pré-clínicos. Embora, seja evidente que

outros estudos devem ser dirigidos na busca de um conhecimento mais completo acerca do mecanismo de ação e relação estrutura-atividade. Novos experimentos capazes de aprofundar nas informações alusivas às cascatas de sinalização que controlam a morte celular induzida pelas acetogeninas devem ser investigados.

6 CONCLUSÃO

A abordagem sobre a prospecção anticâncer das espécies *Annona dioica*, *A. acutiflora* e *A. dolabripetala* mostrou resultados consistentes de citotoxicidade. Na triagem preliminar da atividade antineoplásica realizada nas frações das espécies *Annona dioica*, *A. acutiflora* e *A. dolabripetala*, valida-se a correlação do uso etnomedicinal contra o câncer de espécies gênero *Annona*, sobretudo, em virtude da expressiva citotoxicidade *in vitro* e indícios de indução de apoptose das frações em clorofórmio e em acetato de etila das raízes de *A. dioica* e das frações em hexano, clorofórmio e metanol das folhas de *A. acutiflora*, nas linhagens neoplásicas U-937 e THP-1. Além disso, esta triagem forneceu fundamentos para facilitar a estratégia na busca de acetogeninas, conduzindo ao estudo da espécie *A. dioica* que permitiu o isolamento e identificação de 6 acetogeninas (motrilina, esquamocina, annonacina, isoannonacina, cherimolina-1 e isocherimolina-1) da fração em clorofórmio, contribuindo para a fitoquímica desta espécie.

Mediante ensaios de citotoxicidade aliados às avaliações do tipo de morte celular provocada pelas acetogeninas isoladas, juntamente com as acetogeninas cedidas paraguaína e paraguaína acetilada, os dados foram grande relevância, demonstrados pela notória atividade direcionada às células neoplásicas, principalmente, da esquamocina, annonacina, cherimolina-1 e paraguaína nas linhagens U-937 e THP-1 e também devido ao possível mecanismo intrínseco na indução de apoptose ativado, por todas as acetogeninas, com exceção a motrilina que induziu alterações de pequena magnitude e, particularmente, melhor inferida pela paraguaína em razão do seu substancial potencial farmacológico.

Dessa forma, os resultados apontam o potencial das acetogeninas mono-THF, bis-THF adjacentes e bis-THF não adjacentes, sobretudo da bis-THF adjacente paraguaína, e reforçam a relevância dos produtos naturais como detedores de bioatividade. Justifica-se, como perspectivas, que ensaios adicionais devem ser realizados para avaliar a eficácia destas moléculas *in vivo* e seus efeitos quando associadas a fármacos antitumorais, como a doxorubicina, podendo ser exploradas possibilidade de novas doses.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEND, M. Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. **International Journal of Radiation Biology**, v. 79, n. 12, p. 927–94, 2003.

ABUBAKAR, M. S.; MUSA, A. M.; AHMED, A.; HUSSAINI I.M. The perception and practice of tradicional medicine in the treatment of cancers and inflammations by Hausa na Fulani tribes of northern Nigeria. **Journal of Ethnopharmacolgy**, v. 111, n. 3, p. 625-629, 2007.

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1322-1326, 1998.

ADESOGAN, E. K.; DURODOLA, J. I. Antitumor and antibiotic principles of *Annona senegalensis*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1311-1312, 1976.

ADJANOHOOUN J. E; ABNKAKAR, N.; DRAMANE, K.; EBOT, M. E.; EKPERE, J.A. **Traditional Medicine and Pharmacopoeia: Contribution to Ethnobotanical and Floristic Studies in Cameroon**. Centre de production de manuels scolaires, 1996, 641p.

ADRIAENSSENS, E.; VANHECKE, E.; SAULE, P.; MOUGEL, A.; PAGE, A.; ROMON, R.; NURCOMBE, V.; LE BOURHIS, X.; HONDERMARCK, H. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 2, p. 346-351, 2008.

AHAMMADSAHIB, K. I.; HOLLINGWORTH, R. M.; MCGOVREN, J. P.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. **Life Sciences**, v. 53, n. 14, p. 1113-1320, 1993.

AJBOYE, T. O.; YAKUBU, M. T.; SALAU, A. K.; OLADIJI, A. T.; AKANJI, M. A.; OKOGUN, J. I. Antioxidant and drug detoxification potential of aqueous extract of *Annona senegalensis* leaves in carbon tetrachloride-induced hepatocellular damage. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 12, p. 1361-1370, 2010.

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.

ALAWA, C. B. I.; ADAMU, A. M.; GEFU, J. O.; AJANUSI, O. J.; ABDU, P. A.; CHIEZEY, N. P.; ALAWA, J. N.; BOWMAN, D. D. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 73–81, 2003.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado espécies vegetais úteis**. Editora da Embrapa: Distrito Federal, 1998.

ARAYA, H.; SAHAI, M.; SINGH, S.; SINGH, A. K.; YOSHIDA, M.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Squamocin-O₁ and Squamocin-O₂, new adjacent bis-tetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 999-1004, 2002.

AUBRY, J. P.; BLAECHE, A.; LECOANET-HENCHOZ, S.; JEANNIN, P.; HERBAULT, N.; CARON, G.; MOINE, V.; BONNEFOY, J. Y. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. **Cytometry**, v. 37, n. 3, p. 197-204, 1999.

BASUALDO, I.; SORIA, N. Farmacopea Herbolaria Paraguaya: Especies de la Medicina Folklórica utilizadas para combatir enfermedades del Aparato Respiratorios (Parte I). **Rojasiana**, v. 3, p. 197-238, 1996.

BARRECA, D.; LAGANÀ, G.; FICARRA, S.; TELLONE, E.; LEUZZI, U.; GALTIERI, A.; BELLOCCO, E. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective

properties of the exotic fruit *Annona cherimolia* Mill. (Annonaceae). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2302–2310, 2011.

BENNETT, S.; BREIT, S. N. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. **Journal of Leukocyte Biology**, v.56, n. 3, p. 236-240, 1994.

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

BORN, L.; LIEB, F.; LORENTZEN, J. P.; MOESHLER, H.; NONFON, M.; SOLLNER, R.; WENDISCH, D. The relative configuration of acetogenins isolated from *Annona squamosa*: annonin I (squamocin) and annonin VI. **Planta Medica**, v. 56, p. 312-316, 1990.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 11, p. 615-647, 2003.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 231-239, 205.

BURKIL, L. L. **The plants of West tropical Africa. Families A-D1**, p. 103-105, 1985.

CAMACHO, M. R; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; SOLIS, P. N.; MARSHALL, S. J.; GHAZANFAR, S. A. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2, p. 185–191, 2003.

CAMPOS, M. G. **Atividade antimelanótica de compostos fenólicos e extratos hidroalcoolicos de *Inga subnuda* e *Rollinia dolabripetala* e ação antibacteriana e antioxidante.** Dissertação de mestrado em Bioquímica agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2013, 112f.

CARBALLO, A. I.; MARTÍNEZ, A. L.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; PELLICER, F.; VENTURA-MARTÍNEZ, R.; DÍAZ-REVAL, M. I.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 95, n. 1, p. 6–12, 2010.

CAVÉ , A.; FIGADÉRE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. **Acetogenins from annonaceae. Progress in the chemistry of organic natural products.** 1. ed. Viena: Ed. Springer-Verlag, 1997, 307 p.

CHANG, F. R.; CHEN, J. L.; CHIU, H. F.; WU, M. J.; WU, Y. C. Acetogenins from seeds of *Annona reticulata*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1057-1061, 1998.

CHANG, F. R.; CHEN, J. L.; LIN, C. Y.; CHIU, H. F.; WU, M. J.; WU, Y. C. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 883-889, 1999.

CHANG, F. R.; LIAW, C. C.; LIN, C. Y.; CHOU, C. J.; CHIU, H. F.; WU, Y. C. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Planta Medica**, v. 69, n. 3, p. 241-246, 2003.

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

CHANG, F. R.; WU, Y. C.; DUH, C. Y.; WANG, S. K. Studies on the acetogenins of Formosan annonaceous plants, II. Cytotoxic acetogenins from *Annona reticulata*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1688-1694, 1993.

CHATROU, L. W.; RAINER, H. & MAAS, P. J. M. **Annonaceae (Soursop Family)**. In: Smith, N. et al. (eds.). Flowering Plants of the Neotropics. New York Botanical Garden, New York, 18-20, 2004.

CHAVAN, M. J.; KOLHE, D. R.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and antiinflammatory activity of kaur-16-en-19-oic acid from *Annona reticulata* L. bark. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 2, p. 273-276, 2012.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytochemistry**, v. 17, n. 2, p. 149–151, 2010.

CHÁVEZ, D.; MATA, R. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 823-828, 1999.

CHÁVEZ, D.; MATA, R. Purpurediolin and purpurenin, two new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 5, p. 580-584, 1998.

CHÁVEZ, D.; ACEVEDO, L. A.; MATA, R. Jimenezin, a novel annonaceous acetogenin from the seeds of *Rollinia mucosa* containing adjacent tetrahydrofuran-tetrahydropyran ring systems. **Journal of a Natural Products**, v. 61, n. 4, p. 419-421, 1998.

CHÁVEZ, D.; ACEVEDO, L. A.; MATA, R. Tryptamine derived amides and acetogenins from the seeds of *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1119-1122, 1999.

CHEN, Y. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 9, p. 904-906, 1996.

CHEN, Y.; CHEN, J. W.; WANG, Y.; XU, S. S.; LI, X. Six cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* seeds. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 960-966, 2012a.

CHEN, Y.; XU, S. S.; CHEN, J. W.; WANG, Y.; XU, H. Q.; FAN, N. B.; LI, X. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 462–466, 2012b.

CHEN, Y.; XU, S. S.; CHEN, J. W.; XU, S. S.; WANG, Y.; LI, X.; CAI, B. O.; FAN, N. B. Antitumor activity of annonaceous acetogenins in HepS and S180 xenografts bearing mice. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letter**, v. 22, n. 8, p. 2717–2719, 2012c.

CHEN, Y.; CHEN, J. W.; LI, X. Cytotoxic bistetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 11, p. 2477-2481, 2011.

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 the fruits of *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1942-1946, 2004.

CHIH, H. W.; CHIU, H. F.; TANG, K. S.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. **Life Science**, v. 69, n. 11, p. 1321-1331, 2001.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, n. 3, p. 406–414, 2007.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; JOHNSON, H. A.; ALALI, F. Q.; HOPP, D. C.; ROGERS, L. L.; MCLAUGHLIN, J. L. Annojahnin from *Annona jahnii*: a possible precursor or mono-tetrahydrofuran acetogenins. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1609-1616, 1998.

COOPER, G.M. **A célula – uma abordagem molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2001.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, 1984.

CORTES, D.; MYINT, S. H.; DUPONT, B.; DAVOUST, D. Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1475 -1482, 1993.

CORTES, D.; MYINT, S. H.; HOCQUEMILLER, R. Molvizarin and motrilin: two novel cytotoxic bis-tetrahydrofuranic γ -lactone acetogenins from *Annona cherimolia*. **Tetrahedron**, v. 47, n. 38, p. 8195-8202, 1991.

CORTES, D.; MYINT, S. H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; A new type of cytotoxic acetogenins: the tetrahydrofuranic β -hydroxy methyl γ -lactones. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 43, p. 6133-6134, 1991.

CORTES, D.; RÍOS, J. L.; VILLAR, A.; VALVERDE, S. Cherimoline et dihydrocherimoline: deux nouvelles γ -lactones bis-tetrahydrofuranniques possédant une activité antimicrobienne. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 30, p. 3199-3203, 1984.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 9, p. 647-656, 2002.

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of

mitochondrial membrane potential using the j-aggregate forming lipophilic cation 5,5', 6,6'- tetrachloro- 1,1', 3,3'- tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 1, p. 40-45, 1993.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; DE JESUS, H. C. R.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; SALVADOR, M. J.; CAVALCANTI, S. C. H.; DOS SANTOS, R. L.; PRATA, A. P. N. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickellii* (Annonaceae). **Natural Products Communications**, v. 6, n. 6, p. 907-912, 2011a.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; DE SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS, B. P.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine-beta-carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9714-9720, 2011b.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudo no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agentes. **Chemical Reviews**, v. 109, n.7, p. 3012-3043, 2009.

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

DANIEL, P. T.; WIDER, T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*, v. 15, n. 7, p. 1022-1032, 2001.

DAVIS, J. A.; SHARMA, S.; MITTRA, S. Antihyperglycemic effect of *Annona squamosa* hexane extract in type 2 diabetes animal model: PTP1B inhibition, a possible mechanism of action. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 44, n. 3, p. 326-332, 2012.

DAWOOD, S.; BROGLIO, K.; ESTEVA, F. J.; IBRAHIM, N. K.; KAU, S. W.; ISLAM, R.; ALDAPE, K. D.; YU, T. K.; HORTOBAGYI, G. N. ; GONZALEZ-ANGULO, A. M. Defining prognosis for women with breast cancer and CNS metastases by HER2 status. *Annals of Oncology*, v. 19, n. 7, p. 1242-1248, 2008.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA B DEL, C. L.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, 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.

DE PEDRO, N.; CAUTAIN, B.; MELGUIZO, A.; VICENTE, F.; GENILLOUD, O.; PELÁEZ, F.; TORMO, J. R. Mitochondrial complex I inhibitors, acetogenins, induce HepG2 cell death through the induction of the complete apoptotic mitochondrial pathway. *Journal of Bioenergetics Biomembranes*, v. 45, n. 1-2, p. 153-164, 2013.

DE SOUSA, O. V.; VIEIRA, G. D. V.; ALVES, M. S.; DE PINHO, J. D. R. G.; YAMAMOTO, C. H.; KAPLAN, M. C. Pharmacological effects of two polar fractions from *Annona coriacea* Mart in animal models. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 6, n. 13, p. 948-955, 2012.

DE SOUSA, O. V.; VIEIRA, G. D. V.; DE PINHO, J. D. R. G.; YAMAMOTO, C. H.; ALVES, M. S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol

extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. **Internation Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 5, p. 2067-2078, 2010.

DEGLI-ESPOSTI, M.; GHELLI, A.; RATTA, M.; CORTES, D.; ESTORNELL, E. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). **Biochemical Journal**, v. 301, p. 161-167, 1994.

DESAGHER, S.; OSEN-SAND, A.; NICHOLS, A.; ESKEES, R.; MONESSUIT, S.; LAUPER, S.; MAUNDRELL, K.; ANTONSSON, B.; MARTINOU, J. C. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. **Journal Cell Biology**, v. 144, n.5, p. 891-901, 1999.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica Química com Correlações Clínicas**. 1. ed. São Paulo: Ed. Blücher, 2007.

DOS SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 115–120, 2001.

DORTA, D. **Efeitos citoprotetor e ou citotóxico dos flavonoides: estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose**. Tese de Doutorado em Toxicologia. Universidade de São Paulo, 2007, 166f.

DURET, P.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Annonisin, a bis-THF acetogenin from *Annona atemoya* seeds. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1423-1426, 1997.

DURET, P.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; CORTES, D.; CAVÉ, A. Isoacetogenins, artifacts issued from translactonization from Annonaceous acetogenins. **Heterocycles**, v. 39, n. 2, p. 741-749, 1994.

EL-CHAGHABY, G. A.; AHMAD, A. F.; RAMIS, E. S. Evaluation of the antioxidant and antibacterial properties of various solvents extracts of *Annona squamosa* L. leaves. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n.2, p. 227-233, 2011.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ESTORNELL, E.; TORMO, J. R.; CORTES, D. Cherimolin-1, new selective inhibitor of the first energy-coupling site of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 240, n.1, p. 234-238, 1997.

ESTRADA-REYES, R.; LOPEZ-RUBALCAVA, C.; HEINZE, G.; ESQUINCA, A. R. G.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Anxiolytic-like and sedative actions of *Rollinia mucosa*: possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 1, p. 70-75, 2010.

EZIRIM, A. U.; OKOCHI, V. I.; JAMES, A. B.; ADEBESHI, O. A.; OGUNNOWO, S.; ODEGHE, O. B. Induction of apoptosis in myelogenous leukemic K562 cells by ethanolic leaf extract of *Annona muricata* L. **Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine**, v. 2, n. 3, p. 142-151, 2013.

FAGUNDES, F. A.; OLIVEIRA, L. B.; CUNHA, L. C; VALADARES, M. C. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 24-29, 2005.

FANG, X. P.; RIESER, M. J.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: An updated review. **Phytochemical Analysis**, v. 4, n. 1, 27-48, 1993.

FERREIRA, A. L. S.; BATISTA, C. A. S.; PASA, M. C. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola mata cavalo em Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Biodiversidade**, v. 14, n. 1, p. 151-160, 2015.

FISCHER, U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n.2, 187-215, 2005.

FORMAGIO, A. S. N.; KASSUAYA, C. A. L.; NETO, F. F.; VOLOBUFF, C. R. F.; IRIGUCHI, E. K. K.; VIEIRA, M. C.; FOGLIO, M. A. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 14, 2013.

FREZZA, C.; GOTTLIEB, E. Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, p. 4–11, 2009.

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

GALLARDO, T.; ARAGÓN, R.; TORMO, J. R.; BLÁZQUES, M. A.; ZAFRA-POLO, M. C.; CORTES, D. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 811-816, 1998.

GALLUZZI, L.; VITALE, J. M.; ABRAMS, E. S.; ALNEMRI, E. H.; BAEHRECKE, M. V.; BLAGOSKONNY, T. M.; DAWSON, V. L.; DAWSON, W. S.; EL-DEIRY, S.; FULDA, E.; GOTTLIEB, D. R.; GREEN, M. O.; HENGARTNER, O.; KNIGHT, S.; KUMAR, S. A.; LIPTON, X.; LU, F.; MADEO, W.; MALORNI, P.; MEHLEN, G.; NUNEZ, M. E.; PETER, M.; PIACENTINI, D. C.; RUBINSZTEIN, Y.; SHI, H-U.; SIMON, P.; VANDENABEELE, E.; WHITE, J.; YUAN, B.; ZHIVOTOVSKY, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death

subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Review. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

GARCÍA, V. M. N.; GONZALEZ, A.; FUENTES, M.; AVILES, M.; RIOS, M. Y. ZEPEDA, G.; ROJAS, M. G. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 1, p. 85–88, 2003.

GONG, J., TRAGANOS, F., DARZYNKIEWICZ, Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p.314–319, 1994.

GOÑI, O.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T.; MERODIO, C.; ESCRIBANO, M. I. A cryoprotective and cold-adapted 1,3- β -endoglucanase from cherimoya (*Annona cherimolia*) fruit. **Phytochemistry**, v. 72, n. 9, p. 844–854, 2011.

GONZALEZ-ESQUINCA, A. R.; LUNA-CAZARES, L. M.; GUZMAN, M. A. S.; CHACON, I. D.; HERNANDEZ, G. L.; BRECEDA, S. F.; GERARDO, P. M. *In vitro* larvicidal evaluations of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. Extracts against *Anastrepha ludens* larvae (Diptera, TEPHRITIDAE). **Interciencia**, v. 37, n. 4, p. 284-289, 2012.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; LÓPEZ-MERAZ, L.; REYES-RAMÍREZ, A.; AGUILLÓN, M.; MARTÍNEZ, A. Effect of repeated administration of *Annona diversifolia* Saff. (ilama) extracts and palmitone on rat amygdala kindling. **Epilepsy Behavior**, v. 16, n. 4, p. 590–595, 2009.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 3, n. 3, p. 335-343, 2007.

GU, Z. M.; FANG, X. P.; MIESBAUER, L. R.; SMITH, D. L.; MCLAUGHLIN, J. L. 30-, 31- and 32-hydroxybullatacinones: bioactive terminally hydroxylated annonaceous acetogenins from *Annona bullata*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 6, p. 870-876, 1993a.

GU, Z. M.; FANG, X. P.; RIESER, M. J.; HUI, Y. H.; MIESBAUER, L. R.; SMITH, D. L.; WOOD, K. V.; MCLAUGHLIN, J. L. New cytotoxic annonaceous acetogenins: bullatanocin and cis- and trans-bullatanocinone, from *Annona bullata* (Annonaceae). **Tetrahedron**, v. 49, n. 4, p. 747-754, 1993b.

GU, Z. M.; FANG, X. P.; ZENG, L.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins: (2,4-*cis* and *trans*) – bulladecinones from *Annona bullata* (Annonaceae). **Bioorganic Medicinal Chemistry Letter**, v. 4, n. 3, p. 473-478, 1994.

GU, Z. M.; ZENG, L.; SCHWEDLER, J. T.; WOOD, K. V.; MCLAUGHLIN, J. L. New bioactive adjacent bis- THF annonaceous acetogenins from *Annona bullata*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, p. 467-477, 1995.

GU, Z. M.; ZHOU, D.; LEWIS, N. J.; WU, J.; SHI, G.; MCLAUGHLIN, J. L. Isolation of new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chromatography/mass spectrometry. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 1911-1916, 1997.

GUPTA-ELERA, G.; GARRETT, A. R.; MARTINEZ, A.; ROBISON, R. A.; O'NEILL, K. L. The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimolia*) fruit. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2205–2209, 2011.

GUPTA, R. K.; KESARI, A. N.; DIWAKAR, S.; TYAGI, A.; TANDON, V.; CHANDRA, R.; WATAL, G. *In vivo* evaluation of anti-oxidant and anti-lipidimic potential of *Annona squamosa* aqueous extract in Type 2 diabetic models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, n. 1, p. 21-25, 2008.

GUPTA, R. K.; KESARI, A. N.; MURTHY, P. S.; CHANDRA, R.; TANDON, V.; WATAL, G. Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n.1, p. 75–81, 2005.

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

HANNUN, Y. A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. **Blood**, v. 86, n. 6, 1997.

HARYADI, Y.; YUNIARTI, S. Study on the insecticidal effects of custard apple (*Annona reticulata* L.) and mindi (*Melia azedarach* L.) leaves against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera : Curculionidae). **Advanced on Stored Product Protection**, p. 600-602, 2003.

HENGARTNER, M. O. Apoptosis: corralling the corpses. **Cell**, v. 104, n. 3, p. 325-328, 2000.

HOPP, D. C.; ALALI, F. Q.; GU, Z. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Three new bioactive bis-adjacent THF-ring acetogenins from the bark of *Annona squamosa*. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 569-575, 1998a.

HOPP, D. C.; ALALI, F. Q.; GU, Z. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Mono-THF ring annonaceous acetogenins from *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 803-809, 1998b.

HOPP, D. C.; CONWAY, W. D.; MCLAUGHLIN, J. L. Using countercurrent chromatography to assist in the purification of new annonaceous acetogenins from *Annona squamosa*. **Phytochemical Analysis**, v. 10, n. 6, p. 339- 347, 1999.

HOPP, D. C.; ZENG, L.; GU, Z. M.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L. Novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, from the bark of *Annona squamosa*, showing cytotoxic selectivities for the human pancreatic carcinoma cell line PACA-2. **Journal of a Natural Products**, v. 60, n. 6, p. 581-586, 1997.

HOPP, D. C.; ZENG, L.; GU, Z. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Squamotacin: an annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line (PC-3). **Journal of a Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 97-99, 1996.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n.4, p. 377-387, 2007.

HOYE, T. R.; SUHADOLNIK, J. C. On the stereochemistry of the bistetrahydrofuranyl moiety of uvaricin. Proton chemical shifts can play a crucial role in complex structure determination. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 14, p. 4402–4403, 1987.

HOYE, T. R.; ZHUANG, Z. P. Validation of the proton NMR chemical shift method for determination of stereochemistry in the bistetrahydrofuranyl moiety of uvaricin-related acetogenins from Annonaceae: rolliniastatin 1 (and asimicin). **Journal Organical Chemichal**, v. 53, n. 23, p. 5578-5580, 1988.

HUI, Y. H.; RUPPRECHT, J. K.; ANDERSON, J. E.; WOOD, K. V.; MCLAUGHLIN, J. L. Bullatalicinone, a new potent bioactive acetogenin, and squamocin from *Annona bullata*. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 3, p. 124-129, 1991.

HUI, Y. H.; RUPPRECHT, J. K.; LIU, Y. M.; ANDERSON, J. E.; SMITH, D. L.; CHANG, C. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Bullatacin and bullatacinone: two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 3, p. 463-477, 1989.

INCA. Estatísticas do câncer. Vigilância do câncer e de fatores de risco. Acesso em 28 de fevereiro de 2016. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/INCA>>.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; VILHENA, K. S. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes e araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 735-741, 2010.

JAMKHANDE, P. G.; WATTAMWAR, A. S.; KANKUDTE, A. D.; TIDKE, P. S.; KALASKAR, M. G. Assessment of *Annona reticulata* Linn. leaves fractions for *in vitro* antioxidative effect and antimicrobial potential against standard human pathogenic strains. **Alexandria Journal of Medicine**, 2015.

JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J.; GONZÁLEZ, M. C.; ROBLEDO, S. M. VELEZ, I. D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 183-186, 2000.

JEWESS, P. J. Insecticides and acaricides which act at the rotenone-binding site of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, n. 1, p. 247-251, 1994.

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

JOSSANG, A.; DUBAELE, B.; CAVÉ, A.; BARTOLI, M. H.; BÉRIEL, H. Annomontacine: une nouvelle acétogénine γ -lactone monotetrahydrofurannique cytotoxique de l'*Annona montana*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 4, p. 967-971, 1991.

JOSSANG, A.; DUBAELE, B.; CAVÉ, A.; BARTOLI, M. H.; BÉRIEL, H. Deux nouvelles acetogenines monotetrahydrofuranniques cytotoxiques: l'annomonicine et la montanacine. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 13, p. 1861-1864, 1990.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematic: a phylogenetic approach**. 2. ed. Massachusetts/ USA: Ed. Sinauer Associates, 1999, 565p.

JULIAN-LOAEZA, A. P.; SANTOS-SANCHEZ, N. F.; VALADEZ-BLANCO, R.; SANCHEZ-GUZMAN, B. S.; SALAS-CORONADO, R. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1262– 1268, 2011.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KIM, R.; EMI, M.; MATSUURA, K.; TANABE, K. Antisense and nonantisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy. **Cancer Gene Therapy**, v.14, n. 1, p. 1-11, 2006.

KIM, D. H.; MA, E. S.; SUK, K. D.; SON, J. K.; LEE, J. S.; WOO, M. H. Annomolin and annocherimolin, new cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 4, p. 502-506, 2001.

KIM, G. S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F. E.; MCLAUGHLIN, J. L.; SOSTRODIHARDJO, S. Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 4, p. 432-436, 1998a.

KIM, G. S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F. E.; SOSTRODIHARDJO, S.; MCLAUGHLIN, J. L. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 565-571, 1998b.

KO, Y. M.; WU, T. Y.; WU, Y. C.; CHANG, F. R.; GUH, J. Y.; CHUANG, L. Y. Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor- α -related pathways in MCF-7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1283-1290, 2011.

KONNO, H.; HIURA, N.; MAKABE, H.; ABE, M.; MIYOSHI, H. Synthesis and mitochondrial complex I inhibition of dihydroxy-cohibin A, non-THF annonaceous acetogenin analogue. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 3, p. 629-632, 2004.

KUO, R. Y.; CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; TENG, C. M.; YEN, H. F.; WU, Y. C. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 421-425, 2001.

LAGE, H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 188-99, 2003.

LANDOLT, J. L.; AHAMMADSAHIB, K. I.; HOLLINGWORTH, R. M.; BARR, R.; CRANE, F. L.; BUERCK, N. L.; MCCABE, G. P.; MCLAUGHLIN, J. L. Determination of structure-activity relationships of annonaceous acetogenins by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria. **Chemical Biological Interactions**, v. 98, n. 1, p. 1-13, 1995.

LAUTIE, E.; QUINTERO, R.; FLINIAUX, M. A.; VILLARREAL, M. L. Selection methodology with scoring system: application to Mexican plants producing podophyllotoxin related lignans. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 402–412, 2008.

LE DANG, Q.; KIM, W. K.; CUONG, M. N.; CHOI, Y. H.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; PARK, M. S.; LIM, C. H.; NGOC, H. L.; KIM, J. C. Nematicidal and antifungal activities of Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11160-11167, 2011.

LE VEN, J.; SCHMITZ-AFONSO, I.; TOUBOUL, D.; BUISSON, D.; AKAGAH, B.; CRESTEIL, T.; LEWIN, G.; CHAMPY, P. Annonaceae fruits and parkinsonism risk: Metabolisation study of annonacin, a model neurotoxin; evaluation of human exposure. **Toxicology Letters**, v. 205, S50, 2011.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAUMIK, P.; MUKHERJEE, B.; BUKHERJEE, R. The phytochemistry of Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2^a ed. Sarvier: São Paulo, 1995.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10, p. 2679-2688, 2005.

LEWIS, M. A.; ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; RUPPRECHT, J. K.; MCLAUGHLIN, J. L. Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the Pawpaw, *Asimina triloba* (Annonaceae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 45, p. 15-23, 1993.

LI, X. H.; HUI, Y. H.; RUPPRECHT, J. K.; LIU, Y. M.; WOOD, K. V.; SMITH, D. L.; CHANG, C. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Bullatacin, bullatacinone and squamone, a new bioactive acetogenin, from the bark of *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 1, p. 81-86, 1990.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; CHEN, S. L.; WU, C. C.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 15, p. 4767–4776, 2005.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; LIN, C. Y.; CHOU, C. J.; CHIU, H. F.; WU, M. J.; WU, Y. C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 470–475, 2002.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; WU, Y. C.; WANG, H. K.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H. Montacin and *cis*-montacin, two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1804-1808, 2004a.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; WU, C. C.; CHEN, S. L.; BASTOW, K. F.; HAYASHI, K. I.; NOZAKI, H.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Nine new cytotoxic monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Planta Medica**, v. 70, n. 10, p. 948-959, 2004b.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; WU, M. J.; WU, Y. C. A novel constituent from *Rollinia mucosa*, rollicosin, and a new approach to develop annonaceous acetogenins as potential antitumor agents. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 2, p. 279-281, 2003.

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

LIAW, C. C.; YANG, Y. L.; CHEN, M.; CHANG, F. R.; CHEN, S. L.; WU, S. H.; WU, Y. C. Mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* as cytotoxic agents and calcium ion chelators. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 5, p. 764-771, 2008.

LIMA, L. A. R. S.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M.A.D. Antioxidant and cytotoxic potential of fatty acid methyl esters from the seeds of *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae). **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 873–875, 2012.

LIMA, L. A. R. S.; JOHANN, S.; CISALPINO, P. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M.A.D. Antifungal activity of 9-hydroxy-folianin and sucrose octaacetate from the seeds of *Annona cornifolia* A. St. -Hil. (Annonaceae). **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 2283–2288, 2011.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Research International**, v. 122, n. 4, 1129–1138, 2010.

LIU, X. X.; ALALI, F. Q.; HOPP, D. C.; ROGERS, L. L.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Glabracins A and B, two new acetogenins from *Annona glabra*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 7, p. 959-965, 1998a.

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

LIU, X. X.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Two novel acetogenins, annoglaxin and 27-hydroxybullatacin, from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 6, p. 848-852, 1999a.

LIU, X. X.; ALALI, F. Q.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 5, p. 815-821, 1999b.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, n. 4, p. 643-649, 1964.

LOEFFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Experimental Cellular Research**, v. 256, n. 1, p. 19-26, 2000.

LONDERSHAUSEN, M.; LEICHT, W.; LIEB, F.; MOESCHLER, H.; WEISS, H. Molecular mode of action of annonins. **Pesticide Science**, v. 33, n. 4, p. 427-438, 1991.

LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; PIÑA-MEDINA, B.; ESTRADA-REYES, R.; HEINZE, G.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. **Life Sciences**, v. 78, n. 7, p. 730 – 737, 2006.

LU, M. C.; YANG S. H.; HWANG, S. L.; LU, Y. J.; LIN, Y. H.; WANG, S. R.; WU, Y. C.; LIN, S. R. Induction of G2/M phase arrest by squamocin in chronic myeloid leukemia (K562) cells. **Life Science**, v. 78, n. 20, p. 2378-2383, 2006.

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

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 231– 235, 2012.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 65-98, 2001.

MAAS, P.; RAINER, H.; LOBÃO, A. 2012. *Annonaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Acesso em: 14 de dezembro de 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012>>.

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. D. Ó.; LOTUFO, L. V.; MAGALHÃES, H. I.; MORAES, M. O. D.; DE LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. D. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p.456-464, 2011.

MARTINEZ-VAZQUEZ, M.; ESTRADA-REYES, R.; ESCALONA, A. G. A.; VELAZQUEZ, I. L.; MARTINEZ-MOTA, J.; MORENO, J.; HEINZE, G. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 164– 170, 2012.

MARTINS, L. A. V. **Avaliação do potencial anticâncer de espécies vegetais do Mato Grosso do Sul**. Dissertação de Mestrado em Saúde e Desenvolvimento, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2014, 83f.

MASSARI, L. P.; KASTELAN, M.; GRUBER, F. Epidermal malignant tumors: pathogenesis, influence of UV light and apoptosis. **Collegium Antropologicum**, v. 31, p. 83-85, 2007.

MCCARTHY, N. J.; EVAN, G. I. Methods for detecting and quantifying apoptosis. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 36, n. 4, p. 259-278, 1998.

MCLAUGHLIN, J. L. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 7, p. 1311-1321, 2008.

MCCLOUD, T. G.; SMITH, D. L.; CHANG, C. J.; CASSADY, J. M. Annonacin, a novel biologically polyketide from *Annona densicoma*. **Experientia**, v. 43, n. 8, p. 947-949, 1987.

MIAO, Y.; XU, X.; YUAN, F.; SHI, Y.; CHEN, Y.; CHEN, J.; LI, X. Four cytotoxic annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Natural Products Research**, v. 16, p. 1-7, 2015.

MIYOSHI, H.; OHSHIMA, M.; SHIMADA, H.; AKAGI, T.; IWAMURA, H.; MCLAUGHLIN, J. L. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1365, n. 3, p. 443-452, 1998.

MORITA, H.; LIZUKA, T.; CHOO, C. Y.; CHAN, K. L.; TAKEYA, K.; KOBAYASHI, J. Vasorelaxant activity of cyclic peptide, cyclosquamosin B, from *Annona squamosa*. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letter**, v. 16, n. 17, p. 4609-4611, 2006.

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

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J. J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. R.; GÓMEZ-BARRIO, A. *In vitro* screening of

American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 101–107, 2000.

MYINT, S. H.; CORTES, D.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; COTTE, J.; QUÉROS, A. M. Solamin, a cytotoxic monotetrahydrofuranic γ -lactone acetogenin from *Annona muricata* seeds. **Phytochemistry**, v. 30, n. 10, p. 3335-3338, 1991.

NAKANISHI, Y.; CHANG, F. R.; LIAW, C. C.; WU, Y. C.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H. Acetogenins as selective inhibitors of the human ovarian 1A9 tumor cell line. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 15, p. 3185-3188, 2003.

NAISMIYH, J. H.; SPRANG, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, n. 2, p. 74-79, 1998.

NANDHAKUMAR, E.; INDUMATHI, P. *In vitro* antioxidant activities of methanol and aqueous extract of *Annona squamosa* (L.) fruit pulp. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, n. 6, p. 142-148, 2012.

NARITA, M.; SHIMIZU, S.; ITO, T.; CHITTENDEN, T.; LUTZ, R. J.; MATSUDA, H.; TSUJIMOTO, Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 25, p. 14681-14686, 1998.

NASCIMENTO, M. C. S. **Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades**. Dissertação de mestrado em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

NAZARO, J. M. **Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (boophilus) microplus***. Dissertação de mestrado em Química, Universidade Federal Mato Grosso do Sul, 2013.

NGUYEN-POUPLIN, J.; TRAN, H.; TRAN, H.; PHAN, T. A.; DOLECEK, C.; FARRAR, J.; TRAN, T. H.; CARON, P.; BODO, B.; GRELLIER, P. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 417–427, 2007.

OBERLIES, N. H.; JONES, J. L.; CORBETT, T. H.; FOTOPOULOS, S. S.; MCLAUGHLIN, J. L. Tumor cell growth inhibition by several annonaceous acetogenins in an *in vitro* disk diffusion assay. **Cancer Letters**, v. 96, n. 1, p. 55-62, 1995.

OGBADOYI, E. O.; ABDULGANIY, A. O.; ADAMA, T. Z.; OKOGUN, J. I. *In vivo* trypanocidal activity of *Annona senegalensis* Pers. leaf extract against *Trypanosoma brucei*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 85–89, 2007.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

OKOYE, T. C.; AKAH, P. A.; OKOLI, C. O.; EZIKE, A. C.; OMEJE, E. O.; ODOH, U. E. Antimicrobial effects of a lipophilic fraction and kaurenoic acid isolated from the root bark extracts of *Annona senegalensis*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

OKOYE, T. C.; AKAH, P. A.; OMEKE, C. P. Evaluation of the anticonvulsant and muscle relaxant effects of the methanol root bark extracts of *Annona senegalensis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 1, p. 25-28, 2010.

PADMA, P.; PRAMOD, N. P.; THYAGARAJAN, S. P.; KHOSA, R. L. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 81–83, 1998.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, n. 1, p. 21–24, 1995.

PANDA, S.; KAR, A. *Annona squamosa* seed extract in the regulation of hyperthyroidism and lipid-peroxidation in mice: Possible involvement of quercetin. **Phytomedicine**, v. 14, n. 12, p. 799–805, 2007.

PARDHASARADHI, B. V.; REDDY, M.; ALI, A. M.; KUMARI, A. L.; KHAR, A. Antitumor activity of *Annona squamosa* seed extracts is through the generation of free radicals and induction of apoptosis. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 41, n. 4, p. 167-172, 2004.

PATHANIA, D.; MILLARD, M.; NEAMATI, N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 14, p. 1250–1275, 2009.

PAULO, M. Q.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; BARBOSA, R. C. B. B. C.; KAPLAN, M. A. C. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D. C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n.1, p. 39–41, 1992.

PAVETTI, C.; BASUALDO, I.; ORTIZ, M.; SORIA, N. **Plantas nativas de uso em medicina popular em El Paraguay**. 1. ed. Asunción/Paraguai: Ed. Universidad Nacional de Asunción, 1983, 19p.

PEDROSO, I. A.; LUNARDELLO, M. A.; MANHANI, M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de folhas e frutos de *Annona muricata*. **Revista Eletronica de Ciências**, n. 2, p. 61-63, 2008.

PESIC, M.; MARKOVIC J. Z.; JANKOVIC, D.; KANAZIR, S.; MARKOVIC, I. D.; RAKIC, L.; RUZDIJIC, S. Induced resistance in the human non small cell lung carcinoma (NCI-H460) cell line *in vitro* by anticancer drugs. **Journal of Chemotherapy**, v. 18, n. 1, p. 66-73, 2006.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S .W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, n.2, p. 83-94, 2004.

PETTIT, G. R. New bistetrahydrofuran deriv Rolliniastatin I - obtd. from *Rollinia mucosa*, useful as anti-neoplastic agent. **Universit Arizona State**, 2012.

PIEME, C. A.; KUMAR, S. G.; DONGMO, M. S.; MOUKETTE, B. M.; BOYOUM F. F.; NGOGANG, J. Y.; SAXENA, A. K. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 516, p. 516-519, 2014.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 209–212, 2003.

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

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. 1. ed. Brasília: Ed. EMBRAPA, 1994, 320p.

QUEIRÓZ, E. F.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R.; SERANI, L.; LAPRÉVOTE, O.; PAULO, M. Q. A new bistetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona salzmanii*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 5, p. 710-713, 1999.

QUEIRÓZ, E. F.; ROBLOT, F.; FIGADÈRE, B.; LAURENS, A.; DURET, P.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; SERANI, L.; LAPRÉVOTE, O.; COTTE-LAFFITTE J.; QUÉRO, A. M. Three new bistetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 1, p. 34-39, 1998.

QUEIRÓZ, E. F.; ROBLOT, F.; LAPRÉVOTE, O.; PAULO, M. Q.; HOCQUEMILLER, R. Two unusual acetogenins from the roots of *Annona salzmanii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 6, p. 755-758, 2003.

RAHMAN, M. M.; PARVIN, S.; HAQUE, M. E.; ISLAM, M. E.; MOSADDIK, M. A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 484-489, 2005.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2004.

RANGANATH, R. M.; NAGASHREE, N. R. Role of programmed cell death in development. **International Review of Cytology**, v. 202, p. 159-242, 2001.

RAYNAUD, S.; NÉMATI, F.; MICCOLI, L.; MICHEL, P.; POUPON, M. F.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Antitumoral effects of squamocin on parenteral and multidrug resistant MCF-7 (human breast adenocarcinoma) cell lines. **Life Sciences**, v. 65, n. 5, p. 525-533, 1999.

RAYNAUD-LE GRANDIC, S.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 6-7, p. 388-392, 2004.

REED, J. C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. **Seminars in Hematology**, v. 34, n. 4, p. 9-19, 1997.

REJON-ORANTES, J. D. C.; GONZALEZ-ESQUINCA, A. R.; DE LA MORA, M. P.; ROLDAN, G.; CORTES, D. Annomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. **Planta Medica**, v. 77, n. 4, p. 322-327, 2011.

RIBEIRO, L. P. **Exploring genetic biodiversity: secondary metabolites from neotropical Annonaceae as a potential source of new pesticides**. Tese de doutorado em Entomologia, Universidade de São Paulo, 2014, 170f.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 897-907, 2004.

RIEGER, A. J.; NELSON, K. L.; KONOWALCHUK, J. D.; BARREDA, D. R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. **Journal of Visualized Experiments**, v. 50, p. 1-4, 2011.

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. 100-108, 1996.

RIESER, M. J.; KOZLOWSKI, J. F.; WOOD, K. V.; MCLAUGHLIN, J. L. Muricatacin: a sample biologically active acetogenin derivative from the seeds of *Annona muricata* (Annonaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 9, p. 1137-1140, 1991.

ROBLOT, F.; LAUGEL, T.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; LAPRÉVOTE, O. Two acetogenins from *Annona muricata* seeds. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 281-285, 1993.

ROBBINS; C. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7 ed., Elsevier – Campus, 2005, 1480p.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048–1054, 2007.

ROOPAN, S. M.; BHARATHI, A.; KUMAR, R.; KHANNA, V. G.; PRABHAKARN, A. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of aqueous extract of *Annona squamosa* L peel as biomaterial for the reduction of palladium salts into nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, n. 1, p. 209–212, 2012.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: A review. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 2, p. 237–278, 1990.

SAAD, J. M.; HUI, Y. H.; RUPPRECHT, J. K.; ANDERSON, J. E.; KOZLOWSKI, J. F.; ZHAO, G. X.; WOOD, K. V.; MCLAUGHLIN, J. L. Reticulatacin: A new bioactive acetogenin from *Annona reticulata* (Annonaceae). **Tetrahedron**, v. 47, n. 16-17, p. 2751-2756, 1991.

SAHPAZ, S.; GONZÁLEZ, M. C.; HOCQUEMILLER, R.; ZAFRA-POLO, M. C.; CORTES, D. Annosenegalin and annogalene: two cytotoxic mono-THF acetogenins from *Annona senegalensis* and *Annona cherimolia*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 103-107, 1996.

SANTOS, I. A. **Caracterização anatômica e dendrométrica da madeira de *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae) com vistas à sua utilização mais apropriada**. Dissertação de Mestrado em Botânica. Universidade de Brasília, 2007, 53f.

SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 387-391, 1994.

SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; SUN, N. J.; CASSADY, J. M.; OLIVEIRA, A. B. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 705-707, 1996.

SANTOS, P. R. D.; MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dioica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 1-5, 2003.

SCHLIE-GUZMÁN, M. A.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; LUNA-CAZÁRES, L. M. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinai s y Aromaticas**, v. 8, n. 4, p. 245-257, 2009.

SCHWEICHEL, J. U.; MERKER, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, v. 7, n. 3, p. 253-266, 1973.

SECA, A. M. L.; GRIGORE, A.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 286-310, 2014.

SEFFRIN, R. C.; SHIKANO, I.; AKHTAR, Y.; ISMAN, M. B. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. **Crop Protection**, v. 29, n. 1, p. 20-24, 2010.

SHIMADA, H.; GRUTZNER, J. B.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L. Membrane conformations and their relation to cytotoxicity of asimicin and its analogues. **Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 854-866, 1998.

SIEBER, O. M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I. P. M. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. **Nature Reviews**, v. 3, n. 9, p. 701-708, 2003.

SILVA, E. L. M.; ROBLLOT, F.; MAHUTEAU, J.; CAVÉ, A. Coriadienin, the first annonaceous acetogenins with two double bonds isolated from *Annona coriaceae*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 5, p. 528-530, 1996.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVIC, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Santa Catarina: Editora UFSC, 2007, 1104p.

SHI, G.; GU, Z. M.; HE, K.; WOOD, K. V.; ZENG, L.; YE, Q.; MACDOUGAL, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Applying Mosher's method to acetogenin bearing vicinal diols. The absolute configurations of muricatetrocin C and rollidecins A and B, new bioactive acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 1281-1286, 1996a.

SHI, G.; KOZLOWSKI, J. F.; SCHWEDLER, J. T.; WOOD, K. V.; MACDOUGAL, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Muconin and muconin: additional nonclassical bioactive acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Journal Organic Chemistry**, v. 61, n. 23, p. 7988-7989, 1996b.

SHI, G.; MACDOUGAL, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 719-723, 1997.

SHI, G.; YE, Q.; HE, K.; MCLAUGHLIN, J. L. Rollinecins A and B: two new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 5, p. 548-551, 1996c.

SHI, G.; ZENG, L.; GU, Z. M.; MACDOUGAL, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Absolutes stereochemistries of sylvaticin and 12, 15-cis-sylvaticin, bioactive c-20, 23, cis non-adjacent bistetrahydrofuran annonaceous acetogenins, from *Rollinia mucosa*. **Heterocycles**, v. 41, n. 8, p. 1785-1796, 1995.

SHIRWAIKAR, A.; RAJENDRAN, K.; KUMAR, C. D.; BODLA, R. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin–nicotinamide type 2 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 171–175, 2004.

SON, J. K.; KIM, D. H.; WOO, M. H. Two new epimeric pairs of acetogenins bearing a carbonyl group from *Annona cherimolia* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1369-1372, 2003.

SONI, V. K.; YADAV, D. K.; BANO, N.; DIXIT, P.; PATHAK, M.; MAUTYA, R.; SAHAI, M.; JAIN, S. K.; MISRA-BHATTACHARYA, S. N-methyl-6, 7-dimethoxyisoquinolone in *Annona squamosa* twigs is the major immune modifier to elicit polarized Th1 immune response in BALB/c mice. **Fitoterapia**, v. 83, n. 1, p. 110–116, 2012.

SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 5, p. 372-377, 2008.

SUFFNESS, M.; DOUROS, J. Current status of the NCI plant and animal product program. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 1, p. 1-14, 1982.

SUFFNESS, M.; PEZZUTTO, J.M. **Assays related to cancer drug discovery**. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. v. 6. Academic Press, London, 1990, 220p.

SUFFNESS, S. M.; PEZZUTO, J. M. **Assays for cytotoxicity and antitumor activity**. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods of Plant Biochemistry*, v.9. Academic Press, London, 1991, 133p.

SULEIMAN, M. M.; DZENDA, T.; SANI, C. A. Antidiarrhoeal activity of the methanol stem-bark extract of *Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 125–130, 2008.

SUN, S.; LIU, J.; KADOUH, H.; SUN, X.; ZHOU, K. Three new anti-proliferative annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 12, p. 2773–2776, 2014.

TAKADA, M.; KUWABARA, K.; NAKATO, H.; TANAKA, A.; IWAMURA, H.; MIYOSHI, H. Definition of crucial factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1460, n. 2-3, p. 302-310, 2000.

TANTITHANAPORN, S.; WATTANAPIROMSAKUL, C.; ITHARAT, A.; KEAWPRADUB, N. Cytotoxic activity of acetogenins and styryl lactones isolated from *Goniothalamus undulatus* Ridl. Roots extracts against a lung cell line (COR-L23). **Phytomedicine**, v. 18, n. 6, p. 486-490, 2011.

TOILLON, R. A.; MAGNE, N.; LAIOS, I.; CASTADOT, P.; KINNAERT, E.; VAN HOUTTE, P.; DESMEDT, C.; LECLERCQ, G.; LACROIX, M. Estrogens decrease gamma-ray-induced senescence and maintain cell cycle progression in breast cancer cells independently of p53. **International Journal of Radiation Oncology**, v. 67, n. 4, p. 1187-1200, 2007.

TORMO, J. R.; DE PEDRO, N.; ROYO, I.; BARRACHINA, I.; ZAFRA-POLO, M. C.; CUADRILLERO, C.; HERNÁNDEZ, P.; CORTES, D.; PELÁEZ, F. *In vitro* antitumor structure-activity relationships of *threo/trans/threo/trans/erythro* bis-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. **Oncology Research**, v. 15, n. 3, p. 129-138, 2005.

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

TORMO, J. R.; GALLARDO, T.; GONZALÉZ, M. C.; BERMEJO, A.; CABEDO, N.; ANDREU, I.; ESTORNELL, E. Annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 2, p. 69-90, 1999.

VEGA, M. R. G. **Constituintes químicos de *Eupatorium macrocephalum* Less e *Annona dioica*: uma contribuição ao estudo de plantas medicinais no Paraguai**. Tese de Doutorado em Ciências, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006, 109f.

VEGA, M. R. G.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* Leaves and their Effects in Ehrlich Carcinoma Cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1554-1559, 2007.

VEGLIA, F.; VINEIS, P.; OVERVAD, K.; BOEING, H.; BERGMANN, M.; TRICHOPOULOU, A.; TRICHOPOULOS, D.; PALLI, D.; KROGH, V.; TUMINO, R.; LINSEISEN, J.; STEINDORF, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; TJONNELAND, A.; GONZALEZ, C. A.; MARTINEZ, C.; DORRONSORO, M.; BARRICARTE, A.; CIRERA, L.; QUIROS, J. R.; DAY, N. E.; SARACCI, R. ;

RIBOLI, E. Occupational exposures, environmental tobacco smoke, and lung cancer. **Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 769-775, 2007.

VIANA, F. B. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antineoplásica de complexos de cobre e zinco frente a linhagens leucêmicas e melanômicas.** Tese de doutorado em Ciências Naturais. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2012, 154f.

VILA NOVA, N. S. **Ação leishmanicida de alcaloides e acetogeninas extraídas de Annonaceae do Estado do Ceará.** Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias. Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, 2008.

VIVEK, R.; THANGAM, R.; MUTHUCHELIAN, K.; GUNASEKARAN, P.; KAVERI, K.; KANNAN, S. Green biosynthesis of silver nanoparticles from *Annona squamosa* leaf extract and its *in vitro* cytotoxic effect on MCF-7 cells. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2404-2410, 2010.

WAECHTER, A. I.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVÉ, A. Glaucafilin, an acetogenin from *Annona glauca*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1537-1540, 1997.

WÉLÉ, A.; MAYER, C.; DERMIGNY, Q.; ZHANG, Y.; BLOND, A.; BODO, B. Sequence and three-dimensional structure of cycloreticulins A and B, new cyclooctapeptides from the seeds of *Annona reticulata*. **Tetrahedron**, v. 64, n. 1, p. 154-162, 2008.

WÉLÉ, A.; ZHANG, Y.; BROUARD, J. P.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Annomuricatin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, n. 10-11, p. 981-988, 2004.

WENDT, J.; RADETZKI, S.; VON HAEFEN, C.; HEMMATI, P. G.; GUNER, D.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; DORKEN, B.; DANIEL, P. T. Induction of

p21CIP/WAF-1 and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. **Oncogene**, v. 25, n. 7, p. 972-980, 2006.

WHO. **Câncer**. Geneva: World Health Organization; 2014.

WOO, M. H.; KIM, D. H.; FOTOPOULOS, S. S.; MCLAUGHLIN, J. L. Annocherin and (2,4)-*cis*- and *trans*-annocherinones, monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins with a C-7 carbonyl group from *Annona cherimolia* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 9, p. 1250-1255, 1999.

WOO, M. H.; KIM, D. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Asitrilobins A and B: cytotoxic mono-THF Annonaceous acetogenins from the seeds of *Asimina triloba*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 5, p. 1033-1040, 1999b.

WOLVETANG, E. J.; JOHNSON, K. L.; KRAUER, K.; RALPH, S. J.; LINNANE, A. W. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. **FEBS Letters**, v. 339, n. 1-2, p. 40-44, 1994.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 136-142, 2011.

WU, Y. C.; CHANG, F. R.; DUH, C. Y.; WANG, S. K. Annoreticuin and isoannoreticuin-2 new cytotoxic acetogenins from *Annona reticulata*. **Heterocycles**, v. 34, n. 4, p. 667-674, 1992.

WU, T. S.; JONG, T. T.; TIEN, H. J.; KUOH, C. S.; FURUKAWA, H.; LEE, K. H. Annoquinone- A, an antimicrobial and cytotoxic principle from *Annona montana*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1623-1625, 1987.

WU, F. E.; ZENG, L.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; ZHANG, Y.; SCHWEDLER, J. T.; MCLAUGHLIN, J. L.; SASTRODIHARDJO, S. Muricatocins A and B, two new

monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 6, p. 902-908, 1995a.

WU, F. E.; ZENG, L.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; ZHANG Y.; SCHWEDLER, J. T.; MCLAUGHLIN, J. L.; SASTRODIHARDJO, S. New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, anomuricin and muricatocin C from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 6, p. 909-915, 1995b.

WU, F. E.; GU, Z. M.; ZENG, L.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; ZHANG Y.; SHWEDLER, J. T.; MCLAUGHLIN, J. L.; SASTRODIHARDJO, S. Two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, anomuricins A and B, from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 6, p. 830-836, 1995c.

WU, F. E.; ZHAO, G. X.; ZENG, L.; ZHANG Y.; SCHWEDLER, J. T.; MCLAUGHLIN, J. L.; SASTRODIHARDJO, S. Additional bioactive acetogenins, anomutacin and (2,4-*trans* and *cis*)-10*R*-annonacin-A-ones, from the leaves of *Annona cherimolia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 9, p. 1430-1437, 1995d.

XU, L.; CHANG, C. J.; YU, J. G.; CASSADY, J. M. Chemistry and selective cytotoxicity of annonacin-10-one, isoannonacin, and isoannonacin-10-one. Novel polyketides from *Annona densicoma* (Annonaceae). **Journal Organic Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 5418-5421, 1989.

XUE, J. Y.; ZHOU, G. X.; CHEN, T.; GAO, S.; CHOI, M. Y.; WONG, Y. S. Desacetyvaricin induces S phase arrest in SW480 colorectal cancer cells through superoxide overproduction. **Journal of cellular Biochemistry**, v. 115, p. 464-475, 2014.

YADAV, D. K.; SINGH, N.; DEV, K.; SHARMA, R.; SAHAI, M.; PALIT, G.; MAURYA, R. Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 666–675, 2011.

YAMADA, E. S.; RESPONDEK, G.; MUSSNER, S.; DE ANDRADE, A.; HOLLERHAGE, M.; DEPIENNE, C.; RASTETTER, A.; TARZE, A.; FRIGUET, B.; SALAMA, M.; CHAMPY, P.; OERTEL, W. H.; HOGLINGER, G. U. Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. **Experimental Neurology**, v. 253, p. 113-125, 2014.

YANG, H.; ZHANG, N.; LI, X.; CHEN, J.; CAI, B. Structure-activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against human tumor cells. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letter**, v. 19, n. 8, p. 2199-2202, 2009.

YEO, D.; DINICA, R.; YAPI, H. F.; FURDUI, B.; PRAISLER, M.; DJAMAN, A. J.; N'GUESSAN, J. D. Evaluation of the anti-inflammatory activity and phytochemical screening of *Annona senegalensis* leaves. **Therapie**, v. 66, n. 1, p. 73-80, 2011.

YUAN, F.; BAI, G.; CHEN, Y.; MIAO, Y.; CHEN, J.; LI, X. Structure–activity relationships of diverse ACGs against multidrug resistant human lung cancer cell line A549/Taxol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 4, p. 787–790, 2015.

YUAN, S. S. F.; CHANG, H. L.; CHEN, H. W.; KUO, F. C.; LIAW, C. C.; SU, J. H.; WU, Y. C. Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways. **Life Science**, v. 78, n. 8, p. 869–874, 2006.

YUAN, S. S. F.; CHANG, H. L.; CHEN, H. W.; YEH, Y. T.; KAO, Y. H.; LIN, K. H.; WU, Y. C.; SU, J. H. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests

cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Science**, v. 72, n. 25, p. 2853–2861, 2003.

ZAFRA-POLO, M. C.; FIGADERE, B.; GALLARDO, T.; TORMO, J. R.; CORTES, D. Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. **Phytochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1087-1117, 1998.

ZAFRA-POLO, M. C.; GONZÁLEZ, M. C.; ESTORNELL, E.; SAHPAHZ, S.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 253-271, 1996.

ZENG, L.; WU, F. E.; GU, Z. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Murihexocins A and B, two novel mono-THF acetogenins with six hydroxyls, from *Annona muricata* (Annonaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 30, p. 5291-5294, 1995.

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

ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N. H.; SHI, G.; GU, Z. M.; HE, K.; MCLAUGHLIN, J. L. Recent advances in annonaceous acetogenins. **Natural Products Report**, v. 13, p. 275-306, 1996b.

ZIEGLER, U.; GROUSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiological Science**, v. 19, p. 124-28, 2004.

ZHU, X. F.; LIU, Z. C.; XIE, B. F.; LI, Z. M.; FENG, G. K.; XIE, H. H.; WU, S. J.; YANG, R. Z.; WEI, X. Y.; ZENG, Y. X. Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60. **Life Science**, v. 70, n. 11, p. 1259-69, 2002.

ZHU, X. F.; XIE, B. F.; LI, Z. M.; FENG, G. K.; ZENG, Y. X.; LIU, Z. C. Mechanism of apoptosis induced by squamocin in leukemia cells. **Yao Xue Xue Bao**, v. 36, n. 7, p. 498-501, 2001.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 124-128, 2004.

ZOROFCHIAN, M. S.; KARIMIAN, H.; ROUHOLLAHI, E.; PAYDAR, M.; FADAEINASAB, M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* leaves induce G1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 277-289, 2014.

