



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LIVIA GARCIA PRADO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, CICATRIZANTE E
ANTICÂNCER DE ARATICUM (*Annona crassiflora* Mart.) *IN VITRO***

CAMPINAS

2018

LIVIA GARCIA PRADO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, CICATRIZANTE E
ANTICÂNCER DE ARATICUM (*Annona crassiflora* Mart.) *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Glaucia Maria Pastore

Coorientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Livia Garcia Prado, e orientada pela Prof.^a Dr.^a Glaucia Maria Pastore.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2016/15746-6; CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

P882a Prado, Livia Garcia, 1993-
Avaliação das atividades antioxidante, cicatrizante e anticâncer de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) *in vitro* / Livia Garcia Prado. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Glaucia Maria Pastore.

Coorientador: João Ernesto de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Annona crassiflora* Mart.. 2. Antioxidantes. 3. Compostos bioativos. 4. Cicatrização de feridas. 5. Atividade antiproliferativa. I. Pastore, Glaucia Maria. II. Carvalho, João Ernesto de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of antioxidant, wound healing and anticancer activities of araticum (*Annona crassiflora* Mart.) *in vitro*

Palavras-chave em inglês:

Annona crassiflora Mart.

Antioxidants

Bioactive compounds

Wound Healing

Antiproliferative activity

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Glaucia Maria Pastore [Orientador]

Giovanna Barbarini Longato

Juliano Lemos Bicas

Data de defesa: 25-05-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Glaucia Maria Pastore
Orientadora
DCA/FEA/UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Giovanna Barbarini Longato
Membro Titular
Universidade São Francisco (USF)

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
Membro Titular
DCA/FEA/UNICAMP

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho aos meus pais, que são meu maior exemplo, o maior motivo de eu ter chegado até aqui e o maior incentivo para que eu continue seguindo em frente.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de alimentos da UNICAMP por possibilitar a realização deste mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa (2016/15746-6) e pelo suporte financeiro. As opiniões, hipóteses e conclusões expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro;

À minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Glaucia Maria Pastore**, por todos os ensinamentos e pela confiança na execução deste projeto;

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho**, por todos os ensinamentos e por estar sempre disposto a ajudar;

Aos membros da Banca, por toda dedicação na correção, pela competência e por dividirem seu conhecimento para a melhoria desta dissertação;

À minha amiga, **Thais Petrochelli Banzato**, por todo apoio, por todos os ensinamentos, pela dedicação em me ajudar no desenvolvimento deste trabalho, por todo carinho e pela amizade. Esta vitória também é sua;

Às amigas do CPQBA, **Ana Lúcia, Sirlene, Ana Possenti, Karin, Lucia, Gisele, Adriana, Mariana, Tuany, Patrícia, Giovanna, Paula P., Paula M., Débora, Ilza, Érica, Núbia e Larissa** por todos os ensinamentos, por todo carinho e pela amizade;

Aos meus pais, **Luísa e José Luiz**, por todo amor. Muitos dos seus sonhos foram abdicados para que eu vivesse os meus. Dedico a vocês todas minhas vitórias.

Ao **Raul**, por todo cuidado, pelo apoio, pela paciência e por todo amor.

Aos amigos da FEA, **Murilo, Luísa, Henrique, Nayara, Gustavo, Angelica, Gabriela, Juliana, Líbia e Ana**, por todos os ensinamentos, por todo suporte e pela amizade.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho e fizeram destes anos melhores e mais leves, deixo meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar os extratos brutos da casca e das sementes de *Annona crassiflora* Mart., quantificar compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos condensados e investigar as atividades antioxidante, cicatrizante e anticâncer *in vitro* destes extratos. A caracterização dos extratos brutos foi feita por meio da análise por UHPLC-ESI-MS/MS. A quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos presentes nas amostras, bem como a capacidade antioxidante avaliada pelos ensaios de DPPH e TEAC foram efetuadas utilizando o espectrofotômetro e a avaliação da capacidade antioxidante por ORAC foi realizada em leitor de microplacas. Um ensaio antiproliferativo foi realizado com oito linhagens tumorais (U251, MCF-7, NCI-ADR/RES, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT-29 e K562) e duas linhagens não tumorais (HaCaT e 3T3) por meio da coloração de proteínas viáveis com sulforrodamina B. Ensaio de migração celular foi realizado com queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) e fibroblastos murinos (3T3) e a análise do ciclo celular com células de glioma (U251). Os compostos epicatequina (6221,63 µg/g) e catequina (579,40 µg/g) foram identificados como compostos majoritários do extrato da casca. Este extrato também apresentou 311,03 mg/g de fenóis totais, 117,12 mg/g de flavonoides, 179,94 mg/g de taninos e atividade antioxidante comprovada pelos ensaios DPPH (1065 µmol TE/g), TEAC (2022,13 µmol TE/g), ORAC hidrofílico (1302,68 µmol TE/g) e ORAC lipofílico (4643,78 µmol TE/g). No extrato das sementes, os compostos majoritários identificados foram a quercetina (21,11 µg/g) e o ácido clorogênico (16,41 µg/g). Foram quantificados 214,04 mg/g de fenóis totais, 23,74 mg/g de flavonoides, 3,27 mg/g de taninos e atividade antioxidante comprovada pelos ensaios DPPH (917 µmol TE/g), TEAC (190,54 µmol TE/g), ORAC hidrofílico (557,10 µmol TE/g) e ORAC lipofílico (5166,31 µmol TE/g). No ensaio antiproliferativo o extrato bruto da casca apresentou valor de TGI mais significativo para a linhagem tumoral de glioma (U251 – TGI = 37,64 µg/mL), ao passo que, o extrato bruto das sementes apresentou atividade antiproliferativa para as linhagens tumorais de ovário com fenótipo de resistência (NCI-ADR/RES – TGI = 5,36 µg/mL) e próstata (PC-3 – TGI = 16,60 µg/mL). O extrato das sementes induziu parada do ciclo celular na fase G2/M de células de glioma (U251), apresentando potencial como inibidor mitótico, enquanto a casca induziu a diminuição da subpopulação da fase G1. No ensaio de migração realizado com queratinócitos (HaCaT), o extrato das sementes induziu 73% de fechamento da ranhura na sua maior concentração (3,6 µg/mL) e o extrato da casca inibiu a migração, permitindo que apenas 3,8% da ranhura fosse fechada em sua maior concentração (36 µg/mL). Já no ensaio com fibroblastos murinos (3T3), o extrato da casca induziu 34% de fechamento (3,1 µg/mL) e o das sementes 28% (1,5 µg/mL). Ambos os extratos de araticum apresentaram atividades antioxidante e anticâncer, e o extrato das sementes ação cicatrizante. Estes resultados inéditos sugerem um potencial no uso dos extratos de araticum como fonte de novos fármacos cicatrizantes e anticâncer ou no enriquecimento de alimentos processados.

Palavras-chave: Araticum, *Annona crassiflora* Mart., capacidade antioxidante, compostos bioativos, migração celular, cicatrização, atividade anticâncer.

ABSTRACT

This study aimed to characterize the crude extracts of *Annona crassiflora* Mart. peel and seed, quantify the phenolic compounds, flavonoids and condensed tannins and investigate the antioxidant, wound healing and anticancer activities *in vitro* of these extracts. The characterization of the crude extracts was performed by UHPLC-ESI-MS/MS analysis. The quantification of total phenolic compounds, flavonoids and tannins present in the samples, as well as the antioxidant capacity evaluated by the DPPH and TEAC assays were performed by spectrophotometer analysis and the evaluation of the antioxidant capacity by ORAC was performed in a microplate reader. Antiproliferative assay was performed with eight tumor lines (U251, MCF-7, NCI-ADR/RES, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT-29 e K562) and two non-tumoral lines (HaCaT e 3T3) by staining viable proteins with sulforhodamine B. Cell migration experiment was performed with immortalized human keratinocytes (HaCaT) and murine fibroblasts (3T3) and the analysis of cell cycle with glioma cells (U251). The compounds epicatechin (6221.63 µg/g) and catechin (579.40 µg/g) were identified as major compounds of the peel extract. This extract also showed 311.03 mg/g phenolic compounds, 117.12 mg/g flavonoids, 179.94 mg/g tannins and antioxidant activity proven by the DPPH (1065 µmolTE/g), TEAC (2022.13 µmolTE/g), hydrophilic ORAC (1302.68 µmolTE/g) and lipophilic ORAC (4643.78 µmolTE/g) assays, respectively. In the seed extract, the major compounds identified were quercetin (21.11 µg/g) and chlorogenic acid (16.41 µg/g). A total of 214.04 mg/g phenolic compounds, 23.74 mg/g flavonoids and 3.27 mg/g tannins was quantified and the antioxidant activity was proven by the DPPH (917 µmolTE/g), TEAC (190.54 µmolTE/g), hydrophilic ORAC (557.10 µmolTE/g) and lipophilic ORAC (5166.31 µmolTE/g) assays. In the antiproliferative assay the crude peel extract presented TGI significant value for glioma (U251 – TGI = 37.64 µg/mL) tumor line. While the crude extract of the seeds presented antiproliferative activity especially in ovary strains with resistance phenotype (NCI-ADR/RES – TGI = 5.36 µg/mL) and prostate (PC-3 – TGI = 16.60 µg/mL). Seed extract arrest the cell cycle in the G2/M stage of glioma cells (U251), presenting potential as a mitotic inhibitor, while the peel extract caused a decrease in the subpopulation of the G1 stage. In the migration test performed with keratinocytes (HaCaT), the seed extract induced 73% slot closure at its highest concentration (3.6 µg/mL) and the peel extract inhibited the migration, allowing only 3,8% slot closure at its highest concentration, (36 µg/mL). In the murine fibroblast (3T3) assay, the peel extract induced 34% closure (3.1 µg/mL) and the seed 28% (1.5 µg/mL). Both extracts of araticum presented antioxidant and anticancer activities, and the seed extract presented a healing action. These inedited results suggest a potential in the use of araticum as a source of new healing and anticancer drugs or in the enrichment of processed foods.

Keywords: Araticum, *Annona crassiflora* Mart., antioxidant capacity, bioactive compounds, cell migration, wound healing, anticancer activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Annona crassiflora* Mart. **A:** Árvore; **B:** Folhas (**Fotos:** Livia Garcia Prado); **C:** Flores; **D:** Fruto (**Fotos:** Maurício Mercadante).....24
- Figura 2:** Estruturas químicas de compostos fenólicos comumente encontrados em plantas. Estruturas obtidas com auxílio do banco de dados do PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).....28
- Figura 3:** Fluxograma das principais características de cada fase da cicatrização.....32
- Figura 4 -** Esquema de configuração das amostras e do controle positivo doxorrubicina na placa de 96 poços no teste de atividade antiproliferativa. Amostras e controle positivo foram testados em triplicata. O branco da amostra é composto por meio e amostra ou meio e doxorrubicina. Os demais poços não foram preenchidos.....45
- Figura 5:** Gráficos da atividade antiproliferativa dos extratos brutos da casca e das sementes de araticum e do quimioterápico doxorrubicina em cultura de células tumorais e não tumorais, relacionando porcentagem de crescimento com a concentração, após 48 horas de incubação. Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (cólon); K562 (leucemia). Linhagens não tumorais: HaCaT (queratinócito humano); 3T3 (fibroblasto murino).....59
- Figura 6:** Migração de queratinócitos humanos imortalizados tratados com meio enriquecido com SFB 5% (**A**), com meio sem enriquecimento (**B**), com extrato das sementes na concentração de 3,6 µg/mL (**C**), com extrato das sementes na concentração de 1,8 µg/mL (**D**), com extrato da casca na concentração 36 µg/mL (**E**) e com extrato da casca na concentração de 18 µg/mL (**F**) nos tempos 0, 9, 18 e 24 horas.....63
- Figura 7:** Migração de fibroblastos murinos tratados com meio enriquecido com SFB 5% (**A**), com meio sem enriquecimento (**B**), com extrato das sementes na concentração de 1,5 µg/mL (**C**), com extrato das sementes na concentração de 0,75 µg/mL (**D**), com extrato da casca na concentração de 6,2 µg/mL (**E**) e com extrato da casca na concentração de 3,1 µg/mL (**F**) nos tempos 0, 9, 18 e 24 horas.....64
- Figura 8:** Análise do comportamento do extrato das sementes e do extrato da casca de araticum nas fases do ciclo celular. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença

estatisticamente significante em relação ao grupo controle negativo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni).....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas no ensaio de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> e suas respectivas densidades de inoculação (DI).....	43
Tabela 2: Perfil de compostos fenólicos dos extratos brutos da casca e das sementes de <i>Annona crassiflora</i> Mart. por UHPLC-ESI-MS/MS.....	51
Tabela 3: Conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos condensados presentes nos extratos brutos da casca e das sementes de <i>Annona crassiflora</i> Mart e análise da capacidade antioxidante pelos ensaios DPPH, TEAC, ORAC hidrofílico e ORAC lipofílico.....	53
Tabela 4: Valores da concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (TGI – µg de extrato/mL) do teste de atividade antiproliferativa.....	58
Tabela 5: Porcentagem de fechamento da ranhura do ensaio de migração celular com queratinócitos humanos imortalizados HaCaT após 24 horas de tratamento.....	62
Tabela 6: Porcentagem de fechamento da ranhura do ensaio de migração celular com fibroblastos murinos 3T3 após 24 horas de tratamento.....	62
Tabela 7: Porcentagem de células viáveis ao final do ensaio de migração celular com HaCaT.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$: Oxigênio singlete

3T3: Linhagem celular de fibroblastos murinos

786-0: Linhagem celular de adenocarcinoma de rim

AAPH: 2,2'-azobis-(2'-metilpropionamidina)-dihidrocloreto

ABTS $^{\bullet+}$: Radical Cátion 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ADPPH: Absorbância da Solução de DPPH

AlCl_3 : Cloreto de alumínio

AUC: Área de decaimento sobre a curva

bFGF: Fator de crescimento de fibroblastos

CGEN: Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CO_2 : Dióxido de carbono

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DFT: Divisão de Farmacologia e Toxicologia

DI: Densidade de inoculação

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DPPH $^{\bullet}$: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DPPHIC50: Concentração final do extrato em $\mu\text{g/mL}$ requerida para decrescer ou inibir 50 % da concentração inicial do radical DPPH $^{\bullet}$.

DPPHTrolox: Atividade Sequestradora do Radical DPPH $^{\bullet}$ Equivalente ao Trolox $^{\text{®}}$

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EGF: Fator de crescimento epidermal

ESI: Fonte de ionização por electrospray (*Electrospray ionization*)

FEA: Faculdade de Engenharia de Alimentos

GI50: Inibição de 50% do crescimento (*50% of Growth Inhibition*)

HaCaT: Linhagem celular de queratinócito humano imortalizado

HCl: Ácido clorídrico

HepG2: Linhagem celular de câncer de fígado

HL-60: Linhagem celular de leucemia

Hotspot: Área de conservação prioritária

HT-29: Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal

HTC-8: Linhagem celular de carcinoma de cólon

IL-1- β : Interleucina-1

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IQM: Instituto de Química

K562: Linhagem celular de leucemia

LBCB: Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos

MCF-7: Linhagem celular de adenocarcinoma de mama

MDA-MB-435: Linhagem celular de melanoma

NaNO₂: Nitrito de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NCI: Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*)

NCI-ADR/RES: Linhagem celular de adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas

NCI-H460: Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células

NO•: Radical óxido nítrico

O₂•⁻: Radical superóxido

OH•: Radical hidroxila

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORAC: Capacidade de absorção do radical oxigênio

OVCAR-3: Linhagem celular de adenocarcinoma de ovário

PBS: Solução salina tamponada (*Phosphate buffered saline*)

PC-3: Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

pH: Potencial hidrogeniônico

RMCD: Ciclodextrina metilada randomizada

RNA: Ácido ribonucléico

RNS: Espécies reativas de nitrogênio

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RPM: Rotações por minuto

RPMI-1640: Meio de cultura – série 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*)

SF-295: Linhagem celular de glioblastoma

SFB: Soro fetal bovino

SRB: Sulforrodamina B

TCA: Ácido tricloroacético

TE: Equivalentes de Trolox

TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox®

TGF-β: Fator de crescimento

TGI: Inibição total do crescimento (*Total Growth Inhibition*)

TNF- α : Fator de necrose tumoral

Trolox®: Ácido ($\pm$) – 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromama-2-carboxílico

U251: Linhagem celular de glioma

UACC-62: Linhagem celular de melanoma

UEC: Herbário da Universidade Estadual de Campinas

UHPLC: Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho (*Ultra-high performance liquid chromatography*)

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1. Cerrado.....	23
3.2. <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	24
3.3. Compostos Bioativos.....	26
3.4. Capacidade antioxidante.....	29
3.5. Cicatrização.....	30
3.6. Câncer.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Matéria-prima, coleta e preparo das amostras.....	36
4.2. Depósito da amostra no herbário e SisGen.....	36
4.3. Extração.....	37
4.4. Perfil de compostos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS.....	37
4.5. Determinação de compostos bioativos.....	38
4.5.1. Compostos fenólicos totais.....	38
4.5.2. Determinação do conteúdo de flavonoides.....	39
4.5.3. Determinação de taninos condensados.....	39
4.6. Ensaio de capacidade antioxidante.....	39
4.6.1. Atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.....	39
4.6.2. Determinação da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox®.....	40
4.6.3. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).....	41
4.6.3.1. Fração hidrofílica.....	41
4.6.3.2. Fração lipofílica.....	42
4.6.3.3. Análise de dados.....	42
4.7. Ensaio de atividade biológica <i>in vitro</i>	43
4.7.1. Atividade antiproliferativa.....	43
4.7.1.1. Linhagens celulares.....	43
4.7.1.2. Ensaio de atividade antiproliferativa.....	44
4.7.1.3. Análise dos dados.....	45

4.7.2.	Ensaio de migração celular com queratinócitos humanos HaCaT.....	46
4.7.2.1.	Ensaio de viabilidade celular com queratinócitos humanos HaCaT...	47
4.7.3.	Ensaio de migração celular com fibroblastos murinos 3T3.....	47
4.7.4.	Citometria de fluxo.....	48
4.7.4.1.	Análise do ciclo celular.....	48
4.7.4.2.	Análise dos resultados.....	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1.	Perfil de compostos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS.....	50
5.2.	Determinação do conteúdo de compostos bioativos e capacidade antioxidante.....	52
5.3.	Teste de atividade antiproliferativa.....	57
5.4.	Ensaio de migração celular com queratinócitos e fibroblastos.....	60
5.5.	Ensaio de viabilidade celular por sulforrodamina em queratinócitos HaCaT.....	67
5.6.	Análise do ciclo celular.....	68
6.	Considerações finais.....	70
7.	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO.....	86

1. INTRODUÇÃO GERAL

Desde a antiguidade o homem busca alternativas na natureza para o tratamento de diferentes tipos de doenças e feridas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, ao enfrentar alguma doença, a grande maioria da população recorre primeiramente a tratamentos com algum medicamento derivado de produtos naturais (Farnsworth *et al.*, 1985; Newman & Cragg, 2016; Fox *et al.*, 2017). Alguns compostos presentes nas plantas, como os flavonoides e demais fenólicos, podem acelerar o processo de cicatrização e prevenir doenças como o câncer por meio da indução de vias intercelulares, da modulação de angiogênese e da atividade antioxidante (Mensah *et al.*, 2001; Farahpour *et al.*, 2016; Moghadam *et al.*, 2017).

O Cerrado, segundo maior bioma da América do Sul, possui mais de 4000 espécies de plantas endêmicas, das quais poucas são comercializadas e a maioria ainda não teve seu potencial explorado (Souza *et al.*, 2012; Bailão *et al.*, 2015). O solo do Cerrado é pobre em nutrientes e a flora é rica em compostos fitoquímicos com potencial farmacológico, sendo que os mais comumente encontrados são os ácidos fenólicos, taninos, carotenoides, aminoácidos e fosfolipídios (Roesler *et al.*, 2006; Roesler *et al.*, 2010; Bailão *et al.*, 2015; Morais *et al.*, 2017).

Os membros da família Annonaceae, encontrados neste bioma, são ricos em compostos com ação antioxidante, citoprotetora, antiestrogênica e antimutagênica, e são muito utilizados na medicina popular (Bailão *et al.*, 2015; Vendramini-Costa *et al.*, 2017). Dentre suas espécies, destaca-se o araticum (*Annona crassiflora* Mart.), também conhecido como bruto, pinha do cerrado, cabeça-de-negro, panã, cascudo e marolo. Rico em compostos fitoquímicos, como carotenoides, ácido ascórbico, flavonoides, taninos, tocoferóis, minerais e vitaminas (Dragano *et al.*, 2010; Arruda, 2015), o araticum já foi descrito por suas atividades antimicrobiana (Silva *et al.*, 2014), antimutagênica (Vilar *et al.*, 2008; Dragano *et al.*, 2010), no tratamento de reumatismo e doenças degenerativas (Arruda, 2015), antiproliferativa (Formagio *et al.*, 2015b), antidiarreica (Arruda, 2015), nematicida (Machado *et al.*, 2015), antiparasitária (Mesquita *et al.*, 2005) e contra acidentes ofídicos (Arruda, 2015). Apesar de ser muito utilizado na medicina popular como cicatrizante, não existem estudos na literatura que demonstrem sua eficácia. O araticum, por ser rico em compostos bioativos e antioxidantes, pode ser uma ótima fonte no desenvolvimento de novos medicamentos que

atuem como promotores de cicatrização e também como preventivos de doenças como o câncer.

Os antioxidantes auxiliam no processo de cicatrização por meio do combate aos radicais livres produzidos em excesso no local da lesão. Ao combater estes radicais, os antioxidantes impedem possíveis danos às células essenciais no reparo tecidual (Moghadam *et al.*, 2017). A ação antioxidante das plantas medicinais é relacionada em grande parte à sua quantidade de compostos bioativos como os flavonoides, que além de atuarem como antioxidantes atuam nas prostaglandinas e nos macrófagos, agindo diretamente na fase inflamatória (Gupta *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2008; Krishnaiah *et al.*, 2009). Os flavonoides agem prevenindo o aparecimento de células necróticas na lesão, inibindo as espécies reativas de oxigênio (ROS), modulando enzimas, auxiliando na formação de novos vasos, modulando vias e evitando danos celulares. Atuam também no aumento da resistência das fibras de colágeno, possuem propriedades antimicrobianas, como a alteração da membrana celular de bactérias, e auxiliam no processo de contração e reepitelização das feridas (Ambiga *et al.*, 2007; Moghadam *et al.*, 2017).

Os taninos também já foram descritos por sua ação na cicatrização de feridas. Araújo *et al.*, (2008) demonstraram que existe uma correlação positiva entre o uso de plantas como cicatrizante na medicina popular e sua quantidade de taninos. Os taninos também possuem uma ação adstringente, o que faz com que ocorra a formação de uma película protetora no local da ferida, e agem estimulando a angiogênese e permitindo que as células cheguem mais facilmente ao local da lesão, auxiliando o processo cicatricial (Barroso *et al.*, 2010; Moghadam *et al.*, 2017).

O processo de cicatrização é iniciado na tentativa de restabelecer a integridade do tecido quando ocorre uma lesão. Este processo é dividido em quatro fases interdependentes: hemostase, inflamação, proliferação e remodelamento (Balbino *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2017). A inflamação dá início aos reparos do tecido, à vasoconstrição e à formação de um trombo. (Rodrigues, 2011; Mayo *et al.*, 2017; Takagi *et al.*, 2017). Após a fase inflamatória, tem início a fase de proliferação, na qual ocorre a reepitelização, com o aumento das mitoses, migração de queratinócitos, produção de colágeno e formação da nova matriz extracelular e do tecido de granulação (Mandelbaum *et al.*, 2003; Rodrigues, 2011; Mayo *et al.*, 2017). A próxima fase é a de remodelamento, caracterizada pelo movimento de contração da ferida, formação da matriz extracelular e presença de colágeno (Mandelbaum *et al.*, 2003; Mayo *et al.*, 2017).

Por ser um processo extremamente complexo, a cicatrização pode ter interferência de fatores como a diabetes, que causa um atraso na cicatrização, tornando o processo mais lento e menos eficiente, e fazendo com que algumas feridas se tornem crônicas (Mandelbaum *et al.*, 2003; Ponrasu *et al.*, 2014). Uma má cicatrização pode levar a perda de função do tecido, a cronificação de lesões e a amputação, as quais podem causar além de danos físicos, danos psíquicos, sociais e econômicos (Mandelbaum *et al.*, 2003). Dentre os medicamentos utilizados como promotores de cicatrização existem os que apresentam produtos naturais e derivados em sua composição. A pomada para cicatrização Contractubex® (Merz) possui cepalin em sua composição, extrato derivado da cebola (*Allium cepa*), o gel Cicatricure® (Genomma Lab) possui extrato de babosa (*Aloe barbadensis*), extrato de cebola (*Allium cepa*) e extrato de camomila (*Chamomilla recutita*), o gel c-Kaderm® (Mantecorp) óleo de Rosa Mosqueta (*Rosa rubiginosa affinis*) e a pomada Bepantol® (Bayer) óleo de amêndoas (*Prunus Amygdalus Dulcis*). Os medicamentos disponíveis muitas vezes não são eficientes para o tratamento de feridas crônicas e são comercializados com altos preços, sendo inacessíveis para parte da população. Neste sentido é essencial a investigação de novas substâncias com potencial cicatrizante que sejam mais eficientes que as que já estão no mercado. Produtos naturais que apresentem atividades biológicas, como antioxidante e antimicrobiana, têm sido visados para o desenvolvimento de novos medicamentos cicatrizantes (Moghadam *et al.*, 2017).

Produtos naturais também são alvos de pesquisas voltadas para a descoberta de compostos que possam ser empregados na fabricação de novos fármacos para o câncer (Newman & Cragg, 2016). Câncer é um nome dado a um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação desordenada de diferentes tipos celulares. O processo de desenvolvimento do câncer é dividido em três etapas denominadas iniciação, promoção e progressão (George *et al.*, 2017). O crescimento descontrolado que ocorre pode ser causado por uma série de fatores e abranger todas as partes do organismo. Dentre os fatores de risco estão, por exemplo, a exposição a substâncias químicas, o histórico familiar e inflamação crônica (INCA, 2017; NCI, 2017). Estima-se que entre 2018 e 2019 surjam aproximadamente um milhão e duzentos mil novos casos de câncer no Brasil, sendo o câncer de pele não melanoma mais frequente, seguido dos cânceres de próstata em homens e mama em mulheres. O crescente número de casos alerta para a necessidade da busca contínua por novos medicamentos e terapias e para a descoberta de novas substâncias com potencial anticâncer (Longato *et al.*, 2015; Vendramini-Costa *et al.*, 2017; INCA, 2018).

Os flavonoides, por exemplo, apresentam potencial anticâncer ao inibirem células tumorais por meio da modulação de mecanismos de invasão, indução de apoptose e parada no ciclo celular. Também agem como antiproliferativos, regulam a produção de radicais livres e estão envolvidos com os mecanismos de inflamação (Sudan & Rupasinghe, 2014; George *et al.*, 2017).

Além dos flavonoides, os taninos também já foram descritos por atuar na inibição da proliferação celular e da migração de células tumorais, no bloqueio de mecanismos de invasão e na modulação de genes relacionados ao processo de carcinogênese, auxiliando, portanto, o controle do câncer. Atuam também modulando o crescimento tumoral e induzindo paradas no ciclo celular (Araújo *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2017).

A casca e as sementes de araticum são fontes de inúmeros compostos fitoquímicos. Ambas as partes do fruto geralmente se tornam resíduos após o consumo da fruta *in natura* ou de seu uso na fabricação de doces e sorvetes. Desta forma, o atual estudo propôs a elaboração e a caracterização dos extratos brutos da casca e das sementes, a quantificação de compostos fenólicos presentes nestes extratos e a avaliação das atividades antioxidante, cicatrizante e anticâncer. O estudo de fontes de antioxidantes, assim como a descoberta de substâncias que possam auxiliar em patologias como as feridas crônicas e o câncer são essenciais na área farmacêutica, alimentícia e cosmética. O araticum, sendo fonte de antioxidantes e compostos bioativos, poderia ser empregado na fabricação de medicamentos, na conservação de alimentos e no desenvolvimento de cremes antienvelhecimento. No campo da farmacologia poderia ser utilizado na formulação de pomadas cicatrizantes e medicamentos que auxiliem no tratamento do câncer. Na indústria alimentícia poderia ser empregado como matéria-prima na fabricação de alimentos processados ou na forma de suplemento alimentar.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as atividades antioxidante, cicatrizante e anticâncer dos extratos brutos da casca e das sementes de araticum.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter os extratos brutos da casca e das sementes de araticum;
- Determinar o perfil de compostos fenólicos presentes nos extratos;
- Determinar o conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos condensados;
- Analisar a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos de araticum;
- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* destes extratos em linhagens celulares tumorais e não tumorais;
- Avaliar a capacidade cicatrizante *in vitro* destes extratos;
- Investigar a ação dos extratos no ciclo celular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma presente no Brasil, sendo encontrado em mais de doze estados e ocupando 1,8 milhões de km², aproximadamente 25% de todo o território. Possui uma grande biodiversidade, sendo responsável por aproximadamente um terço de todas as espécies de plantas e animais presentes no país. São encontradas aproximadamente 4500 espécies de árvores, arbustos, ervas e trepadeiras (Roesler *et al.*, 2007a; Dragano *et al.*, 2010; Arruda *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2017). A flora nativa possui características específicas, com árvores retorcidas e pequenas (Arruda *et al.*, 2015).

O solo é pobre em nutrientes e possui grande quantidade de ferro e alumínio, mas apesar disso, é considerado um dos lugares de maior biodiversidade do mundo (Arruda, 2015). As plantas presentes no Cerrado chamam atenção por sua composição, rica em vitaminas, minerais, proteínas, fibras e compostos fenólicos (Dragano *et al.*, 2010; Arruda, 2015; Arruda *et al.*, 2015; Arruda *et al.*, 2016). As frutas do cerrado são consumidas frescas pelos nativos ou utilizadas na confecção de geleias, sorvetes e licores (Dragano *et al.*, 2010; Arruda *et al.*, 2015). Dentre as plantas encontradas no cerrado, membros da família Annonaceae, que abrange aproximadamente 290 espécies, têm sido utilizados na medicina popular no tratamento de doenças intestinais, tendo ação antiparasitária e antitumoral (Roesler *et al.*, 2007a; Formagio *et al.*, 2015b; Justino *et al.*, 2016).

Apesar de ser um dos biomas mais estimados do mundo, a vegetação vem sofrendo com o desmatamento causado pelo agronegócio. Ao andar pelo Cerrado é possível ver áreas enormes destinadas às plantações e à criação de gado, o que causa um grande impacto ambiental (Santos *et al.*, 2017). A expansão deste modelo econômico coloca em risco espécies endêmicas. Por sofrer uma grande ameaça de extinção, o Cerrado passou a ser considerado um *hotspot* da biodiversidade, sendo uma área de conservação prioritária (Pereira & Santos, 2015). Uma saída para o aproveitamento econômico sustentável é a utilização dos frutos na culinária, na indústria e na pesquisa (Arruda, 2015; Pereira & Santos, 2015), tornando o desenvolvimento de estudos sobre espécies endêmicas do Cerrado fundamental para difusão do conhecimento e auxílio na preservação deste bioma tão biodiverso.

3.2. *Annona crassiflora* Mart.

Conhecida popularmente como araticum, marolo, araticum-do-cerrado, pasmada, cabeça-de-negro, panã, cascudo, pinha-do-cerrado ou bruto, a *Annona crassiflora* Mart. é uma planta nativa do Cerrado brasileiro e pertence à ordem Magnoliales e à família Annonaceae (Luzia & Jorge, 2013; Arruda *et al.*, 2015; Arruda, *et al.*, 2017a). Está entre as espécies mais consumidas na região, seja *in natura* ou em forma de sucos, geleias, sorvetes e licores, no entanto, os frutos de araticum não apresentam grande valor econômico no país, sendo vendidos em feiras e na beira de estradas (Roesler *et al.*, 2007a; Arruda, 2015). Sua frutificação ocorre entre os meses de fevereiro e abril (Roesler *et al.*, 2007a; Arruda *et al.*, 2015; Moraes *et al.*, 2017). A árvore do araticum chega a medir até oito metros de altura, podendo produzir até oitenta frutos (Figura 1A) e cada fruto pode produzir mais de 100 sementes (Luzia & Jorge, 2013; Arruda, 2015; Arruda *et al.*, 2018). Possui mecanismos para evitar a perda de água e também para resistir em meio a queimadas. As folhas são crasso-membranosas e se intercalam nos galhos (Figura 1B). As flores possuem coloração amarelada, pétalas grossas e geralmente são solitárias (Figura 1C). Os frutos apresentam forma oval e possuem cor marrom quando maduros, são arredondados e podem pesar mais de quatro quilos (Figura 1D).



Figura 1: *Annona crassiflora* Mart. **A:** Árvore; **B:** Folhas (**Fotos:** Lívia Garcia Prado); **C:** Flores; **D:** Fruto (**Fotos:** Maurício Mercadante).

O araticum possui grande potencial nutricional, é fonte de oligossacarídeos prebióticos e rico em compostos bioativos como carotenoides, alcaloides, vitaminas, como o ácido ascórbico, e minerais, como fósforo, cálcio, ferro e potássio. Também possui compostos fenólicos como o ácido clorogênico, epicatequina, ácido ferúlico, rutina, quercetina e xantoxilina. Suas sementes possuem um policetídeo citotóxico classificado como acetogenina e conhecido como crassiflorina ou araticulina (Santos *et al.*, 1996; Roesler *et al.*, 2007a; Dragano *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014; Arruda *et al.*, 2015; Justino *et al.*, 2016; Arruda, *et al.*, 2017a; Arruda *et al.*, 2017b; Justino *et al.*, 2017).

Santos & Sant'ana (2001) descreveram a atividade moluscicida dos extratos etanólicos de diferentes partes do araticum. Omena *et al.*, (2007) afirmaram que os extratos etanólicos da raiz e do tronco de araticum possuem poder larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*. Frações derivadas do extrato etanólico das folhas de araticum, ricas em flavonoides e alcaloides, foram testadas quanto sua ação antimalárica em um ensaio com camundongos e apresentaram resultados positivos (Pimenta *et al.*, 2014). A atividade antimicrobiana dos extratos do tronco, da polpa, da casca, das folhas e das sementes foi demonstrada por meio de experimentos feitos com *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (Silva *et al.*, 2014). Também foi descrita a atividade nematicida do extrato etanólico da folha (Machado *et al.*, 2015). Pereira *et al.*, (2017) isolaram pela primeira vez o alcaloide denominado estefalagina na casca de araticum, e descreveram seu potencial contra a obesidade. Em um estudo recente, ratos diabéticos tratados com uma fração enriquecida com polifenóis, originada do extrato etanólico bruto da casca de araticum, apresentaram uma diminuição nos níveis de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina, além de uma diminuição da peroxidação lipídica, na carbonilação de proteínas e aumento da capacidade antioxidante, demonstrando sua ação na prevenção de complicações causadas pela diabetes (Justino *et al.*, 2017)

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos das sementes e da casca foi demonstrada por meio de um ensaio de peroxidação lipídica *in vivo* com enzimas hepáticas (Roesler 2011). Vilar *et al.*, (2008) demonstraram as atividades citotóxica e antimutagênica do extrato etanólico das folhas em um ensaio de micronúcleo realizado com camundongos machos da linhagem Swiss. A citogenotoxicidade dos extratos etanólicos das sementes e das folhas, que pode estar relacionada a alterações celulares e inibição da mitose, foi descrita por Ribeiro *et al.*, (2013). Formagio *et al.*, (2015b) descreveram a atividade antiproliferativa dos

extratos metanólicos das sementes e das folhas do araticum em linhagens celulares tumorais de glioma (U251), melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), pulmão (NCI-H460), rim (786-0), cólon (HT-29), ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas (NCI-ADR/RES), ovário (OVCAR-3) e leucemia (K562). A atividade antioxidante das sementes e da casca também foi descrita por Justino *et al.*, (2016). Arruda *et al.*, (2018) descreveram a atividade antioxidante das frações livre, esterificada, glicosilada e insolúvel dos extratos da polpa, das sementes e da casca de araticum. Apesar de algumas atividades biológicas já terem sido descritas, muitas questões sobre os mecanismos de ação responsáveis pela atuação do araticum nas diferentes áreas ainda precisam ser elucidadas.

3.3. Compostos Bioativos

Compostos bioativos são classificados como metabólitos secundários, produzidos pelo metabolismo de plantas, legumes e frutas. Apresentam grandes potenciais terapêuticos e são importantes na manutenção da saúde humana (Singh *et al.*, 2016). Moléculas bioativas advindas de produtos naturais são de grande valia para as indústrias farmacêutica, química e biotecnológica (Chandika *et al.*, 2015; Ghitescu *et al.*, 2015; Arruda *et al.*, 2017b). O uso de produtos naturais, ricos em compostos bioativos, como adjuvantes no tratamento de doenças crônicas vêm crescendo. As plantas, por exemplo, têm sido cada vez mais visadas como fontes de compostos fitoquímicos utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer, e são utilizadas para amenizar os efeitos colaterais causados por terapias agressivas (Cai *et al.*, 2017; George *et al.*, 2017).

Em fontes naturais, os compostos bioativos mais encontrados são os compostos fenólicos, presentes em legumes, cereais, vegetais, frutas. Em alimentos processados estão presentes na matéria-prima, como é o caso do cacau no chocolate e da uva no vinho, por exemplo. Estes compostos são responsáveis pelas propriedades sensoriais dos alimentos, atribuindo cor, sabor, aroma e adstringência (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014; Arruda, 2015; Köksal *et al.*, 2017; Ouchemoukh *et al.*, 2017). Os fenóis também estão relacionados com os mecanismos de proteção das plantas contra a radiação ultravioleta e contra patógenos, e também com a reprodução (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014; Köksal *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). A quantidade de fenólicos encontrada nas plantas varia de acordo com as condições ambientais, grau de maturação e fatores genéticos (Formagio *et al.*, 2015a).

Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes, moduladores de transdução, agentes antiproliferativos e anti-inflamatórios. Estes compostos agem prevenindo danos celulares e reduzindo a ocorrência de doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes e certos tipos de câncer (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014; Ghitescu *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2017; Köksal *et al.*, 2017). A ingestão de compostos fenólicos já foi descrita como inversamente proporcional ao desenvolvimento das doenças supracitadas (Chen *et al.*, 2018). Na indústria de cosméticos, os compostos fenólicos são utilizados em produtos contra o envelhecimento, por agirem estimulando a produção de colágeno, contra a oxidação lipídica e contra os efeitos da radiação (Suvanto *et al.*, 2017). Na indústria alimentícia, são utilizados devido à sua importante ação antioxidante e antimicrobiana (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014; Köksal *et al.*, 2017).

Diversos compostos fenólicos foram identificados e agrupados conforme suas estruturas químicas em dezesseis classes. Estas podem variar de moléculas simples como os ácidos fenólicos, até polímeros, como os taninos, sendo que todas possuem pelo menos um anel aromático ligado a grupos hidroxila (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014; Arruda, 2015) (Figura 2). A grande variedade de moléculas se deve ao fato de que tanto os esqueletos carbônicos, quanto os substituintes são muito diversos (Arruda, 2015).

Dentre os compostos já identificados, os principais são os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014; Ouchemoukh *et al.*, 2017). Os ácidos fenólicos são divididos em ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos. O primeiro grupo possui compostos como o ácido gálico e o vanílico, enquanto o grupo dos ácidos hidroxicinâmicos é composto por ácido ferúlico e cafeico (Liu, 2007). Os ácidos fenólicos já foram descritos por suas atividades como imunomoduladores, antioxidantes, hepatoprotetores e anti-inflamatórios (Itoh *et al.*, 2010).

Os flavonoides são responsáveis pela proteção contra a radiação e estão descritos na literatura por sua atividade antioxidante, devido a sua ação como agente redutor (Zhang *et al.*, 2011; Fattahi & Rahimi 2016). Estes compostos apresentam efeito protetor contra diversas doenças, como o câncer, diabetes e Alzheimer, e também atuam como moduladores de moléculas pró-inflamatórias (Zhang *et al.*, 2011; Formagio *et al.*, 2015a). A atividade dos flavonoides no processo inflamatório se estende para o tratamento de doenças ligadas à inflamação e processos nos quais a inflamação faça parte, como é o caso do processo cicatricial e também do câncer. No entanto, a sua ação anticâncer depende da sua

biodisponibilidade, absorção e distribuição no organismo (Zhang *et al.*, 2011; George *et al.*, 2017). Estes compostos atuam também inibindo os mecanismos de invasão, angiogênese e metástase, e também podem causar paradas no ciclo celular (George *et al.*, 2017).

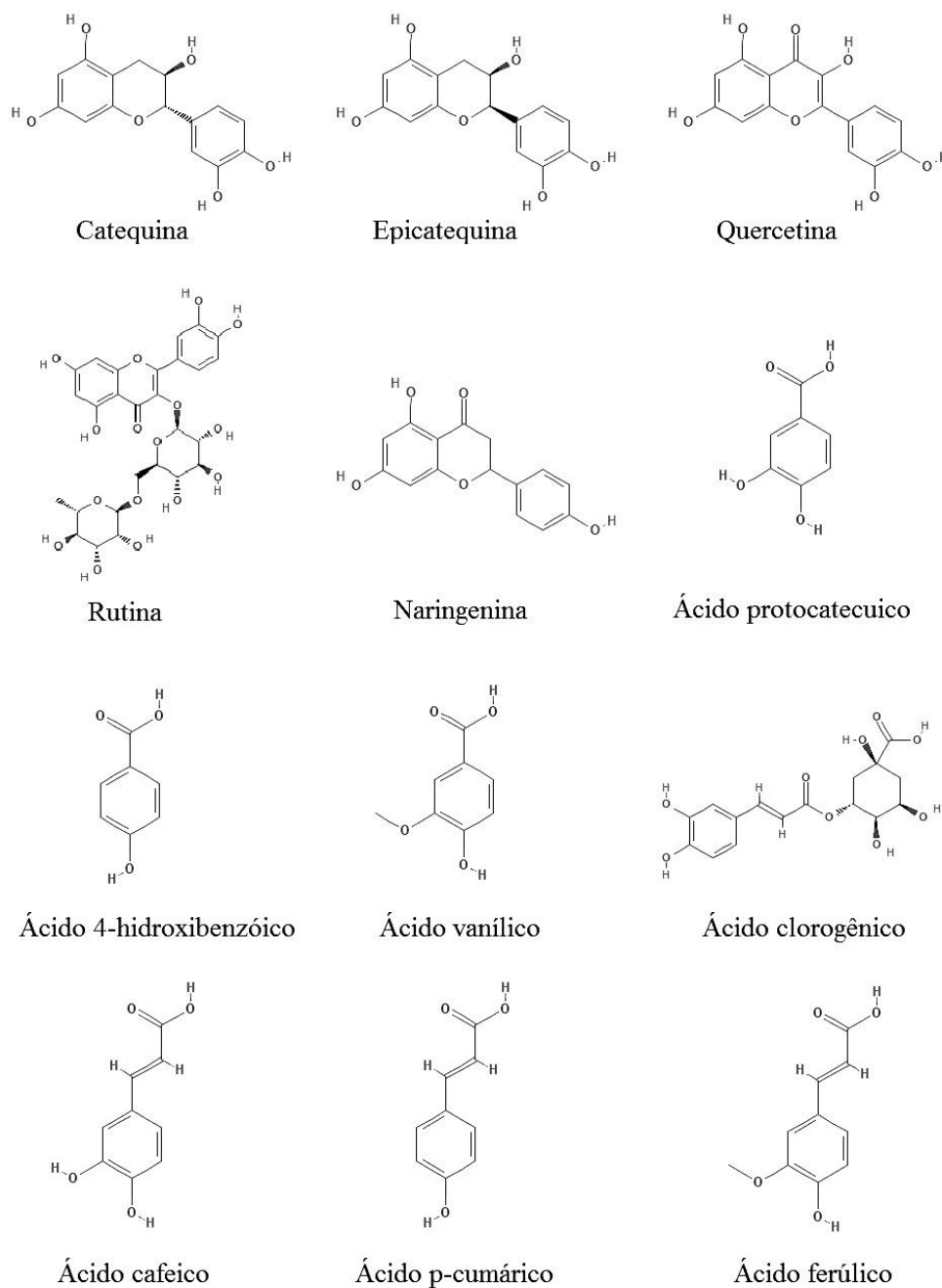


Figura 2: Estruturas químicas de compostos fenólicos comumente encontrados em plantas. Estruturas obtidas com auxílio do banco de dados do PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Além dos flavonoides, os taninos também já foram descritos por sua ação cicatrizante por meio da modulação de diferentes mecanismos celulares, fatores de crescimento e poder antioxidante (Kandhare *et al.*, 2015; Chandika *et al.*, 2015). Os taninos fazem parte do grupo mais complexo dos compostos fenólicos. Podem ser divididos em condensados ou hidrolisáveis (Suvanto *et al.*, 2017). Atuam protegendo as plantas de patógenos por meio da complexação de proteínas e já foram descritos por sua ação na inibição da peroxidação lipídica e por sua atividade antimutagênica (Arruda, 2015; Cai *et al.*, 2017). Também agem como inibidores de proliferação e migração de células tumorais e supressores de genes. Causam paradas no ciclo celular, estimulam a apoptose e atuam por meio de outros mecanismos no combate ao câncer (Cai *et al.*, 2017).

3.4. Capacidade Antioxidante

Para que as células possam exercer suas atividades e para que os processos metabólicos ocorram, é necessária uma grande produção de energia pelo organismo, a qual pode ser obtida através de mecanismos como a oxidação. Estes processos, no entanto, resultam na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Arruda, 2015; Tohma *et al.*, 2017). As espécies reativas são conhecidas por terem elétrons desemparelhados na camada de valência e consequentemente por serem instáveis (Arruda, 2015). Dentre as espécies de radicais estão o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$). Estes são produzidos de forma natural pelo organismo, mas quando estimulados por condições adversas, como estresse e poluição, ficam em excesso e podem danificar moléculas como proteínas e DNA, e causar desintegração das membranas celulares. Este estresse oxidativo está fortemente ligado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes, aterosclerose e alguns tipos de câncer (Magalhães *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Arruda, 2015; Mnari *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018).

Existe uma série de substâncias e mecanismos para controlar os níveis de espécies reativas presentes no organismo, dentre eles os antioxidantes. Definidos como substâncias capazes de controlar a oxidação de biomoléculas mesmo quando administrados em quantidades inferiores a 1000 mg/L, os antioxidantes podem agir por meios que vão desde o sequestro de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS) e quelação de íons

metálicos até a inibição de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (Arruda, 2015; Singh *et al.*, 2016; Tohma *et al.*, 2017). Transferrina, Glutathione Reduzida (GSH), ubiquinol e melatonina são alguns antioxidantes envolvidos em processos não enzimáticos. Em processos enzimáticos estão presentes, por exemplo, a Catalase (CAT), que catalisa a degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a Glutathione Peroxidase (GPx), que remove os hidroperóxidos (Arruda, 2015).

Os antioxidantes são utilizados para aumentar o tempo de prateleira de alimentos na indústria alimentícia por meio do controle da oxidação e da peroxidação lipídica, e seu uso na indústria farmacêutica e cosmética vem crescendo (Arruda *et al.* 2017b; Tohma *et al.*, 2017). As plantas são uma ótima fonte destes compostos, e sua capacidade antioxidante se deve a presença de compostos fenólicos, aminoácidos, esteróis, ácido ascórbico, peptídeos e fosfolipídios na sua composição (Roesler *et al.*, 2007a; Roesler 2011; Tohma *et al.*, 2017). Entretanto, no organismo, os diferentes compostos podem interagir de maneira sinérgica ou antagônica (Almeida *et al.*, 2016).

Os antioxidantes já foram descritos por sua atividade anti-inflamatória, vasodilatadora, antitumoral, antialérgica, antiviral, cardioprotetora dentre outros (Roesler *et al.*, 2007a; Ghitescu *et al.*, 2015; Fattahi & Rahimi 2016; Arruda *et al.*, 2017b). Eles atuam a nível celular protegendo o DNA, o RNA e as organelas de danos causados pelos radicais livres e prevenindo a peroxidação lipídica (Almeida *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018), e o consumo destes compostos pode auxiliar na redução da mortalidade causada por doenças crônicas (Almeida *et al.*, 2016).

3.5. Cicatrização

A pele é o maior órgão do corpo humano. Sua função é atuar como uma barreira física e evitar a perda de água. Quando a pele sofre um dano, tem início o processo de reparo para que a função de barreira seja restaurada (Monsuur *et al.*, 2016; Aragona *et al.*, 2017). O processo de cicatrização é extremamente complexo, envolve uma série de mecanismos moleculares e é dividido em fases (Walter *et al.*, 2010; Boateng & Catanzano, 2015; Yang *et al.*, 2017). Alguns autores, como Monsuur *et al.* (2016), a dividem em quatro fases: hemostase, inflamação, proliferação e remodelamento (Figura 3). Outros, como Boateng &

Catanzano (2015) fazem a divisão em hemostase, inflamação, proliferação, migração e remodelamento.

A primeira resposta do organismo após a lesão é a hemostase, com vasoconstrição, ativação plaquetária e recrutamento de células inflamatórias. A atração celular de cada fase é feita por fatores de crescimento e citocinas, como interleucina-1 (IL-1)- β , fator de crescimento (TGF- β), fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Boateng & Catanzano, 2015; Monsuur *et al.*, 2016; Aragona *et al.*, 2017; Takagi *et al.*, 2017).

Na fase seguinte, denominada inflamatória, ocorre uma vasodilatação mediada por serotonina e histamina, e os tipos celulares mais atraídos para o local da lesão são os macrófagos e os monócitos. Os eventos que ocorrem nesta fase desencadeiam dor e edema (Boateng & Catanzano, 2015; Monsuur *et al.*, 2016; Aragona *et al.*, 2017). Os próximos eventos a ocorrer são a ativação da cascata de coagulação e a formação do coágulo de fibrina (Monsuur *et al.*, 2016).

Na fase proliferativa, a atração celular é feita pelos mesmos fatores supracitados, mas com a atração predominante de queratinócitos, células endoteliais, fibroblastos e melanócitos (Monsuur *et al.*, 2016). Para que os diferentes tipos celulares consigam chegar até o local lesionado, é necessário que haja o aumento da permeabilidade vascular e a formação de novos vasos, denominada angiogênese (Chandika *et al.*, 2015; Kandhare *et al.*, 2015). Nesta fase ocorrem a proliferação e migração de queratinócitos, fibroblastos e outras células, que podem migrar de tecidos próximos à lesão e até de glândulas sudoríparas (Walter *et al.*, 2010; Chandika *et al.*, 2015). Na migração celular, o movimento da célula para o local de interesse ocorre por meio de uma série de forças mecânicas, como a polarização e reorganização do citoesqueleto de actina, mecanismos moleculares, processos bioquímicos e interações celulares (Jonkman *et al.*, 2014). Adicionalmente ocorre a formação do tecido de granulação composto por colágeno tipo III mediada por fibroblastos (Chandika *et al.*, 2015; Aragona *et al.*, 2017).

A fase final de remodelamento pode durar meses e está relacionada com a reestruturação da matriz extracelular, da derme e da epiderme (Aragona *et al.*, 2017). Alguns fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, por ação de citocinas derivadas de

macrófagos, para atuarem no processo de contração da ferida (Walter *et al.*, 2010; Monsuur *et al.*, 2016). Os miofibroblastos são responsáveis pela construção de uma matriz extracelular feita de fibronectina e ácido hialurônico (Walter *et al.*, 2010). Após algumas semanas os miofibroblastos dão lugar a novos fibroblastos, fazendo com que o colágeno tipo III seja substituído pelo tipo I na matriz extracelular (Walter *et al.*, 2010; Chandika *et al.*, 2015; Kandhare *et al.*, 2015). No final do processo, a maioria das células presentes no local da lesão sofre apoptose ou migra para tecidos próximos (Kandhare *et al.*, 2015).

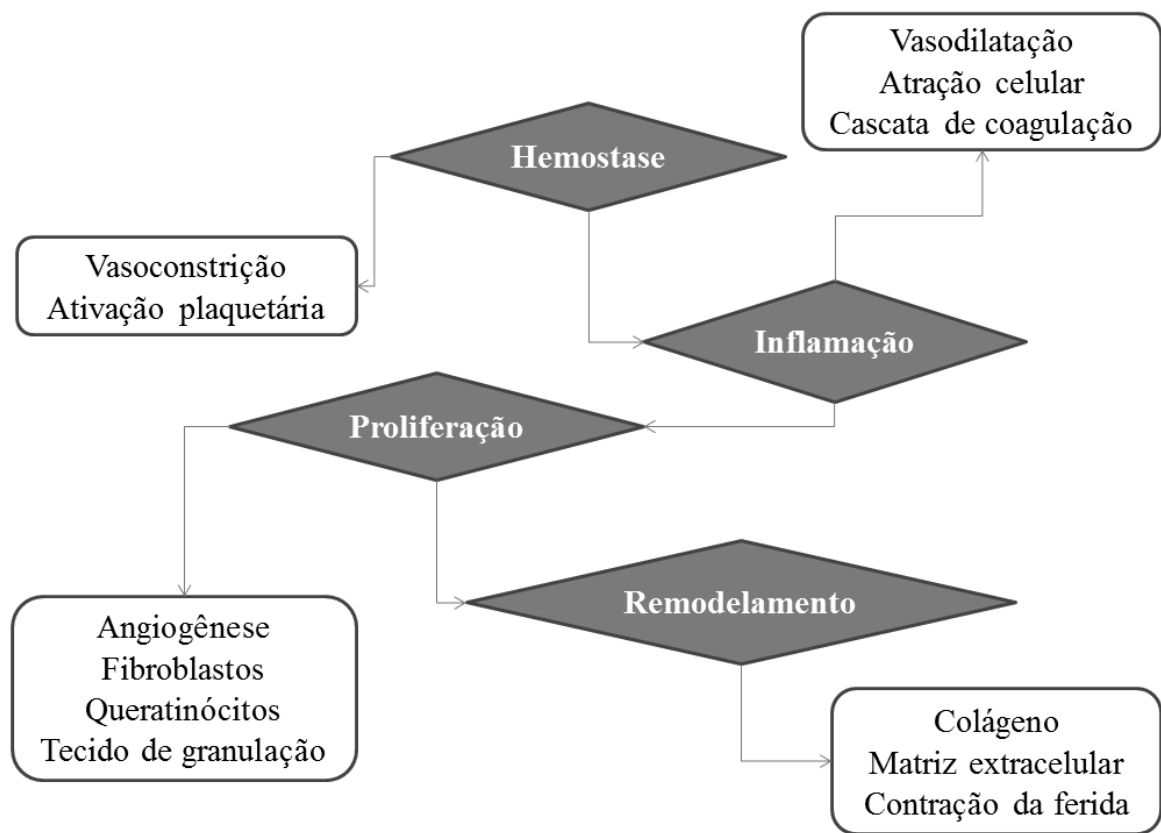


Figura 3: Fluxograma das principais características de cada fase da cicatrização.

As feridas são classificadas em agudas ou crônicas, sendo agudas quando a lesão cicatriza em até doze semanas, e crônicas quando este processo leva mais tempo. Dependendo da sua gravidade podem afetar ossos e nervos (Boateng & Catanzano, 2015). Uma falha na cicatrização pode causar desde problemas circulatórios até a necrose tecidual, e a ineficiência do processo está relacionada a bactérias presentes no local da lesão, imunodepressão e diabetes (Boateng & Catanzano, 2015).

Aproximadamente 350 milhões de pessoas no mundo têm diabetes tipo 2 e grande parte desta parcela já sofreu com problemas relacionados à cicatrização. Os mecanismos responsáveis pela correlação diabetes e cicatrização ainda são pouco esclarecidos. O que se sabe é que ocorre o prolongamento da fase inflamatória, o qual pode ser causado por modificações epigenéticas, pelo aumento do estresse oxidativo no local da lesão, o que acarreta em uma redução do número de células maduras e aumento da produção de células indiferenciadas, e pela regulação de genes relacionados com a diferenciação dos monócitos em macrófagos (Yan *et al.*, 2018).

Na cronificação de feridas, como ocorre na diabetes, há uma migração constante de neutrófilos para o local da lesão e a permanência destas células na ferida, devido ao excesso de produção de citocinas. Ocorre também um aumento do número de proteases que degradam a matriz extracelular e os fatores de crescimento (Boateng & Catanzano, 2015; Takagi *et al.*, 2017).

A cronificação de feridas pode levar a graves consequências e é necessária a busca por novos tratamentos que evitem este desfecho. Neste contexto, fármacos constituídos por compostos bioativos derivados de produtos naturais podem agir como adjuvantes no processo cicatricial devido sua atuação como antimicrobianos, antioxidantes, promotores de desbridamento e estimulantes da migração celular (Boateng & Catanzano, 2015; Chandika *et al.*, 2015). Dentre os compostos bioativos já descritos como cicatrizantes estão os compostos fenólicos. Estes compostos auxiliam no processo de reparo tecidual por meio do estímulo da produção de colágeno, pela inibição de radicais livres, indução de angiogênese e modulação de fatores relacionados com a fase inflamatória (Moghadam *et al.*, 2017). Algumas plantas também já tiveram suas propriedades cicatrizantes relatadas na literatura, como por exemplo, o extrato metanólico da *Arrabidaea chica* Verlot., que é capaz de estimular o crescimento de fibroblastos humanos primários e induzir o aumento da produção de colágeno (Jorge *et al.*, 2008). Farahpour *et al.*, (2016) descreveram a ação do extrato hidroetanólico da *Moltkia coerulea* no aumento da proliferação de fibroblastos e na modulação da angiogênese de ratos machos da linhagem Wistar e Koga *et al.*, (2018) demonstraram que a *Aloe barbadensis* Miller incorporada a um filme de alginato possui capacidade de estimular a síntese de colágeno, modular as células inflamatórias e induzir a formação de novos vasos. É importante ressaltar que esse estudo tem caráter inédito, pois não há relatos na literatura sobre a ação cicatrizante do araticum, apesar de seu uso no tratamento de feridas na medicina popular.

3.6. Câncer

Câncer é a denominação dada a um grupo de doenças multifatoriais complexas nas quais células normais passam a expressar fenótipos neoplásicos e a proliferar desordenadamente. Seu desenvolvimento é dividido em iniciação, promoção e progressão (George *et al.*, 2017). Na fase de iniciação as células sofrem alterações devido à interação com agentes cancerígenos. As células geneticamente alteradas ainda não são malignas neste estágio. Na promoção as células iniciadas são transformadas em malignas por meio de processo gradual. Na última fase ocorre a proliferação das células malignas e o câncer começa a apresentar seus primeiros sinais (INCA, 2018). O processo de evolução do câncer é composto por uma sequência de danos e alterações no DNA e mutações genéticas que conferem vantagens às células tumorais, como a proliferação celular exacerbada (Iwamoto *et al.*, 2015; Longato *et al.*, 2015; INCA, 2017). Este crescimento descontrolado pode ser causado por uma série de fatores intrínsecos, dentre eles suscetibilidade genética, obesidade, idade, deficiência de cálcio e taxa hormonal, e fatores extrínsecos, como o tabagismo, contato com produtos químicos, ingestão de álcool e exposição à radiação (INCA, 2018; NCI, 2018).

Células expostas a uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) tendem a se transformar em células tumorais (Ge *et al.*, 2017). Estes radicais geram alterações celulares que acarretam em resistência a apoptose, imortalização celular, proliferação exacerbada e aumento da angiogênese e da duplicação celular, e consequentemente favorecem a capacidade de invasão e metástase das células tumorais (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012; Iwamoto *et al.*, 2015; Longato *et al.*, 2015).

Estima-se que até o final de 2019 ocorram mais de 1 milhão de novos casos de câncer no Brasil. Os tipos de câncer mais incidentes no país atualmente são os de próstata, pulmão, mama e cólon. A estimativa aponta que, com exceção do câncer de pele não melanoma, os cânceres de próstata, pulmão, intestino e estômago serão os mais incidentes em homens, ao passo que os cânceres de mama, intestino, colo do útero e pulmão serão os mais incidentes em mulheres. Quanto à distribuição geográfica do câncer, mais de 70% dos novos casos ocorrerão nas regiões Sul e Sudeste (INCA, 2018).

Embora a ciência continue avançando na prevenção e no tratamento do câncer, milhões de novos casos aparecem todos os anos, acompanhados de milhares de mortes. O controle do câncer apresenta uma série de desafios, uma vez que cada tipo de câncer é diferente e que existem variados mecanismos de resistência. Além disso, os métodos

utilizados como tratamento atualmente apresentam efeitos colaterais e muitas vezes são ineficientes (Longato *et al.*, 2015; Vendramini-Costa *et al.*, 2017). Por estes motivos, é crescente o número de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos medicamentos que atuem na prevenção e no tratamento do câncer, e a natureza tem sido uma ótima fonte de compostos com este potencial, uma vez que grande parte dos medicamentos é derivada de produtos naturais. Estes produtos podem ser incluídos na composição dos fármacos ou utilizados como modelos para síntese de novas drogas (Newman & Cragg, 2016).

O araticum pode ser fonte de compostos bioativos de interesse tanto no tratamento do câncer como de outras patologias. Sua composição, rica em compostos fenólicos, e algumas de suas atividades biológicas já foram descritas na literatura. Porém, existem poucos estudos na literatura sobre a atividade anticâncer de araticum.

Portanto, o presente trabalho é o primeiro a investigar a atividade antiproliferativa do extrato da casca e a investigar a ação dos extratos da casca e das sementes no ciclo celular de células tumorais. Além de ser o primeiro a investigar a ação do araticum como um possível cicatrizante e a caracterizar os extratos brutos das sementes e da casca. A atividade antioxidante, apesar de já ter sido descrita por alguns autores, foi pela primeira vez avaliada em um extrato bruto obtido por meio da extração com metanol-acetona-água (7:7:6, v/v/v). Os resultados descritos neste trabalho são importantes para reforçar o conhecimento sobre a composição do araticum e para dar embasamento em estudos futuros. Este trabalho, no qual a casca e as sementes do araticum foram escolhidas como alvo da pesquisa, é também relevante para chamar atenção para o uso de partes que geralmente são descartadas, incentivando assim o reaproveitamento de resíduos, e também para disseminar conhecimento sobre o Cerrado, atraindo o olhar para a preservação deste *hotspot* da biodiversidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos (LBCB) em parceria com a Divisão de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) e com o Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas (IQM). Todos os locais citados acima estão ligados à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.1. Matéria-prima, coleta e preparo das amostras

Os frutos de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) maduros foram coletados na Fazenda Lagoa dos Estulanos no município de Carmo do Paranaíba, Estado de Minas Gerais, Brasil, durante a época de colheita, entre fevereiro e março. As amostras foram transportadas em caixas de poliestireno para o Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP), São Paulo, Brasil. Os frutos maduros foram lavados com água corrente e em seguida suas partes foram separadas. Casca e sementes foram trituradas, separadamente, em moinho de facas (Marconi, modelo MA340, Brasil) e liofilizadas (Liofilizador L101 Liotop). A pressão e temperatura da câmara de liofilização foram de 50 mm de mercúrio e -45°C, respectivamente. As amostras liofilizadas foram embaladas à vácuo e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento da extração.

4.2. Depósito de amostra no herbário e SisGen

As amostras de *Annona crassiflora* Mart. foram depositadas no herbário UEC do Instituto de Biologia da UNICAMP sob o número UEC 197249, visando à correta identificação da espécie e à solicitação de autorização de pesquisa pelo CGEN/CNPq. Seguindo a Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, a atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada sob o número A6587E1 (ANEXO).

4.3. Extração

Os extratos da casca e das sementes foram obtidos conforme Ayoub *et al.*, (2016), com modificações. O material vegetal já triturado e liofilizado foi homogeneizado na proporção de um grama de amostra para 15 mL de solvente (metanol: acetona: água deionizada: 7:7:6). Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex (AP56 Phoenix Luferco), permaneceram por 30 minutos no banho de ultrassom (Unique, modelo UCS-2850) e foram centrifugadas por 5 minutos (5°C; 4000 RPM) (Hettich Zentrifugen, modelo Rotanta 460R, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante de cada uma das três etapas foi retirado e congelado. Mais solvente foi adicionado ao pellet de cada etapa e realizou-se o procedimento novamente. Após três ciclos de extração da mesma matriz, os sobrenadantes de cada etapa foram misturados uns com os outros e colocados em rotaevaporador (RII Buchi switzerland). Em seguida, visando concentrar ao máximo os compostos de interesse, os extratos foram liofilizados (50 mm de mercúrio; -45°C) em um processo com duração de três dias, tempo o suficiente para que toda a água fosse retirada.

4.4. Perfil de compostos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS

A caracterização e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos foram feitas em UHPLC (Ultra-high Performance Liquid Chromatography) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (LCMS 8040, Shimadzu) e a fonte de ionização eletrospray, de acordo com Bataglione *et al.*, (2015), com algumas modificações (Arruda *et al.*, 2018). Diferentes padrões analíticos (pureza $\geq 96\%$; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram preparados em metanol na concentração de 1 mg/mL e estocados a -80°C. As amostras e os padrões foram diluídos em água acidificada (0,1% de ácido fórmico, v/v) e filtrados em filtros de seringa de celulose regenerada 0,20 μm (Minisart® RC25). Foram injetados 10 μL da amostra. A separação cromatográfica foi realizada empregando uma coluna analítica Shim-pack XR-ODS III (150 x 2,0 mm i.d., partículas tamanho 2,2 μm , Shimadzu) a temperatura de 40°C. A temperatura do injetor foi mantida a 10°C. A fase móvel foi composta de ácido fórmico 0,1% com água (eluente A) e metanol (eluente B) (0,40 mL/min). As condições da eluição foram 0-1 min, 5% B; 1-4 min, 5-60% B; 4-7 min, 60-70% B; 7-10 min, 70-100% B; 10-10.50 min, 100% B; 10.50-11 min, 100-5% B; 11-15 min, 5% B. A fonte de ionização por electrospray funcionou no modo iônico negativo com tensão capilar de 3,5kV, temperatura do bloco de 300°C, fluxo de gás de secagem (N_2) de 20 L/min, temperatura da linha de

dessolvatação de 250°C, gás de nebulização (N₂) de 3 L/min, pressão de gás de dissociação induzida por colisão (Ar) a 224 kPa. Uma molécula desprotonada foi utilizada como íon precursor para as leituras MS/MS de cada padrão. Para a quantificação e confirmação por monitoramento da reação múltipla foram escolhidos os dois íons mais abundantes formados. As curvas de calibração foram feitas nas concentrações de 20-1000 ng/mL. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível 5% de significância ($p \leq 0,05$).

4.5. Determinação de compostos bioativos

4.5.1. Compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada seguindo o método de *Folin-Ciocalteu* proposto por Swain & Hillis (1959), com algumas modificações. As amostras e o padrão da curva de calibração foram dissolvidos em etanol. As amostras foram agitadas em vórtex (Ap56 Phoenix Luferco), mantidas por duas horas no banho ultrassom (Ultrasonic cleaner Thornton Unique) e filtradas com um filtro RC 0,20µm. Em seguida foram feitas doze diluições seriadas de cada amostra em triplicata (10 - 0,004883 mg/mL). Para reação colorimétrica, uma alíquota de 500 µL da solução etanólica dos extratos foi adicionada de 2,5 mL de solução aquosa do reativo de *Folin-Ciocalteu* a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. Uma modificação na metodologia foi realizada ao incubar a mistura durante 5 minutos em banho-maria (Buchi switzerland) a 50°C para desenvolvimento de cor e depois colocar por 5 minutos em banho de gelo para interromper a reação. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV/Visível (Beckman, modelo DU640, CA, EUA) a 760 nm, utilizando-se o branco (reação sem amostra e com adição de etanol) como referência. A quantificação de fenóis totais da amostra foi realizada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico (10 – 80 µg/mL) ($y=0,01227x + 0,0279$; $R^2=0,9987$) e expressa como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato liofilizado.

4.5.2. Determinação do conteúdo de flavonoides

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen *et al.*, (1999). As amostras foram preparadas em água destilada, homogeneizadas em vórtex por 30 segundos, deixadas no banho ultrassom a 10°C durante 30 minutos. Foram feitas doze diluições seriadas de cada amostra em triplicata (10 - 0,004883 mg/mL). Em seguida as reações foram feitas com as amostras, NaNO₂, AlCl₃ e NaOH, seguidas de leitura de absorbância a 510 nm em espectrofotômetro. A quantificação de flavonoides totais da amostra foi realizada por meio de curva padrão preparada com catequina (25 – 150 µg/mL) ($y=0,002652x + 0,0007267$; $R^2=0,9966$) e expressa como equivalentes de catequina por grama de extrato liofilizado.

4.5.3. Determinação de taninos condensados

A determinação de taninos condensados foi realizada com base na metodologia descrita por Broadhurst & Jones (1978). As amostras foram diluídas em metanol. Foram feitas oito diluições seriadas (10 - 0,07813 mg/mL), e uma alíquota de 30 µL de cada diluição foi misturada com 900 µL de vanilina 4% preparada com metanol, e em seguida foram adicionados 450µL de HCl concentrado (37% : v/v). A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos. Após o período de incubação, a leitura da absorbância foi realizada a 500 nm em espectrofotômetro UV/Visível (Beckman, modelo DU600, CA, EUA). A curva de calibração foi preparada com padrão de catequina (50 – 800 µg/mL) ($y=0,001059x + 0,006429$; $R^2=0,9997$). O resultado foi expresso em equivalente de catequina por grama de extrato liofilizado.

4.6. Ensaio de capacidade antioxidante

4.6.1. Atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

O ensaio foi realizado conforme o método proposto por Roesler *et al.*, (2007a), com algumas modificações. Uma solução de DPPH (0,004% m/v) foi preparada, com intervalo de absorbância entre 0,8 e 1,2 a 517 nm. As amostras foram preparadas em etanol, homogeneizadas em vórtex por 30 segundos, deixadas no banho ultrassom a 10°C durante 30 minutos e filtradas. Foram feitas oito diluições seriadas de cada amostra em triplicata (10 -

0,07813 mg/mL). As curvas das amostras foram incubadas durante 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi adotado para a curva padrão de Trolox®. O branco da reação foi preparado conforme o procedimento descrito anteriormente, sem adição da amostra e com adição de etanol. O percentual do decréscimo na absorbância foi medido e a capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada com base neste percentual. A leitura da absorbância foi feita a 517nm. A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical, calculado conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extrato}}) / A_{\text{DPPH}}) * 100$$

Onde A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extrato} é a absorbância da amostra ou padrão em solução. A_{Extrato} foi calculada com base na diferença da absorbância da solução de amostra em teste com o seu branco (reação sem adição de amostra e com adição de etanol). Uma curva padrão de Trolox® (25 – 200 μM) foi construída e o resultado foi expresso em μmol de equivalentes de Trolox® por grama de extrato liofilizado. Para validar o teste, uma curva de calibração ($y=0,4582x + 0,4543$; $R^2=0,9965$) foi preparada com Trolox®.

4.6.2. Determinação da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox®

A atividade antioxidante total foi determinada pelo ensaio com ABTS $_{\cdot+}$, de acordo com o método proposto por Re *et al.*, (1999). O radical foi obtido pela reação de 5 mL de ABTS (7Mm) com 88 μL de persulfato de potássio 140 mM (concentração final de 2,45 mM), conforme método descrito por Re *et al.*, (1999). O sistema foi mantido em repouso em ausência de luz e a temperatura ambiente por 16 horas. Uma vez formado o ABTS $_{\cdot+}$, o mesmo foi diluído em água destilada até obter valor de absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. As amostras foram preparadas em água destilada e homogeneizadas em agitador de tubos, seguido de ultrassonicação em banho a 10°C durante 30 minutos. Foram realizadas doze diluições seriadas das amostras em triplicata ($10 - 0,004883 \text{ mg/mL}$). A leitura da absorbância foi feita com a mistura de reação (300 μL) contendo 50 μL de amostra e 250 μL de solução ABTS $_{\cdot+}$, contra o branco 734 nm. O branco da reação foi preparado conforme o procedimento descrito acima, sem adição da amostra e com adição de água destilada. A capacidade de capturar o ABTS $_{\cdot+}$ foi calculada com base no decréscimo da absorbância observada. Uma curva de Trolox® (5 – 150 μM) ($y=0,6405x + 0,9315$; $R^2=0,9997$) foi feita da mesma forma.

O resultado da atividade dos compostos testados foi expresso em valores TEAC, definido em μmol de equivalentes de Trolox® por g de extrato liofilizado.

4.6.3. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

Os ensaios foram realizados conforme os métodos descritos por Prior *et al.*, (2003), com algumas adaptações. As reações ocorreram em microplacas de poliestireno, específicas para reações de fluorescência, contendo 96 compartimentos. Para cada leitura foi preparada uma curva padrão de Trolox® (50 – 600 μM) específica para a avaliação da fração hidrofílica ou lipofílica, seguida de diluições apropriadas. Todas as leituras foram feitas através de um leitor de microplacas NOVostar (BMG Labtech®, Offenburg, Germany), acompanhado com o Software de análise de dados MARS Data Analysis versão 1.3 (BMG Labtech®, Offenburg, Germany). As curvas de calibração de ambas as frações foram preparadas com Trolox®. As equações das curvas de calibração foram $y=0,06454x + 2,862$ e $y=0,03251x + 1,833$ para as frações hidrofílica e lipofílica, abaixo detalhadas, respectivamente. O coeficiente de correlação foi $R^2= 0,9973$ para o ORAC hidrofílico e $R^2=0,9563$ para o lipofílico. A intensidade de fluorescência (485nmEx/ 520nmEm) foi verificada a cada ciclo de 60 segundos, durante 80 ciclos.

4.6.3.1. Fração hidrofílica

Para análise da fração hidrofílica as amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL (p/v) com tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4, homogeneizadas em agitador vórtex, e submetidas a ultrasonicação em banho a 10°C durante 30 minutos. Foram feitas dez diluições seriadas das amostras em triplicata (10 - 0,01953 mg/mL). O padrão Trolox® 1500 μM foi diluído em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4. A solução de fluoresceína foi preparada em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4, na concentração de 0,003780 mg/mL e mantida ao abrigo da luz até o momento de uso. O AAPH [2,2'- azobis (2'-metilpropionamidina)-dihidrocloreto] foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4, momentos antes do início da leitura da microplaca. O sistema de reação em cada poço da microplaca continha: 20 μL de amostra, 120 μL de solução de fluoresceína e 60 μL de AAPH a uma temperatura constante de 37°C, durante 80 minutos. O branco da reação foi preparado conforme o procedimento acima, sem adição de amostra e com adição de tampão

fosfato de potássio. A intensidade de fluorescência (485 nmEx/ 520 nmEm) foi verificada a cada ciclo de 60 segundos, durante 80 ciclos em leitor de microplacas. A curva de calibração foi construída utilizando o padrão Trolox® (50 – 600 µmol/L).

4.6.3.2. Fração lipofílica

No ensaio voltado para a fração lipofílica, as amostras foram preparadas com solução de ciclodextrina metilada randomizada a 7% (RMCD) em solução acetona:água (1:1), homogeneizadas em agitador vórtex por 30 segundos e submetidas a ultrasonicação em banho a 10°C durante 30 minutos. Foram feitas dez diluições seriadas das amostras em triplicata (10 - 0,01953 mg/mL). O padrão Trolox® 1500 µM foi diluído em solução de RMCD 7% e diferentes concentrações foram utilizadas na construção da curva de calibração (50 – 600 µmol/L). As soluções de fluoresceína e AAPH foram preparadas do mesmo modo que no ensaio hidrofílico. O sistema de reação em cada poço da microplaca foi composto de: de 20µL de amostra, 120 µL de solução de fluoresceína e 120 µL de AAPH a uma temperatura constante de 37°C, durante 80 minutos. O branco da reação foi preparado conforme o procedimento acima, sem adição de amostra e com adição de solução de ciclodextrina metilada randomizada a 7% (RMCD). A intensidade de fluorescência (485 nmEx/520 nmEm) foi verificada a cada ciclo de 60 segundos, durante 80 ciclos em leitor de microplacas.

4.6.3.3. Análise de dados

O cálculo da curva de decaimento da fluorescência ou AUC foi realizado do mesmo modo tanto para a fração hidrofílica quanto lipofílica com o auxílio da seguinte fórmula: $AUC = 1 + \sum_{n=1}^{80} f_1/f_0$

onde, o f_0 é representado pela fluorescência obtida no tempo 0 e f_i a fluorescência obtida nos tempos intermediários entre 0 e 80 minutos. Os resultados foram expressos em µmol equivalentes de Trolox®. A área da perda de fluorescência de cada uma das amostras foi calculada subtraindo a área correspondente a do branco de cada fração. As leituras foram realizadas em triplicata e os valores expressos em µmol equivalentes de Trolox®/g de extrato liofilizado.

4.7. Ensaios de atividade biológica *in vitro*

4.7.1. Atividade antiproliferativa

4.7.1.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas oito linhagens de células tumorais humanas e duas linhagens não tumorais. As linhagens foram cedidas pelo NCI e mantidas em frascos de 25cm³ (Corning®, EUA) com 5 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Gibco®, EUA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB - Gibco™, EUA) e 1% (v/v) de solução de penicilina:estreptomicina (Nutricell®, Campinas - SP, 1000 U mL⁻¹:1000 g mL⁻¹), e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A linhagem não tumoral de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) foi doada pelo Dr. Ricardo Della Coletta (FOP, UNICAMP). Todos os ensaios foram realizados em ambiente estéril (fluxo laminar). As linhagens e suas respectivas densidades de inoculação estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas no ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas respectivas densidades de inoculação (DI).

Linhagem Celular	Nome	DI*(x10 ⁴ células/mL)	Característica
Glioma	U251	4,0	Tumoral humana
Mama	MCF-7	6,0	Tumoral humana
Ovário com fenótipo de resistência	NCI-ADR/RES	5,0	Tumoral humana
Pulmão	NCI-H460	4,0	Tumoral humana
Próstata	PC-3	5,0	Tumoral humana
Ovário	OVCAR-3	7,0	Tumoral humana
Cólon	HT-29	4,0	Tumoral humana
Leucemia	K562	6,0	Tumoral humana
Queratinócito	HaCaT	4,0	Não tumoral humana
Fibroblasto	3T3	3,0	Não tumoral murina

4.7.1.2. Ensaio de atividade antiproliferativa

Para a realização do experimento, o meio de cada frasco contendo uma linhagem celular foi aspirado, o frasco foi lavado com 500 μ L de tampão fosfato (0,2 mM, pH 7,0) em solução de NaCl 0,9% (PBS) e aspirado novamente. Após a retirada do PBS, 500 μ L de tripsina – EDTA 2,5 g/L (Vitrocell®) foram adicionados e os frascos foram deixados a 37°C até o total desprendimento celular. 1 mL de meio RPMI + SFB 5% foi adicionado para bloquear a ação da tripsina. No primeiro dia de ensaio, as suspensões celulares (100 μ L), cada uma com sua densidade de inoculação, foram inoculadas em cada compartimento da placa de 96 (Corning®, EUA), e a placa foi incubada por 24 horas (placa teste). Uma placa contendo todas as linhagens celulares foi utilizada como controle (placa T₀). No segundo dia as amostras foram preparadas, diluindo-se uma alíquota de cada amostra (5 mg) em 50 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®, Alemanha). Em seguida, 50 μ L desta solução foram dispersos em 950 μ L de meio completo, sendo posteriormente diluídos em meio para a preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 μ g/mL (Figura 4).

As amostras diluídas foram aplicadas (100 μ L/compartimento, em triplicata) sobre as linhagens colocadas nas placas teste, as quais foram incubadas por 48 horas. O quimioterápico doxorrubicina (Cloridrato de doxorrubicina® - Europharma, Brasil) foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 μ g/mL (100 μ L/compartimento) em triplicata. A placa controle T₀ foi fixada com 50 μ L/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) no momento da adição das amostras na placa teste. Ao final de 48 horas de exposição, no quarto dia de experimento, as células foram fixadas com 50 μ L/compartimento de ácido tricloroacético (TCA, Sigma-Aldrich®, EUA) a 50% (p/v) e incubadas por 1 hora a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água corrente para remoção de resíduos. No quinto dia, depois de secas, as células fixadas foram coradas com 50 μ L/compartimento de SRB 0,4% (p/v) em ácido acético 1%; e mantidas por 15 min à temperatura ambiente. Após este procedimento, as placas foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Por fim, no último dia o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 μ L/compartimento de Trizma Base (10 μ M, pH 10,5, Sigma-Aldrich®, EUA) para realização da leitura (Monks *et al.*, 1991; Barcelos *et al.*, 2012; Vendramini-Costa *et al.*, 2016).

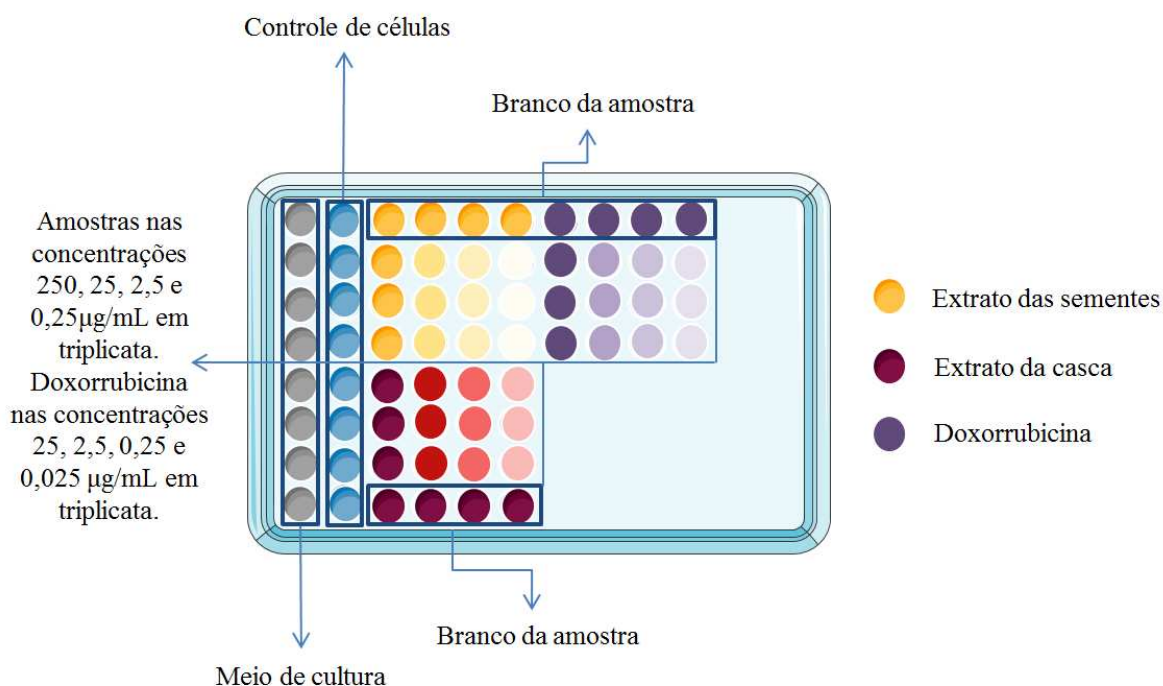


Figura 4: Esquema de configuração das amostras e do controle positivo doxorrubicina na placa de 96 poços no teste de atividade antiproliferativa. Amostras e controle positivo foram testados em triplicata. O branco da amostra é composto por meio e amostra ou meio e doxorrubicina, sem células. Os demais poços não foram preenchidos.

4.7.1.3. Análise dos dados

A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada logo em seguida a 540 nm em leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo VersaMax). As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e, através das fórmulas a seguir, foi determinada a porcentagem de crescimento de cada amostra testada.

Se $T_A > T_1$, a amostra estimulou o crescimento.

Se $T_1 \geq T_A > T_0$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T_A - T_0) / (T_1 - T_0)]$.

Se $T_A < T_0$, a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T_A - T_0) / (T_0)]$.

Sendo T_A a média da absorbância da célula tratada com a amostra, T_1 o controle de célula e T_0 o controle das células no dia da adição das amostras, obteve-se então a porcentagem de crescimento. Gráficos foram elaborados relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra com uso do software Origin® 8.0. O seguinte parâmetro de

regressão não linear foi calculado: TGI (total growth inhibition) concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular.

4.7.2. Ensaio de migração celular com queratinócitos humanos HaCaT

Para realizar o ensaio, foi inoculado 1 mL de células HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados HaCaT) em uma densidade de 3×10^5 células/mL em cada poço de placas de 12 poços (Corning®, EUA) (meio de cultura RPMI/SFB 5%). As placas foram mantidas por 24 horas em estufa a 37°C, contendo 5% CO₂. Após incubação o meio foi vertido em um recipiente e o excesso foi retirado vertendo as placas em papel absorvente autoclavado. Em seguida, uma ranhura foi feita na porção central e estendida por todo o diâmetro do poço, com auxílio de uma ponta de micropipeta estéril. Este procedimento permitiu romper e remover o material celular e extracelular. Após a ranhura ter sido feita, 1 mL de meio RPMI sem enriquecimento foi colocado em cada poço, para lavar as células soltas, e o processo foi repetido duas vezes. As placas foram vertidas em papel novamente, e foram adicionadas as amostras e os controles. Como controle positivo foi utilizado meio RPMI enriquecido com SFB 5% e como controle negativo meio RPMI sem enriquecimento com SFB 5%. As amostras foram preparadas com meio sem enriquecimento e as concentrações utilizadas do extrato da casca foram 36 e 18 µg/mL, e as do extrato das sementes 3,6 e 1,8 µg/mL. Estas concentrações foram escolhidas com base nos resultados de TGI encontrados no ensaio antiproliferativo para cada um dos extratos na linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) e em testes preliminares. As concentrações das amostras correspondem à metade e a um quarto do TGI obtido para esta linhagem, após 48 horas de tratamento. Após a aplicação, as placas foram novamente incubadas (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂). A capacidade de migração celular foi avaliada observando a área da ranhura nos tempos: 0, 9, 18 e 24 horas após a aplicação das amostras, utilizando microscópio de fase invertida (Leica Mikroskopie, Portugal), equipado com câmera fotográfica (Optikam B3, Itália). O tempo 24 horas foi o tempo necessário para que as ranhuras feitas nos poços com meio enriquecido com SFB 5% (controle positivo) fechassem completamente e o ensaio foi encerrado neste momento para comparação com os demais tratamentos. O tamanho da ranhura foi mensurado por meio da análise das imagens feitas em cada tempo com auxílio do programa ImageJ. A porcentagem de redução foi calculada empregando a fórmula: % redução

ranhura = $(100 - ((\text{área } T_{24} \times 100) / \text{área } T_0))$, onde: T_{24} = área da ranhura após 24 horas de aplicação da amostra. T_0 = área no momento da aplicação da amostra (Liang *et al.*, 2007).

4.7.2.1. Ensaio de viabilidade celular com queratinócitos humanos HaCaT

Após finalizar o ensaio de migração celular com a linhagem celular HaCaT, a solução foi vertida em um recipiente e foram adicionados 150 µL de corante proteico sulforrodamina B (SRB) a 0,4% (m/v) dissolvido em ácido acético a 1% (v/v) em cada um dos poços e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% (v/v) e após a secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 450 µL/compartimento de Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (Sigma®). Foram colhidos 150 µL de cada poço da placa de 12 poços e transferidos para uma placa de 96 poços. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Monks *et al.*, 1991)

4.7.3. Ensaio de migração celular com fibroblastos murinos 3T3

Fibroblastos murinos 3T3 são células caracterizadas por sua morfologia alongada e por terem inúmeros prolongamentos. Devido a sua morfologia e por serem extremamente sensíveis, foram necessários vários testes para chegar a uma densidade de inoculação celular ideal para a realização do ensaio. A densidade escolhida foi a de $2,5 \times 10^5$. Células 3T3 foram inoculadas em cada poço da placa de 12 poços (1mL por poço) (Corning®, EUA) (meio de cultura RPMI/SFB 5%). Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C, contendo 5% CO₂, o meio foi vertido em um recipiente e o excesso foi retirado vertendo as placas em papel absorvente autoclavado. Após esse processo, a ranhura foi realizada na porção central e estendida por todo o poço. Em seguida os poços foram lavados com 1 mL de PBS e depois novamente vertidos em papel para retirar o excesso. Os controles e as amostras foram então adicionados em cada um dos poços, 1 mL de cada tratamento foi cuidadosamente colocado em cada poço, soltando sempre pelas bordas do poço para que as células não desprendessem. Como controle positivo foi utilizado meio RPMI enriquecido com SFB 5% e como controle negativo meio RPMI sem enriquecimento com SFB 5%. As concentrações utilizadas do extrato da casca foram 6,2 e 3,1 µg/mL, e as do extrato das sementes 1,5 e 0,75 µg/mL. Estas

concentrações foram escolhidas com base nos resultados de TGI encontrados no ensaio antiproliferativo para cada um dos extratos na linhagem de fibroblastos murinos (3T3) e em testes preliminares. As concentrações utilizadas para ambos os extratos foram vinte e quarenta vezes menores que o TGI, respectivamente. Uma série de ensaios preliminares foi realizada e tanto em concentrações maiores quanto menores dos extratos as células morriam nas primeiras horas de experimento. Após a aplicação, as placas foram novamente incubadas (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂). A capacidade de migração celular foi avaliada observando a área da ranhura nos tempos: 0, 9, 18 e 24 horas após a aplicação das amostras, utilizando microscópio de fase invertida (Leica Mikroskopie, Portugal), equipado com câmera fotográfica (Optikam B3, Itália). O ensaio foi encerrado no momento em que a ranhura do poço tratado com o controle positivo fechou completamente. O tamanho da ranhura foi mensurado por meio da análise das imagens feitas em cada tempo com auxílio do programa ImageJ. A porcentagem de redução foi calculada empregando a fórmula: % redução ranhura = $(100 - ((\text{área } T_{24} * 100) / \text{área } T_0))$, onde: T_{24} = área da ranhura após 24 horas de aplicação da amostra. T_0 = área no momento da aplicação da amostra (Liang *et al.*, 2007).

4.7.4. Citometria de fluxo

Uma análise do mecanismo de ação das amostras foi realizada em citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini Flow Cytometry System, (Millipore®, Billerica, MA, USA). Para otimização dos ensaios, a densidade celular foi padronizada e as concentrações dos compostos escolhidas foram baseadas no TGI dos ensaios antiproliferativos realizados. A linhagem de glioma (U251) foi escolhida para este ensaio por ser a linhagem com sensibilidade mais próxima para ambos os extratos.

4.7.4.1. Análise do ciclo celular

A linhagem celular de glioma (U251) foi inoculada em placas de 6 poços em uma densidade de 4×10^4 células/mL em meio RPMI enriquecido com SFB 5% e 1% de penicilina/estreptomicina. Em seguida, 2 mL foram colocados em cada poço e a placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após este período, o meio enriquecido foi aspirado e meio sem enriquecimento foi adicionado para o carenciamento, que possibilita a sincronização das células para o início do ciclo celular. Passadas 24 horas, as células foram

tratadas com as concentrações 2,5 e 25 µg/mL de ambos os extratos das sementes e da casca. Estas concentrações foram escolhidas com base nos resultados encontrados no ensaio antiproliferativo. Como controle positivo foi utilizada a colchicina (1,25 nM – Sigma-Aldrich®, EUA). Após 48 horas de tratamento, o meio de cultura de cada compartimento foi coletado em Eppendorf® de 2 mL. Posteriormente, os compartimentos foram lavados com 1 mL de tampão fosfato (0,2 mM, pH 7,0) em solução de NaCl 0,9% (PBS) e em seguida o conteúdo foi coletado. As células aderidas foram removidas com auxílio de solução de tripsina (0,25% em EDTA, Nutricell®, Campinas 200 µL/compartimento) seguido da adição de 2 mL de meio completo. A suspensão celular foi recolhida, reunida às duas suspensões previamente coletadas e a junção das três suspensões foi centrifugada (centrifuga Eppendorf® 5403, Alemanha) por 5 min, a 2500 RPM, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuscitado em 1 mL de PBS (0,2 mM, pH 7,0) e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi aspirado de forma a deixar cerca de 100 µL de PBS (0,2 mM, pH 7,0), no qual o pellet final foi delicadamente ressuscitado e cada suspensão foi transferida para um Eppendorf® de 1,5 mL previamente preenchido com 1 mL de etanol 70% gelado, o qual atuou como agente fixador e de permeabilização de membrana celular. As suspensões celulares foram então homogeneizadas e mantidas a 4°C por 24 horas. Após o período de fixação, as suspensões celulares foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos (microcentrifuga de eppendorf, Eppendorf® 5415C, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 1 mL de PBS (0,2 mM, pH 7,0), para lavagem e retirada de todo o etanol. As amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado, mantendo-se cerca de 100 µL do sobrenadante para ressuspensão do precipitado celular. Em seguida, foram adicionados 200 µL/suspensão do reagente Guava® Cell cycle (Merck Millipore 4500-0220, EUA). As amostras foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz, e analisadas em citômetro de fluxo, com excitação realizada por laser de argônio, a 488 nm, e a detecção de fluorescência realizada a 650-670 nm (5000 eventos adquiridos por suspensão). As amostras foram testadas em triplicata (Walsby *et al.*, 2011; González-Sarrías *et al.*, 2013; Vendramini-Costa *et al.*, 2016).

4.7.4.2. Análise dos resultados

A quantificação (%) das subpopulações de células nas fases sub-G1, G1, S e G2/M do ciclo celular foi realizada utilizando o software Guava Cell Cycle®,

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perfil de compostos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) possui muitos compostos fitoquímicos, como carotenoides, flavonoides e taninos (Dragano *et al.*, 2010; Arruda, 2015). Para conseguir a maior concentração destes compostos, o processo de extração é extremamente importante e ao decidir o método a ser utilizado devem-se levar em conta os custos, o nível de dificuldade, o número de ciclos de extração, a polaridade dos solventes dentre outros fatores. Os compostos fenólicos são, em sua maioria, moléculas polares, e por isso, solventes polares são mais comumente utilizados. Além disso, é frequente a mistura de solventes orgânicos com a água, que atua fazendo com que a superfície de contato entre solvente e amostra aumente e potencializando a extração da fração hidrofílica dos compostos (Arruda *et al.*, 2017).

Ayoub *et al.*, (2016) testaram quatro tipos de solventes no processo de extração de compostos fenólicos, e demonstraram que a maior quantidade foi obtida com a mistura metanol-acetona-água (7:7:6 v/v/v). Este método foi escolhido, no presente estudo, para o processo de extração das amostras de araticum. A análise realizada por UHPLC-ESI-MS/MS permitiu observar a presença de compostos fenólicos (Tabela 2). Metodologias de quantificação e caracterização como a utilizada neste trabalho vêm sendo desenvolvidas nas pesquisas mais recentes e chamam a atenção pela capacidade de caracterização de compostos presentes em matrizes complexas (Bataglion *et al.*, 2015).

A quantidade total de compostos fenólicos presentes no extrato da casca foi setenta e quatro vezes maior que a encontrada no extrato das sementes, porém, o extrato das sementes apresentou uma maior variedade destes compostos. Os compostos fenólicos participam do mecanismo de defesa da fruta contra patógenos e radiação UV, portanto a maior concentração destes na casca é justificada (Arruda *et al.*, 2018).

No extrato da casca foram caracterizados dez compostos, mas apenas cinco apresentaram valores maiores que os limites de quantificação, enquanto que o extrato das sementes apresentou ao todo doze compostos, todos com valores maiores que os limites de quantificação. Os compostos majoritários do extrato da casca foram a epicatequina e a catequina, ao passo que os do extrato das sementes foram a quercetina e o ácido clorogênico. Os dados obtidos na análise dos extratos brutos estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 2: Perfil de compostos fenólicos dos extratos brutos da casca e das sementes de *Annona crassiflora* Mart. por UHPLC-ESI-MS/MS.

Compostos	Concentração (µg/g extrato)	
	Extrato da casca	Extrato das sementes
Catequina	579,40±29,66 ^{Ba}	8,58±0,59 ^{Db}
Epicatequina	6221,63±140,53 ^{Aa}	12,10±0,56 ^{Cb}
Rutina	133,31±3,41 ^{CDa}	5,51±0,05 ^{Eb}
Quercetina	<LQ	21,11±0,13 ^A
Naringenina	<LQ	0,31±0,03 ^G
Ácido protocatecuico	<LQ	9,98±0,13 ^D
Ácido 4-hidroxibenzóico	<LD	0,68±0,01 ^G
Ácido vanílico	<LD	4,63±0,88 ^E
Ácido clorogênico	305,15±1,30 ^{Ca}	16,41±0,90 ^{Bb}
Ácido cafeico	<LQ	13,50±1,13 ^C
Ácido p-cumárico	14,97±0,19 ^{Da}	2,43±0,11 ^{Fb}
Ácido ferúlico	<LQ	2,51±0,45 ^F
Total de fenólicos	7254,46±162,72 ^a	97,74±2,50 ^b

Os dados representam valores médios para cada amostra ± desvios padrões. Valores menores que os limites de quantificação simbolizados por <LQ e não detectados simbolizados por <LD

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05) entre os resultados pelo Teste de Tukey e Teste t Student, respectivamente.

Diversos métodos de extração já foram utilizados em trabalhos sobre as propriedades biológicas do araticum. Justino *et al.*, (2017) utilizaram o etanol como solvente no processo de extração da casca do araticum para a análise de sua atividade como preventivo das complicações da diabetes. Pereira *et al.*, (2017) também escolheram o etanol para a extração no desenvolvimento do estudo sobre o potencial da casca do araticum como um agente contra obesidade. A atividade antimicrobiana foi testada por Silva *et al.*, (2014) com extratos etanólicos de diferentes partes do araticum (polpa, caule, casca, semente e folha), a atividade antimutagênica foi descrita por Vilar *et al.*, (2008) em extratos etanólicos das folhas e a atividade antiproliferativa foi demonstrada por Formagio *et al.*, (2015b) utilizando extratos metanólicos das folhas e das sementes em dez linhagens de células tumorais. Arruda *et al.*, (2018) utilizaram o método de Ayoub *et al.*, (2016) como o primeiro passo de um processo de fracionamento da polpa, casca e sementes de araticum.

Ayoub *et al.*, (2016) utilizaram a mistura metanol-acetona-água (7:7:6, v/v/v), acetona-água (80:20, v/v), metanol-água (70:30, v/v) e água, separadamente, na extração dos compostos fenólicos de amostras de amora, framboesa e mirtilo. A mistura metanol-acetona-água (7:7:6, v/v/v) foi a que permitiu a maior extração destes compostos. Utilizando esta mistura de reagentes, Arruda *et al.*, (2018) descreveram a caracterização e quantificação de compostos fenólicos das frações livre, esterificada, glicosilada e insolúvel dos extratos da casca e das sementes de araticum. Ácido cafeico, ferúlico, rutina e quercetina já haviam sido identificados na casca e na semente de araticum, porém estes não foram quantificados em estudos anteriores (Roesler *et al.*, 2007a). Arruda *et al.*, (2018) quantificaram um total de 5735,52 µg/g nas frações do extrato da casca e 164,66 µg/g nas frações do extrato das sementes. O método de extração descrito por Ayoub *et al.*, (2016) demonstrou ser efetivo na extração de compostos fenólicos do araticum, como pode ser observado no trabalho de Arruda *et al.*, (2018), e por isso foi escolhido para a execução do presente trabalho, no qual um total de 7244,46 µg/g de fenólicos foi quantificada no extrato bruto da casca e 97,74 µg/g no extrato das sementes. O resultado descrito para o extrato bruto da casca neste trabalho foi maior que o obtido na somatória das frações do extrato da casca no trabalho de Arruda *et al.*, (2018), ao passo que a somatória das frações do extrato das sementes apresentou maior valor quando comparado ao extrato bruto. O fracionamento pode ter concentrado os compostos presentes nas sementes. O estágio de maturação da fruta utilizada também pode ter influenciado nos resultados.

Pelo melhor de nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a caracterizar e a quantificar compostos fenólicos em extratos brutos da casca e das sementes de araticum. É também o primeiro a investigar a atividade cicatrizante destes extratos, assim como o potencial anticâncer do extrato da casca.

5.2. Determinação do conteúdo de compostos bioativos e capacidade antioxidante

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi obtido utilizando um espectrofotômetro UV/Visível e os resultados demonstraram uma grande quantidade para ambos os extratos, sendo o valor mais expressivo do extrato da casca (Tabela 3). A metodologia adotada foi a de *Folin-Ciocalteu*. Esta metodologia é simples, reprodutiva e tem boa aceitação. O método, baseado na formação de complexos através da transferência de

elétrons, não é específico, pois pode sofrer interferência de outros compostos não fenólicos presentes na amostra, como por exemplo, açúcares redutores (Magalhães *et al.*, 2008).

Tabela 3: Conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos condensados presentes nos extratos brutos da casca e das sementes de *Annona crassiflora* Mart e análise da capacidade antioxidante pelos ensaios DPPH, TEAC, ORAC hidrofílico e ORAC lipofílico.

Análise	Extrato da casca	Extrato das sementes
Conteúdo de fenólicos totais (mg GAE/g)	311,03±0,45 ^a	214,04±0,29 ^b
Flavonoides totais (mg CE/g)	117,12±1,10 ^a	23,74±0,5 ^b
Taninos condensados (mg CE/g)	179,94±0,99 ^a	3,27±0,02 ^b
DPPH (μmol TE/g)	1065±4,45 ^a	917±7,76 ^b
TEAC (μmol TE/g)	2022,13±0,98 ^a	190,54±7,54 ^b
ORAC hidrofílico (μmol TE/g)	1302,68±114,46 ^a	557,10±20,78 ^b
ORAC lipofílico (μmol TE/g)	4643,78±145,83 ^b	5166,30±19,06 ^a

Resultados apresentados como média (n=3) ± desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05) entre os resultados pelo Teste de Tukey.

Roesler *et al.*, (2006) quantificaram os fenólicos totais presentes nos extratos aquoso e etanólico das sementes e da casca do araticum em dois estágios de maturação. Os extratos etanólicos da casca obtidos do fruto completamente maduro e do fruto ligeiramente maduro resultaram, respectivamente, nos valores 111,42 e 90,72 (mg/g de amostra seca). Já os extratos aquosos da casca apresentaram os valores de 35,89 (mg/g de amostra seca) para o fruto completamente maduro, e 48,85 (mg/g de amostra seca) para o fruto ligeiramente maduro. Os extratos etanólicos das sementes obtidos do fruto completamente maduro e do fruto ligeiramente maduro resultaram, respectivamente, nos valores 110,48 e 136,98 (mg/g de amostra seca). E os extratos aquosos das sementes apresentaram os valores de 16,36 (mg/g de amostra seca) para o fruto completamente maduro, e 29,06 (mg/g de amostra seca) para o fruto ligeiramente maduro.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados frutos completamente maduros, e os resultados obtidos em ambos os extratos foram maiores que os descritos por Roesler *et al.*, (2006), o que fortalece a proposta de que o método de extração descrito por Ayoub *et al.*, (2016) potencializa a extração dos compostos fenólicos presentes nas amostras. Além disso, a quantidade destes compostos nos frutos pode variar de acordo com a composição do solo, com o grau de maturação e demais fatores (Arruda, 2015). Arruda *et al.*,

(2018) obtiveram 31,65 mg/g fenólicos totais na somatória das frações do extrato da casca e 12,68 mg/g nas frações do extrato das sementes. Ambos os extratos brutos apresentaram valores maiores de fenólicos totais.

Muitos compostos fenólicos já foram descritos por sua atividade antioxidante (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014), na cicatrização de feridas (Song *et al.*, 2017), na redução da mutagênese em células humanas (Khoddami *et al.*, 2013), na diminuição da incidência de câncer e diabetes (Khoddami *et al.*, 2013), como antiproliferativo (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014) e como anti-inflamatório (Zhang *et al.*, 2011). Portanto, alimentos que possuem este composto são de grande valia.

A determinação de flavonoides totais foi realizada por meio de um método colorimétrico baseado na formação de um complexo flavonoide-alumínio. O extrato da casca demonstrou ter uma quantidade aproximadamente cinco vezes maior de flavonoides totais quando comparado ao extrato das sementes (Tabela 3). Arruda *et al.*, (2018) quantificaram 22,05 mg/g de flavonoides totais na somatória das frações do extrato da casca e 7,33 mg/g nas frações do extrato das sementes. Ambos os extratos brutos apresentaram valores maiores de flavonoides totais e o extrato da casca também apresentou uma maior quantidade de flavonoides quando comparado ao extrato das sementes.

Os flavonoides atuam como antioxidantes e agem na inflamação por meio da mediação dos macrófagos e através do controle da produção de moléculas pró-inflamatórias como as prostaglandina e os leucotrienos (Gupta *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2008; Krishnaiah *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Kosłowska & Szostak-Wegierek, 2014). Estes compostos são responsáveis por reduzirem a peroxidação lipídica, estimularem a angiogênese e estarem envolvidos na reepitelização (Ambiga *et al.*, 2007). Também apresentam propriedades antivirais, anti-hipertensivas, quimiopreventivas e antibacterianas (Kosłowska & Szostak-Wegierek, 2014). Os flavonoides englobam uma série de compostos. A caracterização dos extratos permitiu observar a presença de diferentes flavonoides na casca e nas sementes.

A determinação de taninos condensados também foi realizada durante o desenvolvimento do projeto. O extrato da casca demonstrou ter uma quantidade cinquenta e cinco vezes maior de taninos que o da semente (Tabela 3). Arruda *et al.*, (2018) descreveram para a somatória das frações do extrato da casca um total de 17,96 mg/g de taninos condensados e para as frações do extrato das sementes um total de 3,08 mg/g. O extrato bruto da casca apresentou uma quantidade muito maior de taninos, enquanto o extrato das sementes apresentou resultado semelhante ao descrito por Arruda *et al.*, (2018).

Os taninos já foram descritos por sua ação adstringente, na inflamação e como cicatrizante. Sua atuação no local da ferida possibilita a formação de película (Araújo *et al.*, 2008; Barroso *et al.*, 2010). Também foram descritos como antimutagênicos, como inibidores da peroxidação lipídica e como antibacterianos (Cai *et al.*, 2017). Fumagalli *et al.*, (2016) demonstraram a ação anti-inflamatória dos taninos presentes no morango através de um modelo de gastrite. Cai *et al.*, (2017) afirmaram que diferentes tipos de taninos estão relacionados com atividades ligadas ao controle do câncer. Alguns por mecanismos de modulação de fatores, outros por supressão de genes e outros pela inibição da migração e da proliferação das células tumorais. Os taninos também são capazes de levar a apoptose (Cai *et al.*, 2017).

A capacidade antioxidante das amostras foi mensurada por três métodos. O primeiro é baseado na transferência de elétrons e está relacionado à capacidade dos antioxidantes de se ligarem ao radical orgânico DPPH[•], sendo possível determinar o poder redutor das amostras (Roesler *et al.*, 2007b). A capacidade antioxidante do extrato da casca apresentou maior valor quando comparada ao extrato das sementes (Tabela 3). O método de DPPH é um dos mais utilizados, pois é rápido, prático e bem embasado (Formagio *et al.*, 2015).

O segundo método tem como base a geração do radical ABTS^{•+} e também permite a determinação da redução do radical pela amostra através da transferência de elétrons, o que é observado pela mudança de coloração (Re *et al.*, 1999; Rodríguez-Bonilla *et al.*, 2017). Utilizando este método, o extrato da casca continuou apresentando uma maior capacidade antioxidante em relação ao extrato das sementes e o valor observado no extrato da casca foi dez vezes maior que no das sementes. A determinação de capacidade antioxidante por meio do teste TEAC resultou nos valores descritos na tabela 3.

O terceiro ensaio realizado utilizou o método competitivo ORAC no qual ocorre a transferência de átomos de hidrogênio dos antioxidantes para os radicais livres (Rodríguez-Bonilla *et al.*, 2017). O método ORAC tem como base a inibição da oxidação induzida pelos radicais peroxila gerados pelo AAPH. O decaimento da fluorescência, que ocorre pela reação entre radical peroxila e a fluoresceína, é inibido na presença de antioxidantes. (Mellado-Ortega *et al.*, 2017). No ORAC hidrofílico foi possível observar uma maior capacidade antioxidante no extrato da casca em relação ao das sementes, sendo o valor encontrado para o extrato da casca aproximadamente duas vezes maior. No ORAC lipofílico esta relação se inverteu e o extrato das sementes apresentou pela primeira vez um valor maior que o da casca.

O teor de lipídeos do araticum foi descrito por Roesler *et al.*, (2006). A casca, obtida de frutos completamente maduros, apresentou 0,75% de lipídeos em sua composição centesimal, enquanto as sementes apresentaram 15,91%. A porcentagem de lipídeos nas sementes de araticum foi aproximadamente vinte e uma vezes maior que a observada na casca. Estes dados auxiliam no entendimento dos resultados obtidos na fração lipofílica do ORAC, uma vez que este ensaio é influenciado pela quantidade de lipídeos presentes em cada amostra testada. Seguindo este raciocínio, uma amostra com maior porcentagem de lipídeos na sua composição provavelmente apresentará maiores valores nesta análise de capacidade antioxidante.

Todos os métodos de análise da capacidade antioxidante podem ter interferências, e por isso é tão importante utilizar duas ou mais técnicas para confirmar o potencial da amostra. Os ensaios DPPH, TEAC e ORAC apresentaram resultados diferentes em relação aos extratos, o que pode ser explicado pelo mecanismo de cada um. No entanto, todos apresentaram um valor maior de capacidade antioxidante no extrato da casca quando comparado com o extrato das sementes, exceto na fração lipofílica do ensaio ORAC, na qual o extrato das sementes apresentou maior valor. Este último resultado pode ser facilmente explicado pela composição das sementes, que possuem uma maior porcentagem de lipídeos que a casca, como descrito acima.

Arruda *et al* (2018) obtiveram na somatória das frações do extrato da casca 189,32 $\mu\text{mol TE/g}$ para o ensaio de DPPH, 292,28 $\mu\text{mol TE/g}$ para o ensaio TEAC e 448,29 $\mu\text{mol TE/g}$ para ORAC hidrofílico. Na somatória das frações do extrato das sementes quantificaram 71,66 $\mu\text{mol TE/g}$ (DPPH), 94,81 $\mu\text{mol TE/g}$ (TEAC) e 260,22 $\mu\text{mol TE/g}$ (ORAC hidrofílico). Todos os dados obtidos para ambos os extratos brutos obtidos no presente trabalho foram maiores que os dos trabalhos citados acima.

Os antioxidantes são utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Arruda *et al* 2017b; Tohma *et al.*, 2017). Atuam combatendo os radicais livres, que quando são produzidos de maneira moderada participam de processos fisiológicos importantes para o organismo, mas se produzidos de forma descontrolada, são responsáveis pela deterioração de alimentos e por diversos processos patológicos (Magalhães *et al.*, 2008; Proprac *et al.*, 2017). A utilização dos antioxidantes na área da saúde é crescente. Estes compostos são importantes no tratamento de doenças inflamatórias, alergias e diversos tipos de câncer (Roesler *et al.*, 2007b; Ghitescu *et al.*, 2015; Fattahi & Rahimi 2016; Arruda *et al.*,

2017b). Os radicais livres causam danos em diversas estruturas celulares, como por exemplo, no DNA, e este processo pode ser um dos fatores iniciadores do câncer.

Os antioxidantes atuam impedindo os danos causados por radicais livres, inibindo os mecanismos de adesão e invasão, a proliferação tumoral, sinais de transdução e a expressão de genes relacionados à oncogênese. Já foram descritos também como indutores de apoptose (Liu 2004). No campo da cicatrização, estes compostos atuam por uma série de fatores, dentre elas a inibição de danos causados por espécies reativas do oxigênio (ROS) às células responsáveis pelas diferentes fases do processo cicatricial. Além disso, atuam como moduladores da formação do novo tecido, por meio de estímulo da produção de colágeno e por facilitar a chegada das células reparadoras ao induzir a formação de novos vasos sanguíneos no local (Moghadam *et al.*, 2017). Uma vez que esta primeira etapa do trabalho resultou em dados promissores, ensaios biológicos foram realizados na sequência com intuito de testar a atividade dos extratos como promotores de cicatrização e adjuvantes no tratamento do câncer.

5.3. Teste de atividade antiproliferativa

A avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* foi um dos passos realizados na investigação da atividade anticâncer do araticum. O extrato bruto das sementes apresentou atividade antiproliferativa para a maioria das linhagens. Demonstrou ser mais efetivo que o extrato da casca na inibição do crescimento celular, apresentando ação citocida nas maiores doses (Figura 5). O menor valor de TGI (concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular) do extrato das sementes foi observado para a linhagem tumoral de ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES – TGI = 5,36 µg de extrato/mL), sendo este resultado quarenta e três vezes menor que o da casca e quatro vezes menor que o da doxorubicina. O extrato da casca foi seletivo para a linhagem de glioma (U251 - TGI = 37,64 µg de extrato/mL). Para as demais linhagens os valores de TGI observados foram altos, não apresentando, portanto, atividade antiproliferativa.

Para as linhagens U251 (glioma), NCI-H460 (pulmão) e HT-29 (cólon) os dois extratos apresentaram resultados semelhantes, sendo mais efetivos na linhagem de U251 (glioma). Para as linhagens NCI-H460 (pulmão) e HT-29 (cólon) o valor de TGI foi alto, portanto ambos não foram eficientes. Para a linhagem MCF-7 (mama) o valor de TGI do

extrato das sementes foi aproximadamente três vezes menor do que o do extrato da casca. Para as linhagens PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário) e K562 (leucemia) os valores de TGI do extrato das sementes foram aproximadamente doze, seis e quatro vezes menor, respectivamente, que os do extrato da casca (Tabela 4). Da mesma forma, para as linhagens não tumorais de queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (3T3), o extrato bruto das sementes apresentou ação mais citotóxica que o extrato bruto da casca, com os valores de TGI dez e quatro vezes menores, respectivamente (Figura 5).

Tabela 4: Valores da concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (TGI – μg de extrato/mL) do teste de atividade antiproliferativa.

	2*	m*	a*	4*	p*	o*	h*	k*	q**	3**
Doxo	0,25	0,39	20,9	0,67	0,77	1,14	4,70	0,35	0,09	8,9
Sementes	29,7	31,5	5,4	>250	16,6	20,9	76,8	29,4	7,1	31,7
Casca	37,6	93,2	230,1	>250	197	122,4	96,6	128,8	72,2	125,7

*Linhagens tumorais humanas: 2 = U251 (glioma), m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT-29 (cólon); k = K562 (leucemia). **Linhagem não tumoral humana: q = HaCaT (queratinócito); 3 = 3T3 (fibroblasto). Tempo de exposição: 48h. Concentração das amostras: 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Concentração da doxorrubicina: 0,025, 0,25, 2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$.

O extrato das sementes apresentou uma ação interessante na linhagem de ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES), demonstrando uma atividade antiproliferativa melhor que a do quimioterápico doxorrubicina, utilizado como controle positivo. A ação deste extrato nesta linhagem é promissora, uma vez que é uma linhagem resistente a diversas substâncias. Em comparação com a doxorrubicina, o extrato das sementes demonstrou também ser tóxico para as linhagens não tumorais de queratinócitos e fibroblastos.

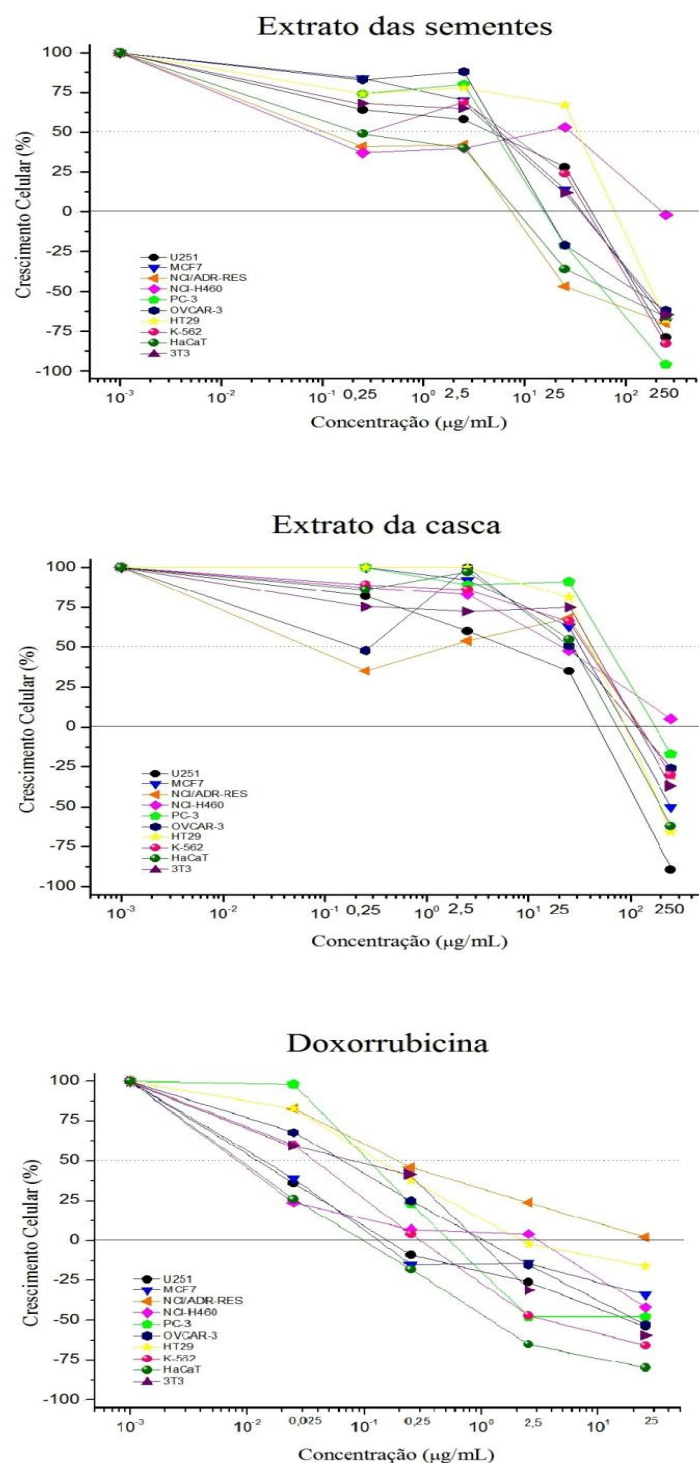


Figura 5: Gráficos da atividade antiproliferativa dos extratos brutos da casca e das sementes de araticum e do quimioterápico doxorrubicina em cultura de células tumorais e não tumorais, relacionando porcentagem de crescimento com a concentração, após 48 horas de incubação. Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (cólon); K562 (leucemia). Linhagens não tumorais: HaCaT (queratinócito humano); 3T3 (fibroblasto murino).

A diferença na ação dos extratos nas diferentes linhagens pode ser resultado da composição da casca e das sementes, uma vez que possuem compostos diferentes e em quantidades diferentes. O extrato das sementes possui um maior valor de quercetina, por exemplo, que já foi descrita por causar danos no DNA de células tumorais (George *et al.*, 2017). Formagio *et al.*, (2015b) descreveram a atividade antiproliferativa do extrato metanólico das sementes do araticum. Para as linhagens de glioma (U251), ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES) e ovário (OVCAR-3), as sementes extraídas com metanol-acetona-água (7:7:6, v/v/v), do presente estudo, demonstraram inibir totalmente o crescimento celular (TGI) em uma concentração menor do que as extraídas apenas com metanol, do estudo citado.

Para as linhagens de mama (MCF-7), pulmão (NCI-H460) e cólon (HT-29) o extrato metanólico das sementes foi mais efetivo na inibição do crescimento celular (Formagio *et al.*, 2015b). Mesquita *et al.*, (2009) analisaram a atividade antiproliferativa de extratos etanólicos da parte externa e da parte interna da raiz de araticum em linhagens tumorais de glioblastoma (SF-295), carcinoma de cólon (HTC-8), melanoma (MDA-MB-435) e leucemia (HL-60). O extrato da parte externa da raiz apresentou melhores resultados antiproliferativos para todas as linhagens tumorais, com valores de IC₅₀ de 8,2 µg/mL para a linhagem de glioblastoma, 14,9 µg/mL para a linhagem de carcinoma de cólon, 9,5 µg/mL para a de melanoma e 6,0 µg/mL para a de leucemia, ao passo que o extrato da parte interna da raiz apresentou IC₅₀ de 15,2 µg/mL, 24,9 µg/mL, 13,3 µg/mL e 13,4 µg/mL, para as mesmas linhagens, respectivamente. A atividade antiproliferativa do extrato das sementes, observada neste trabalho, para a linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) é interessante no desenvolvimento de pesquisas que visem o controle de doenças nas quais ocorre uma hiperproliferação destas células, como por exemplo, a psoríase (Burlando *et al.*, 2009).

5.4. Ensaio de migração celular com queratinócitos e fibroblastos

O ensaio de migração celular foi escolhido por ser um método bem embasado, reprodutível e capaz de representar o processo de migração que ocorre no organismo (Liang *et al.*, 2007). Diante de uma lesão, queratinócitos e fibroblastos migram para o local da ferida com o intuito de restaurar o tecido (Walter *et al.*, 2010). Os resultados do ensaio de migração com queratinócitos HaCaT demonstraram que o meio enriquecido com 5% SFB induziu

100% de fechamento da ranhura, o meio sem enriquecimento induziu 55% e as duas concentrações do extrato das sementes (3,6 e 1,8 µg/mL) induziram 73% e 54% de fechamento, respectivamente. O extrato da casca na concentração de 36 µg/mL permitiu apenas 3,8% de fechamento da ranhura e na concentração de 18 µg/mL apenas 0,6% da ranhura foi fechada (Figura 6; Tabela 5). Após as 24 horas, as imagens feitas das ranhuras tratadas com extrato da casca eram quase iguais às aquelas feitas na primeira hora de tratamento, demonstrando que a migração celular não aconteceu. As concentrações utilizadas foram escolhidas com base nos resultados de TGI obtidos no ensaio antiproliferativo e após ensaios preliminares. No ensaio de migração com fibroblastos 3T3 o meio enriquecido (SFB 5%) induziu um fechamento de 100% da ranhura. Os demais tratamentos, meio sem enriquecimento SFB 5%, extrato das sementes nas concentrações 1,5 e 0,75 µg/mL e extrato da casca (6,2 e 3,1 µg/mL) induziram fechamentos de 31%, 28%, 16%, 18% e 34%, respectivamente (Figura 7; Tabela 6).

Estes resultados demonstraram que para a linhagem de fibroblastos murinos 3T3 nenhum dos extratos estimulou a migração celular e os extratos das sementes e da casca, em sua menor e maior concentração, respectivamente, causaram até uma leve inibição da migração celular. As diferenças nos resultados obtidos nos dois ensaios de migração são justificadas por cada linhagem celular ter suas especificidades, como morfologias, capacidade de aderência à parede das placas, sensibilidade e densidades de inoculação diferentes. A linhagem de queratinócitos (HaCaT) adere facilmente, é mais resistente às condições desfavoráveis como a falta de enriquecimento com SFB 5% e dificilmente desprende, já a linhagem de fibroblastos (3T3) é sensível, tem grande dificuldade em sobreviver na ausência de SFB e desprende facilmente. Este ensaio e estas linhagens celulares foram escolhidos porque a migração celular de queratinócitos e fibroblastos é um dos passos essenciais na cicatrização de feridas.

O processo cicatricial é uma tentativa de restabelecer a integridade de um tecido lesado (Mandelbaum *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2017). O reparo tecidual começa na fase inflamatória, na qual ocorre a agregação plaquetária e a cascata de coagulação, tem sequência com a fase proliferativa, na qual ocorre a reepitelização, migração de queratinócitos e produção de colágeno, e se encerra na fase de remodelamento com a contração da ferida (Mandelbaum *et al.*, 2003; Rodrigues, 2011; Mayo *et al.*, 2017). Diversos fatores podem interferir na cicatrização e prolongar o processo, tornando-o menos eficiente e podendo levar à cronificação das feridas, o que faz com que ocorra um aumento nos índices de mortalidade

entre os pacientes (Ponrasu & Suguna, 2014; Aragona *et al.*, 2017; Mayo *et al.*, 2017). Alguns compostos presentes nas plantas, como os flavonoides e demais fenóis podem acelerar o processo de cicatrização, diminuindo estes índices (Mensah *et al.*, 2001; Farahpour *et al.*, 2016).

Tabela 5: Porcentagem de fechamento da ranhura do ensaio de migração celular com queratinócitos humanos imortalizados HaCaT após 24 horas de tratamento.

Porcentagem de fechamento das ranhuras em ensaio com HaCaT		
Tratamento	Concentração da amostra($\mu\text{g/mL}$)	Porcentagem (%)
Meio enriquecido SFB 5%	-	100 ± 0
Meio sem SFB 5%	-	$55 \pm 6,25$
Extrato das sementes	3,6	$73 \pm 7,91$
Extrato das sementes	1,8	$54 \pm 8,40$
Extrato da casca	36	$3,8 \pm 5,23$
Extrato da casca	18	$0,6 \pm 0,13$

Tabela 6: Porcentagem de fechamento da ranhura do ensaio de migração celular com fibroblastos murinos 3T3 após 24 horas de tratamento.

Porcentagem de fechamento das ranhuras em ensaio com 3T3		
Tratamento	Concentração da amostra($\mu\text{g/mL}$)	Porcentagem (%)
Meio enriquecido SFB 5%	-	100 ± 0
Meio sem SFB 5%	-	$31 \pm 8,82$
Extrato das sementes	1,5	$28 \pm 3,41$
Extrato das sementes	0,75	$16 \pm 7,86$
Extrato da casca	6,2	$18 \pm 8,19$
Extrato da casca	3,1	$34 \pm 5,77$

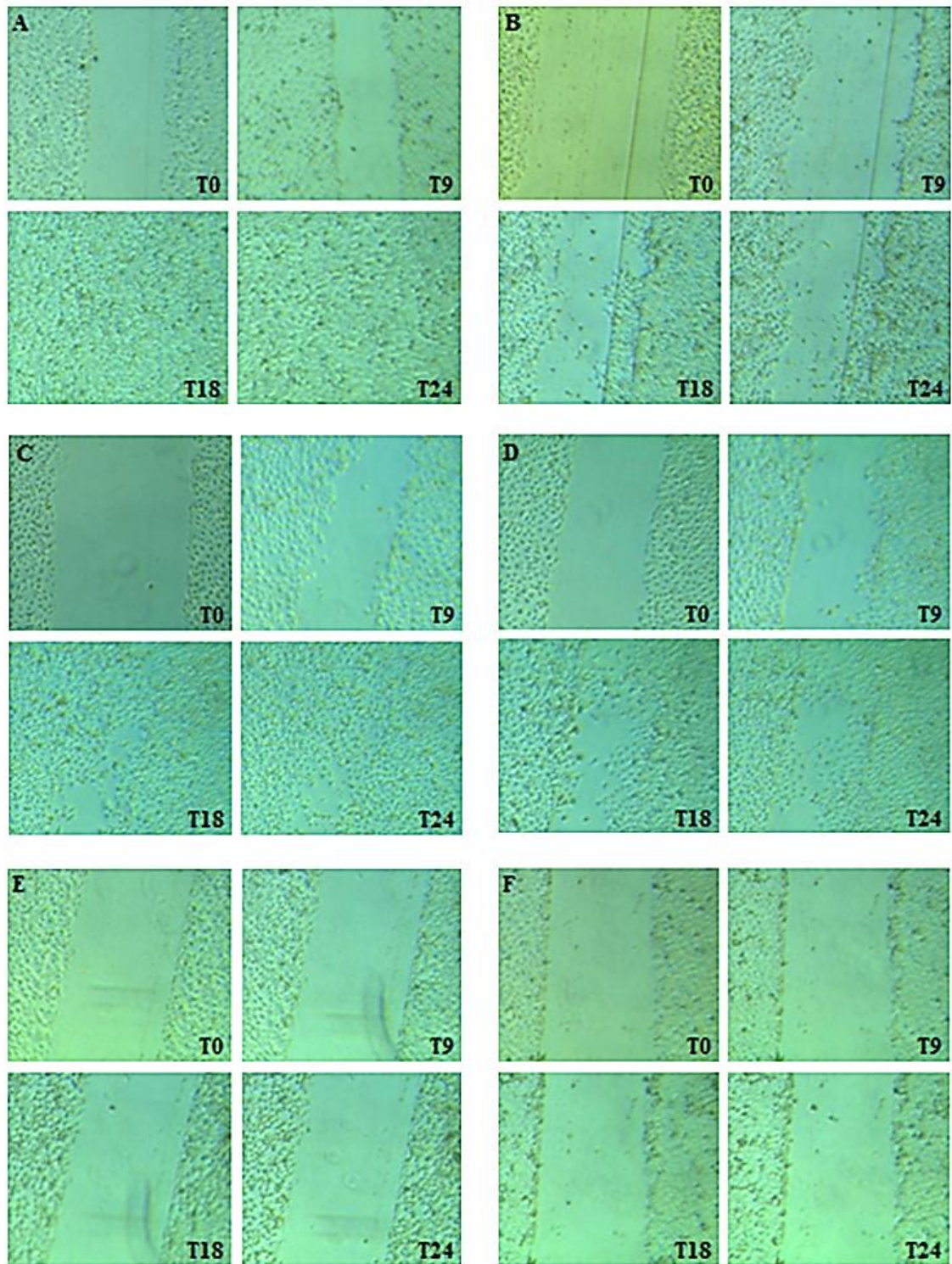


Figura 6: Migração de queratinócitos humanos imortalizados tratados com meio enriquecido com SFB 5% (A), com meio sem enriquecimento (B), com extrato das sementes na concentração de 3,6 $\mu\text{g/mL}$ (C), com extrato das sementes na concentração de 1,8 $\mu\text{g/mL}$ (D), com extrato da casca na concentração de 36 $\mu\text{g/mL}$ (E) e com extrato da casca na concentração de 18 $\mu\text{g/mL}$ (F) nos tempos 0, 9, 18 e 24 horas.

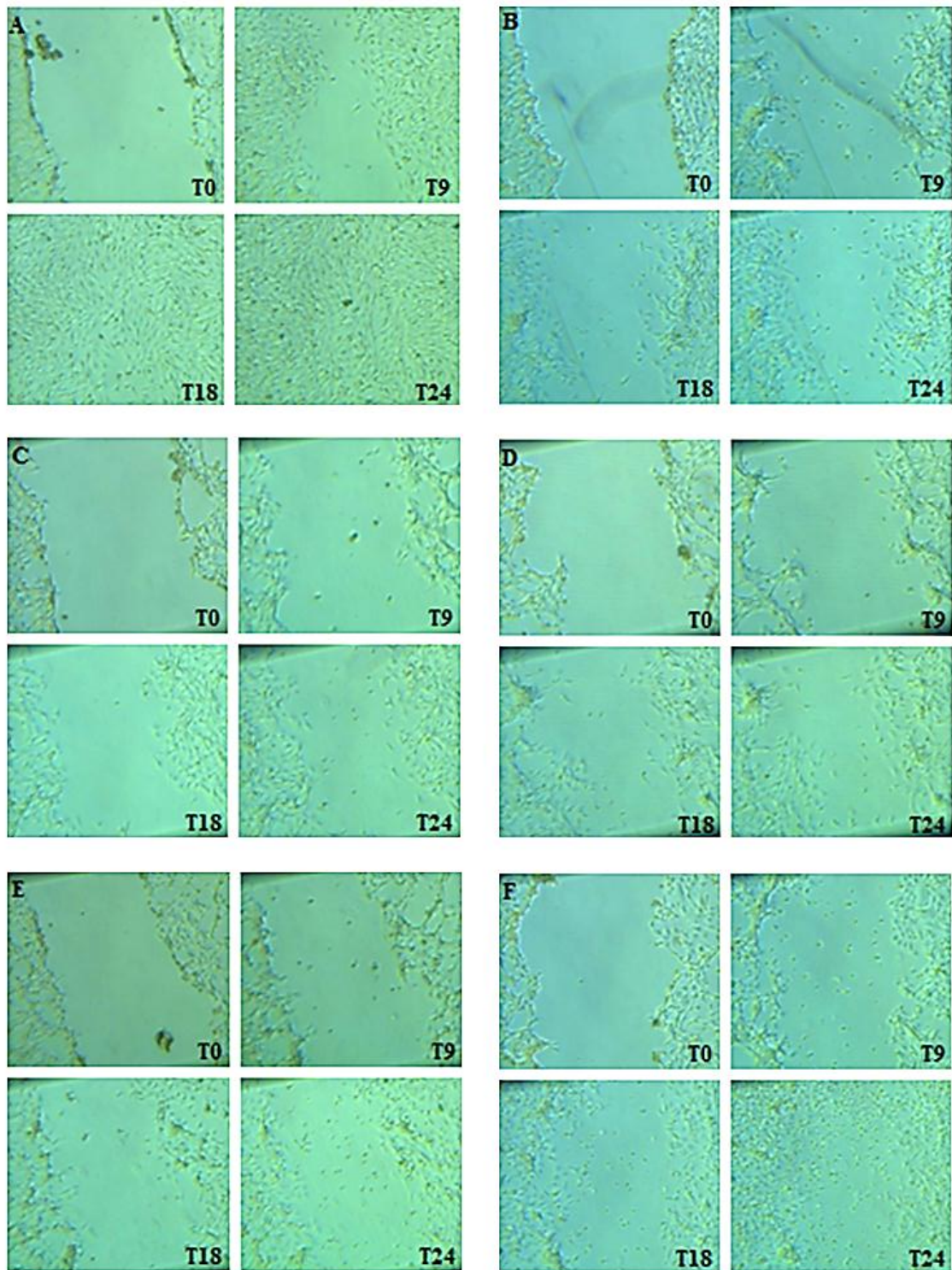


Figura 7: Migração de fibroblastos murinos tratados com meio enriquecido com SFB 5% (A), com meio sem enriquecimento (B), com extrato das sementes na concentração de 1,5 µg/mL (C), com extrato das sementes na concentração de 0,75 µg/mL (D), com extrato da casca na concentração de 6,2 µg/mL (E) e com extrato da casca na concentração de 3,1 µg/mL (F) nos tempos 0, 9, 18 e 24 horas.

Os resultados obtidos demonstraram que o extrato das sementes tem potencial como agente cicatrizante em queratinócitos humanos (HaCaT), o que pode ser observado na concentração de 3,6 µg/mL, que induziu 73% de fechamento da ranhura em comparação aos 55% induzidos pelo meio sem enriquecimento com SFB 5%. Walter *et al.*, (2010) realizaram um ensaio de migração celular com células HaCaT no qual observaram que o meio sem enriquecimento fechou 57% da ranhura, valor semelhante ao obtido neste trabalho. O extrato das sementes chamou a atenção por ser o extrato com maior atividade antiproliferativa, inclusive para a linhagem HaCaT, e ao mesmo tempo ser o mais eficaz na promoção da migração celular. As duas atividades parecem contraditórias no primeiro momento, porém vale lembrar que o tempo de experimento e a concentração dos extratos foram diferentes para cada ensaio.

O tempo de experimento do ensaio antiproliferativo foi de 48 horas e o do ensaio de migração celular foi de 24 horas, tempo no qual o controle positivo fechou e o ensaio foi finalizado. O tempo de experimento pode interferir em fatores como número de duplicações celulares e adesão das células aos poços das placas. Além do mais, no ensaio de migração celular foi utilizada metade da concentração do TGI obtido no ensaio antiproliferativo e uma vez que este valor corresponde à concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular em 48 horas, em um ensaio de 24 horas, era esperado que metade desta concentração não apresentasse esta ação.

Burlando *et al.*, (2009) testaram diferentes ácidos isolados de diferentes tipos de líquens em um ensaio antiproliferativo em linhagens tumorais de mesotelioma pleural (MM98) e carcinoma vulvar (A431) e em linhagem não tumoral de queratinócitos humanos (HaCaT). Realizaram também um ensaio de migração celular com a linhagem HaCaT. Dentre os ácidos testados, o ácido úsnico foi o que apresentou maior atividade antiproliferativa para todas as linhagens, inclusive para a linhagem não tumoral (HaCaT), e também foi o mais eficaz na indução da migração celular. As concentrações utilizadas nos dois ensaios foram diferentes. Estes dados corroboram os resultados obtidos no presente estudo para o extrato das sementes.

O extrato das sementes é composto de diferentes tipos de flavonoides, como quercetina, epicatequina, catequina e rutina e outros compostos fenólicos, como os ácidos clorogênico, cafeico e ferúlico (Arruda *et al.*, 2018). A quercetina, por exemplo, já foi descrita como promotor da cicatrização de feridas em um estudo realizado com ratos machos da linhagem Wistar (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Além disso, a quantificação deste extrato

resultou em uma quantidade baixa de taninos (3,27 mg CE/g) quando comparado ao extrato da casca (179,94 mg CE/g). Arruda *et al.*, (2018) também obtiveram um valor maior de taninos na somatória das frações do extrato da casca quando comparado com a somatória das frações do extrato das sementes, sendo que o primeiro apresentou 17,96 mg CE/g e o segundo 3,08 mg CE/g, respectivamente. A composição do extrato da casca, com maior concentração de taninos que a descrita para o extrato das sementes pode explicar a ação inibitória de migração celular observada durante o experimento.

O extrato da casca impediu a migração celular das células HaCaT. Para chegar à concentração utilizada neste ensaio foram realizados testes preliminares nos quais foram testadas concentrações maiores e menores dos extratos. O extrato da casca inibiu a migração celular mesmo em concentrações muito menores e maiores, o que sugere que a ação de inibição deste extrato não é dose dependente. Diferentes classes de taninos já foram descritos por inibir a migração celular de uma série de linhagens tumorais e podem ser os responsáveis pela inibição observada (Cai *et al.*, 2017). Os resultados obtidos abrem caminhos para outros estudos, pois a migração coletiva de células, que é um processo complexo e ocorre por meio de uma série de mecanismos, está presente tanto na cicatrização de feridas, quanto em doenças como o câncer (Jonkman *et al.*, 2014).

O extrato da casca pode ser alvo de estudo em pesquisas futuras voltadas para o tratamento de queloides, nas quais ocorre um aumento descontrolado de células no local da lesão, ou até mesmo para o uso como um adjuvante no tratamento do câncer, no qual poderia agir evitando a migração das células tumorais e consequentemente auxiliando na prevenção da metástase. Os resultados observados para este extrato também podem estar relacionados com uma ação citostática, ou seja, por meio do controle do crescimento celular. O impedimento da migração observado nos queratinócitos pode também ocorrer em células tumorais, o que deve ser testado em estudos futuros. Becker *et al.*, (2016) demonstraram a capacidade de um fitoquímico utilizado no tratamento de metástase de impedir a migração celular tanto em células não tumorais quanto em células tumorais. Não é incomum que algumas drogas utilizadas no controle da metástase possam atrapalhar a migração de células normais, porém, diante de todos os efeitos colaterais causados pelos quimioterápicos, danos causados pela falha na migração, como uma má cicatrização, não seriam considerados tão preocupantes (Becker *et al.*, 2016).

5.5. Ensaio de viabilidade celular por sulforrodamina em queratinócitos (HaCaT)

Para avaliar se o impedimento da migração celular nos compartimentos tratados com o extrato da casca não ocorreu por uma morte significativa de células da linhagem HaCaT, foi realizado o ensaio de viabilidade celular com sulforrodamina B. Este método permite observar a viabilidade pela correlação com o conteúdo de proteínas em células viáveis. No momento da fixação somente células viáveis permanecem e somente estas são coradas. Os resultados obtidos foram avaliados e não houve diferença estatística entre as absorbâncias das células tratadas com a casca e daquelas tratadas com meio sem enriquecimento e com o extrato das sementes. Um cálculo da porcentagem de células viáveis para cada tratamento foi realizado utilizando o meio enriquecido com SFB 5% como controle de 100% de viabilidade. Assim, foi possível concluir que as células tratadas com meio sem enriquecimento e com os extratos das sementes e da casca apresentaram menor porcentagem de viabilidade quando comparadas àquelas tratadas com o meio enriquecido com SFB 5%, mas apesar da viabilidade ser menor, em todos os tratamentos as porcentagens de viabilidade celular permaneceram acima dos 70%. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, as células presentes nos poços tratados com extrato da casca em suas duas concentrações estavam viáveis ao final do experimento, demonstrando que provavelmente o que ocorreu foi mesmo uma inibição do processo de migração celular e não ação citocida (Tabela 7). Apesar de não apresentar atividade citocida, o extrato da casca pode ter apresentado uma ação citostática para a linhagem testada.

Tabela 7: Porcentagem de células viáveis ao final do ensaio de migração celular com HaCaT.

Porcentagem de células viáveis		
Tratamento	Concentração da amostra (µg/mL)	Viabilidade (%)
Meio enriquecido SFB 5%	-	100 ± 0
Meio sem SFB 5%	-	77 ± 2,68
Extrato das sementes	3,6	80 ± 3,32
Extrato das sementes	1,8	74 ± 2,61
Extrato da casca	36	72 ± 0,46
Extrato da casca	18	76 ± 2,17

5.6. Análise do ciclo celular

Esta análise do ciclo celular permite determinar as diferentes fases através do conteúdo de DNA. O iodeto de propídio é utilizado por ser um intercalante de DNA, portanto, o número de células presentes em cada fase do ciclo é indicado através da intensidade de sua fluorescência. A leitura, então, permite observar as fases G1, cuja característica é ter conteúdo de DNA 2 C, G2/M, com o dobro da quantidade de DNA (4 C) e S, na qual o conteúdo de DNA está entre 2 C e 4 C (Paiva, 2016). Após 48 horas, o tratamento com o extrato da casca na concentração de 25 µg/mL levou a uma diminuição da subpopulação de células U251 na fase G1. Nenhuma alteração significativa foi observada para a concentração de 2,5 µg/mL (Figura 8). Em relação ao tratamento com o extrato das sementes, foi possível observar, após 48 horas, um aumento na subpopulação de células de glioma tratadas com ambas as concentrações (2,5 e 25 µg/mL) na fase G2/M e diminuição da subpopulação da fase G1. Não ocorreram mudanças significativas na subpopulação de células em fase S (Figura 8).

Compostos capazes de parar o ciclo celular de células tumorais têm sido cada vez mais visados para o tratamento do câncer e os nossos achados indicam que os extratos de araticum possuem grande potencial neste sentido, principalmente o extrato das sementes, desde que sejam específicos. Estudos futuros devem visar o isolamento dos compostos responsáveis pela parada do ciclo celular, garantindo a especificidade desta ação (Androutsopoulos & Spandidos, 2018). A atividade antiproliferativa observada pelo ensaio de SRB para o extrato das sementes condiz com os achados relacionados à parada do ciclo celular na fase G2/M e estes sugerem uma ação sobre o fuso mitótico. Um agente anti-mitótico conhecido por induzir parada no ciclo celular na fase G2/M é a colchicina, um alcaloide que inibe a formação do microtúbulo por meio da ligação entre os monômeros α e β da tubulina. Apesar de ser efetiva, sua toxicidade e consequentes efeitos adversos fazem com que seu uso seja restrito (Lu *et al.*, 2012; Paiva, 2016).

O extrato etanólico das sementes do araticum foi descrito como citogenotóxico, capaz de agir inibindo a mitose e causando danos nos cromossomos e no núcleo. Os fenóis, por exemplo, podem inibir a divisão celular (Ribeiro *et al.*, 2013). É extremamente importante a descoberta de compostos que consigam parar o ciclo celular em G2/M e não tenham alta toxicidade como a colchicina. Alguns alcaloides, flavonoides e taninos que já foram descritos por sua ação na parada do ciclo celular e pelo estímulo da apoptose de células tumorais e

podem ser os responsáveis pelos resultados observados (Ribeiro *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2017; George *et al.*, 2017).

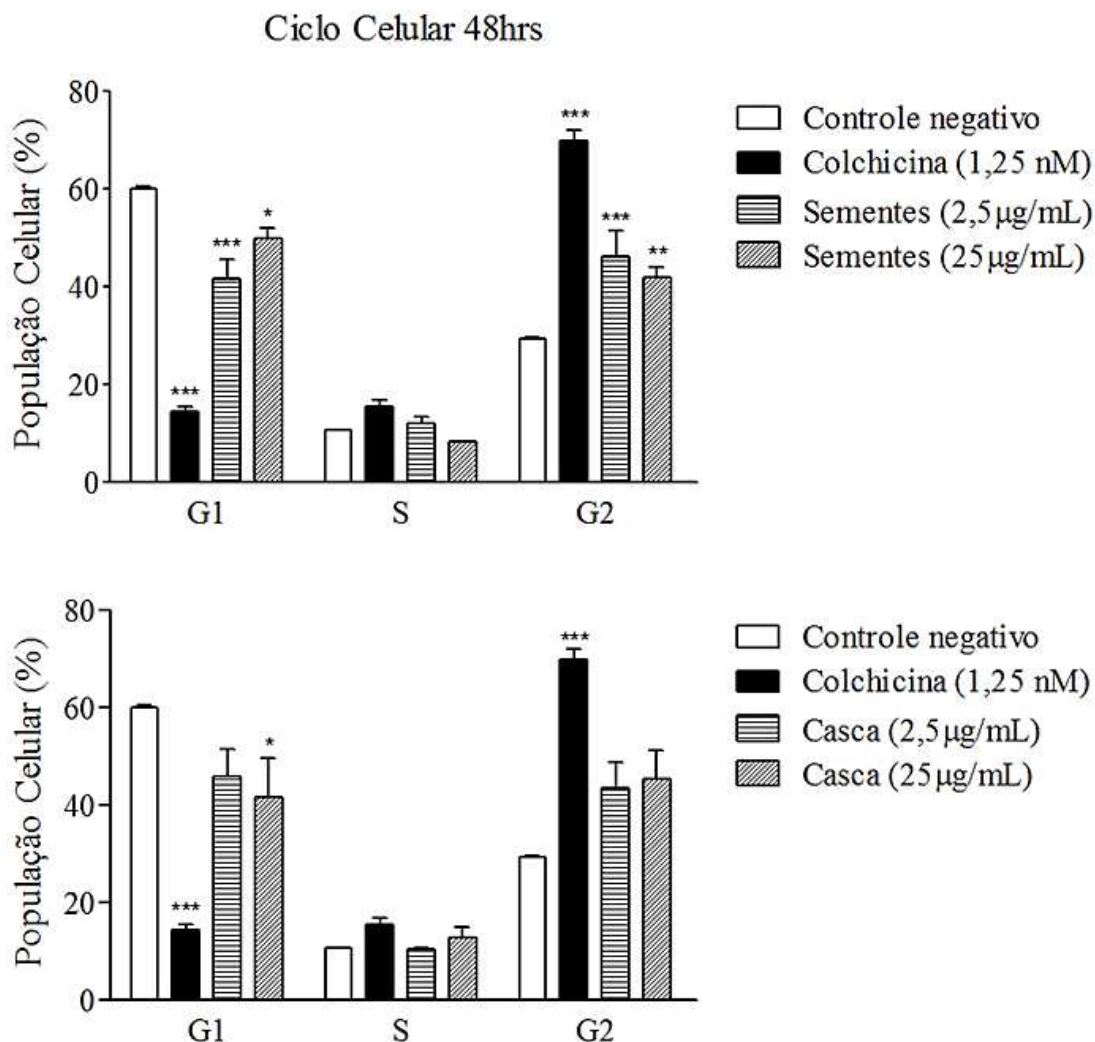


Figura 8: Análise do comportamento do extrato das sementes e do extrato da casca de araticum nas fases do ciclo celular. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (Two way ANOVA – seguido pelo teste Bonferroni).

Jeong *et al.*, (2009) investigaram a ação da quercetina como indutor de parada do ciclo celular em células tumorais de mama (SK-Br3) e os resultados demonstraram que este composto induziu parada na fase G1 em sua menor concentração. O extrato das sementes também induziu parada do ciclo celular na fase G1 e esta ação também foi mais efetiva em sua menor dose. O extrato das sementes possui 21,11 µg/g de quercetina. A quantidade de quercetina no extrato da casca ficou abaixo do limite de quantificação. O extrato da casca

também apresentou valores menores que o limite de quantificação para naringenina, enquanto o extrato das sementes apresentou 0,31 µg/g. A naringenina já foi descrita por induzir parada nas fases G1 e G2/M do ciclo celular de células de carcinoma hepatocelular (HepG2) (Arul & Subramanian, 2013). Os resultados obtidos sugerem um potencial como quimioterápico para ambos os extratos, principalmente para o extrato das sementes.

6. Considerações finais

Os compostos bioativos identificados nas amostras já foram descritos na literatura por suas atividades biológicas. Itoh *et al.*, (2010) demonstraram que o ácido vanílico possui atividade imunomoduladora e antioxidante. Catequina já foi descrita por seu poder de inibir a invasão de células tumorais em tecidos sadios e por ter elevada atividade antioxidante (Chahar *et al.*, 2011; Kosłowska & Szostak-Wegierek, 2014). Quercetina tem como propriedades a atividade antioxidante, a modulação das plaquetas, a capacidade de inibir células de melanoma, de reduzir metástase e causar danos no DNA de células cancerígenas (Chahar *et al.*, 2011; Kosłowska & Szostak-Wegierek, 2014; George *et al.*, 2017). Rutina atua na permeabilidade capilar (Kosłowska & Szostak-Wegierek, 2014). A diferença dos resultados nos ensaios realizados com o extrato da casca e o das sementes é, portanto, provavelmente devida à composição de cada um, uma vez que a casca, por exemplo, possui maior quantidade de catequina e rutina, e a semente maior quantidade de quercetina, dentre outros compostos.

Os resultados obtidos permitem dizer que ambos os extratos apresentam grande potencial antioxidante e farmacológico, e poderão ser utilizados em estudos futuros, auxiliando a impulsionar a descoberta de novos usos do araticum, inclusive das partes que se tornariam resíduo como a casca e a semente, tanto na área da farmacologia quanto na área de alimentos. A caracterização e quantificação dos extratos brutos, a atividade antiproliferativa do extrato da casca e do extrato das sementes para algumas linhagens tumorais e não tumorais, a avaliação da atividade cicatrizante dos extratos de araticum por meio na análise da capacidade destes extratos de induzir ou inibir a migração celular de células essenciais para o processo cicatricial e a investigação da capacidade dos extratos de influenciar no ciclo celular da linhagem tumoral de glioma são inéditas na literatura.

CONCLUSÃO

Pela primeira vez compostos fenólicos foram quantificados e caracterizados em extratos brutos da casca e das sementes de araticum, sendo epicatequina e catequina identificadas como compostos majoritários do extrato da casca e quercetina e ácido clorogênico como os do extrato das sementes. O extrato da casca apresentou maior conteúdo de fenólicos totais, flavonoides e taninos condensados quando comparado ao extrato das sementes. Ambos os extratos apresentaram atividade antioxidante, a qual foi mais expressiva no extrato da casca. O extrato das sementes foi mais efetivo na atividade antiproliferativa e apresentou resultados que sugerem sua ação como inibidor mitótico do ciclo celular de células de glioma. Quanto à cicatrização, o extrato das sementes demonstrou ser um aliado na migração de queratinócitos humanos, ao passo que o extrato da casca inibiu este processo. O extrato da casca não apresentou potencial como cicatrizante por meio do processo de migração, porém seu uso na medicina popular pode estar relacionado a outros mecanismos, como por exemplo, uma possível ação desbridante. A atividade antioxidante está relacionada com o processo cicatricial e com a prevenção da carcinogênese. A cicatrização e o câncer apresentam muitos fatores em comum, como a modulação por citocinas, como o TNF- α , a estimulação da produção de novos vasos sanguíneos, a influência de células inflamatórias, o aumento da produção de radicais livres dentre outros. Por ambos apresentarem mecanismos semelhantes e serem influenciados por substâncias antioxidantes foram escolhidos como alvos de investigação deste estudo. Os resultados inéditos obtidos neste trabalho podem ser futuramente empregados na indústria alimentícia e farmacêutica. Os extratos possuem propriedades funcionais e poderiam ser incorporados na formulação de alimentos processados ou em suplementos. Na indústria farmacêutica os extratos poderiam ser incorporados em pomadas e géis para o uso externo ou formulados como cápsulas e demais medicamentos cicatrizantes e adjuvantes no tratamento do câncer. Para confirmar as atividades descritas neste trabalho e abrir caminho para novas descobertas podem ser realizados ensaios *in vitro* com foco no mecanismo da inflamação, migração de células tumorais e mecanismos de apoptose, e ensaios *in vivo*, com modelos animais de cicatrização e carcinogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. L. B.; FREITAS, W. E. S.; MORAIS, P. L. D.; SARMENTO, J. D. A.; ALVES, R. E. Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. **Food Chemistry**, vol. 192, p. 1078-1082, 2016.

AMBIGA, S.; NARAYANAN, R.; GOWRI, D.; SUKUMAR, D. & MADHAVAN, S. Evaluation of wound healing activity of flavonoids from *Ipomoea carnea* Jacq. **Ancient Science of Life**, vol. 26, p. 45-51, 2007

ANDROUTSOPOULOS, V. & SPANDIDOS, D. Anticancer pyridines induce G2/M arrest and apoptosis via p53 and JNK upregulation in liver and breast cancer cells. **Oncology Reports**, vol. 39, p. 519-524, 2018.

ARAGONA, M.; DEKONINCK, S. RULANDS, S.; LENGLEZ, S.; MASCRÉ, G.; SIMONS, B. D. & BLANPAIN, C. Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis. **Nature Communications**, doi: 10.1038/ncomms14684, 2017.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C. & ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 120, p. 72-80, 2008.

ARRUDA, H. S. **Avaliação da atividade antioxidante e da presença de oligossacarídeos na polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.)**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2015

ARRUDA, H. S.; BOTREL, D. A.; FERNANDES, R.V.B.; ALMEIDA, M.E.F. Development and sensory evaluation of products containing the Brazilian Savannah fruits araticum (*Annona crassiflora* Mart.) and cagaita (*Eugenia dysenterica* Mart.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19 <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.10515>, 2016.

ARRUDA, H. S.; FERNANDES, R. V. B.; BOTREL, D. A.; ALMEIDA, M. E. F. Cerrado fruits: knowledge and acceptance of *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) and *Eugenia dysenterica* Mart. (Cagaita) for children using the senses of taste and vision. **Journal of Health and Biological Sciences**, vol. 3, p. 224-230, 2015

ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; MORAIS, D. R.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, vol. 245, p. 738-749, 2018.

ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Oligosaccharide profile in Brazilian Cerrado fruit araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **Food Science and Technology**, vol. 76, p. 278-283, 2017.

ARRUDA, H.S.; PEREIRA, G.A.; PASTORE, G.M. Optimization of extraction parameters of total phenolics from *Annona crassiflora* Mat. (Araticum) fruits using response surface methodology. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 100-110, 2017b

ARUL, D. & SUBRAMANIAN, P. Naringenin (*Citrus flavone*) induces growth inhibition cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. **Pathology & Oncology Research**, vol. 19, p. 763-770, 2013.

AYOUB, M.; CAMARGO, A. C. & SHAHIDI, F. Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. **Food Chemistry**, vol. 197, p. 221-232, 2016.

BAILÃO, E. F. L. C.; DEVILLA, I. A.; CONCEIÇÃO, E. C. & BORGES, L. L. Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 16, p. 23760-83, 2015.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M. & CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol 41, p. 27-51. 2005.

BARCELOS, R. C.; PASTRE, J. C.; CAIXETA, V.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; CARVALHO, J. E. & PILLI, R. A. Synthesis of methoxylated goniothalamine, azagoniothalamine and γ -pyrones and their *in vitro* evaluation against human cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 20, p. 3635-3651, 2012.

BARROSO, J. E. M.; XIMENES, F. H. B.; LEITE, C. R.; MUSTAFA, V. S.; BORGES, J. R. J.; CASTRO, M. B. & GODOY, R. F. Comparação entre os efeitos de diferentes tratamentos na cicatrização de pele por segunda intenção em ovinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, vol. 4, p. 298-302, 2010.

BATAGLION, G. A.; SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N. & KOOLEN, H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC- MS/MS. **Food Chemistry**, vol. 180, p. 280-287, 2015.

BECKER, M. S.; MULLER, P. M.; BAJORAT, J.; SCHROEDER, A.; GIAISI, M.; AMIN, E.; AHMADIAN, M. R.; ROCKS, O.; KOHLER, R.; KRAMMER, P. H. & LIWEBER, M. The anticancer phytochemical rocaglamide inhibits Rho GTPase activity and cancer cell migration. **Oncotarget**, doi: 10.18632/oncotarget.10188, 2016.

BOATENG, J. & CATANZANO, O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing – a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 104, p. 3653-3680, 2015.

BROADHURST, R. B. & JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science Food and Agriculture**, vol. 29, p. 788-794, 1978.

BURLANDO, B.; RANZATO, E.; VOLANTE, A.; APPENDINO, G.; POLLASTRO, F. & VEROTTA, L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratynocyte wound healing by different lichen compounds. **Planta Medica**, vol. 75, p. 607-613, 2009.

CAI, Y.; ZHANG, J.; CHEN, N. G.; SHI, Z.; QIU, J.; HE, C. & CHEN, M. Recent advances in anticancer activities and drug delivery systems of tannins. **Medicinal Research Reviews**, vol. 37, nº 4, p. 665-701, 2017.

CARDOSO, L. M. **Araticum, cagaita, jatobá, mangaba e pequi do cerrado de Minas Gerais: ocorrência e conteúdo de carotenoides e vitaminas**. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição), Universidade Federal de Viçosa. 2011.

CHAHAR, M. K.; SHARMA, N.; DOBHAL, M. P. & JOSHI, Y. C. Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs. **Pharmacognosy Reviews**, vol. 5, nº 9, p. 1-12, 2011.

CHANDIKA, P.; KO, S-C. & JUNG, W-K. Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 77, p. 24-35, 2015.

CHEN, C.; WANG, L.; WANG, R.; LUO, X.; LI, Y.; LI, J.; LI, Y. & CHEN, Z. Phenolic contents, cellular antioxidant activity and antiproliferative capacity of different varieties of oats. **Food Chemistry**, vol. 239, p. 260-267, 2018.

DRAGANO, N. R. V.; VENANCIO, V. P.; PAULA, F. B. A.; LUCIA, F. D.; FONSECA, M. J. O. & AZEVEDO, L. Influence of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress *in vivo*. **Plant Foods for Human Nutrition**, vol. 65, p. 319-325, 2010.

FARAHPOUR, M. R.; DILMAGHANIAN, A.; FARIDY, M. & KARASHI, E. Topical *Moltkia coerulea* hydroethanolic extract accelerates the repair of excision wound in a rat model. **Chinese Journal of Traumatology**, vol. 19, p. 97-103, 2016.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, R. O.; BINGEL, A. S., SOEJARTO, D. D. & GUO, Z. Medinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, vol. 63, n° 6, p. 965-981, 1985.

FATTAHI, M. & RAHIMI, R. Optimization of extraction parameters of phenolic antioxidants from leaves of *Capparis spinosa* using response surface methodology. **Food Analytical Methods**, vol. 9, n° 8, p. 2321-2334, 2016.

FORMAGIO, A. S. N.; RAMOS, D. D.; VIEIRA, M. C.; RAMALHO, S. R.; SILVA, M. M.; ZÁRATE, N. A. H.; FOGLIO, M. A. & CARVALHO, J. E. Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 75, p. 69-76, 2015.

FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. C.; VOLOBUFF, C. R. F.; SILVA, M. S.; MATOS, A. I.; CARDOSO, C. A. L.; FOGLIO, M. A. & CARVALHO, J. E. *In vitro* biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 48, p. 308-315, 2015b.

FOX, L. T.; MAZUMDER, A.; DWIVEDI, A.; GERBER, M.; PLESSIS, J. & HAMMAN, H. *In vitro* wound healing and cytotoxic activity of the gel and whole-leaf materials from selected aloe species. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 200, p. 1-7, 2017.

FUMAGALLI, M.; SANGIOVANNI, E.; VRHOVSEK, U.; PIAZZA, S.; COLOMBO, E.; GASPEROTTI, M.; MATTIVI, F.; DE FABIANI, E. & DELL'AGLI, M. Strawberry tannins inhibit IL-8 secretion in a cell model of gastric inflammation. **Pharmacological Research**, vol 111, p. 703-712, 2016.

GE, WENJIE; ZHAO, K.; WANG, X.; LI, H.; YU, M; HE, M.; XUE, X.; ZHU, Y; ZHANG, C. CHENG, Y.; JIANG, S. & HU, Y. iASPP is an antioxidative factor and drives cancer growth and drug resistance by competing with Nrf2 for keap1 binding. **Cancer Cell**, vol. 32, p. 561-573, 2017.

GEORGE, V. C.; DELLAIRES, G. & RUPASINGHE, H. P. V. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 45, p. 1-14, 2017.

GHITESCU, P-E.; VOLF, I.; CARAUSU, C.; BUHLMANN, N-M.; GILCA, I. A. & POPA, V. I. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol. 22, p. 535-541.

GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; MA, H.; EDMONDS, M. E. & SEERAM, N. P. Maple poluphenols, hinnalins A-C, induce s- and G2/M-cell cycle arrest in colon and breast cancer cells mediated by decreasing cyclinds A and D1 levels. **Food Chemistry**, vol. 136, p. 636-642, 2013.

GOPALAKRISHNAN, A.; RAM, M.; KUMAWAT, S.; TADAN, S. & KUMAR, D. Quercetin accelerated cutaneous wound healing in rats by increasing levels of VEGF and TGF- β 1. **Indian Journal of Experimental Biology**, vol. 54, n° 3, p. 187-195, 2016.

GUPTA, A.; KUMAR, R.; PAL, K.; BANERJEE, P. K. & SAWHNEY, R. C. A preclinical study of the effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf extract on cutaneous wound healing. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, vol. 4, p. 88-92, 2005.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva)– www.inca.gov.br. Acesso em 23/11/2017 e em 12/03/2018.

ITOH, A.; ISODA, K.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; WATARI, A.; KOBAYASHI, M.; TAMESADA, M. & YAGI, K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl4-induced liver injury. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 33, n° 6, p. 983-987, 2010.

IWAMOTO, L. H.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; MONTEIRO, P. A.; RUIZ, A. L. T. G.; SOUZA, I. M. O. FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. & RODRIGUES, R. A. F. Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, ID 948737, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/948737>.

JEONG, J.; AN, J. Y.; KWON, Y. T.; RHEE, J. G. & LEE, Y. J. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 106, n° 1, p. 73-82, 2009.

JONKMAN, J. E. N.; CATHCART, J. A.; XU, F.; BARTOLINI, M. E.; AMON, J. E.; STEVENS, K. M. & COLARUSSO, P. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion & Migration**, vol. 8, n. 5, p. 440-451, 2014.

JORGE, M. P.; MADJAROF, C. ; RUIZ, A. L. T. G.; FERNANDES, A. T.; RODRIGUES, R. A. F.; SOUZA, I. M. O.; FOGLIO, M. A. & CARVALHO, J. E. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 118, p. 361-366, 2008.

JUTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; PEIXOTO, L. G.; VILELA, D. D.; CAIXETA, D. C.; SOUZA, A. V.; TEIXEIRA, R. R.; SILVA, H. C. G.; MOURA, F. B. R.; MORAES, I. B.; ESPINDOLA, F. S. Hepatoprotective properties of a polyphenol-enriched fraction from *Annona crassiflora* Mart. fruit peel against diabetes-induced oxidative and nitrosative stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 4428-4438, 2017.

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; MIRANDA, N. C.; SILVA, N. M.; SOUSA, R. M. F.; OLIVEIRA, A.; ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidante compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 167-182, 2016.

KANDHARE, A. D.; ALAM, J.; PATIL, M. V. K.; SINHA, A.; BODHANKAR, S. L. Wound healing potential of naringin ointment formulation via regulating the expression of inflammatory, apoptotic and growth mediators in experimental rats. **Pharmaceutical Biology**, vol. 54, n° 3, p. 419-432, 2015.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A. & ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, vol. 18, p. 2328-2375, 2013.

KOGA, A. Y.; PEREIRA, A. V.; LIPINSKI, L. C. & OLIVEIRA, M. R. Evaluation of wound healing effect of alginate films containing Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. **Journal of Biomaterials Applications**, doi: 10.1177/0885328218754615, 2018.

KÖKSAL, E.; TOHMA, H.; KILIÇ, Ö.; ALAN, Y.; ARAS, A.; GÜLÇİN, I. & BURSAL, E. Assessment of antimicrobial and antioxidant activities of *Nepeta trachonitica*: analysis of its phenolic compounds using HPLC-MS/MS. **Scientia Pharmaceutica**, vol. 85, n° 24, doi: 10.3390/scipharm85010024, 2017.

KOZLOWSKA, A. & SZOSTAK-WEGIEREK, D. Flavonoids - food sources and health benefits. **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny Journal**, vol 65, n° 2, p. 79-85, 2014.

KRISHNAIAH, D.; DEVI, T.; BONO, A. & SABARTLY, R. Studies on phytochemical constituents of six malaysian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, vol. 3, p. 67-72, 2009.

LIANG CC.; PARK AY. & GUAN JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, vol. 2, p. 329-333, 2007.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, 134, p. 3479S-3485S, 2004.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, vol. 46, 207-219, 2007.

LONGATO, G. B.; FIORITO, G. F.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; SOUZA, I. M. O.; TINTI, S. V.; RUIZ, A. L. T. G.; ALMEIDA, S. M. V.; PADILHA, R. J. R.; FOGLIO, M. A. & CARVALHO, J. E. Different cell death responses induced by eupomatenoid-5 in MCF-7 and 786-0 tumor cell lines. **Toxicology In Vitro**, vol. 29, p. 1026-1033, 2015.

LU, Y.; CHEN, J.; XIAO, M.; LI, W. & MILLER, D. D. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. **Pharmaceutical Research**, vol. 29, p. 2943-2971, 2012.

LUZIA, D. M. M. & JORGE, N. Bioactive substance contents and antioxidante capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Industrial Crops and Products**, vol. 42, p. 231-235, 2013.

MACHADO, A. R. T.; FERREIRA, S. R.; MEDEIROS, F. S.; FUJIWARA, R. T.; SOUZA FILHO, J. D. & PIMENTA, L. P. S. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditiselegans*. **Paras Vectors**, vol. 19, 8:113. doi: 10.1186/s13071-015-0708-6, 2015.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S. & LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidante properties. **Analytica chimica acta**, vol. 613, p. 1-19, 2008.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P. & MANDELBAUM, M. H. S. A. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources – Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, vol. 78, p. 393-410, 2003.

MAYO, T.; CONGET, P.; BECERRA-BAYONA, S.; SOSSA, C. L.; GALVIS, V. & ARANGO-RODRÍGUEZ, M. L. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. **PLoS One**, vol. 12, n° 6, 2017.

MELLADO-ORTEGA, E.; ZABALGOGEAZCOA, I.; ALDANA, B. R. V. & ARELLANO, J. B. Solutions to decrease a systematic error related to AAPH addition in the fluorescence-based ORAC assay. **Analytical Biochemistry**, vol. 519, p. 27-29, 2017.

MENSAH, A. Y.; SAMPSON J.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J.; WESTBROOK, J.; DUNN, M.; HUGHES, M. A. & CHERRY, G. W. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 77, p. 219-226, 2001.

MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F. & ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 123, p. 439-445, 2009.

MESQUITA, M. L., DESRIVOT, J., BORIES, C., FOURNET, A., PAULA, J. E., GRELLIER, P. & ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and Trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 100, p. 183-187, 2005.

MNARI, A. B.; HARZALLAH, A.; AMRI, Z.; AGUIR, S. D. & HAMMAMI, M. Phytochemical content, antioxidant properties, and phenolic profile of Tunisian raisin varieties (*Vitis vinifera* L.). **International Journal of Food Properties**, vol. 19, p. 578-590, 2016.

MOGHADAM, S. R.; EBRAHIMI, S. N.; SALEHI, P.; FARIMANI, M. M.; HAMBURGER, M. & JABBARZADEH, E. Wound healing potential of chlorogenic acid and myricetin-3-O- β -rhamnoside isolated from *Parrotia persica*. **Molecules**, vol. 22, 1501 doi:10.3390/molecules22091501.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J. & BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 83, 757-766, 1991.

MONSUUR, H. N.; BOINK, M.A.; WEIJERS, E.M.; ROFFEL, S.; BREETVELD, M.; GEFEN, A.; BROEK, L.J.; GIBBS, S. Methods to study differences in cell mobility during skin wound healing *in vitro*. **Journal of Biomechanics**, v. 49, p. 1381-1387, 2016.

MORAIS, E. C.; PATIAS, S. G. O.; FERREIRA, N. S. S.; PICAÇO, N. F. M.; RODRIGUES, E. C.; NASCIMENTO, E. & FARIA, R. A. P. G. Bioactive compounds and physicochemical characteristics of in natura and pasteurized araticum pulp. **Brazilian Journal of Food Technology**, vol. 20, e2016142, 2017.

NAYAK, B. S.; MARSHALL, J. R. & ISITOR, G. Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. Leaf – A preliminary study. **Indian Journal of Experimental Biology**, vol. 48, p. 572-576, 2010.

NCI (National Cancer Institute) – www.cancer.gov. Acesso em 23/11/2017.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. Natural Products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, vol. 79, p. 629-661, 2016.

OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; FERREIRA DE LIMA, M. R.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Tecnology**, vol. 98, p. 2549-2556, 2007.

OUCHEMOUKH, S.; AMESSIS-OUCHEMOUKH, N.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ABOUD, F.; GIUSEPPE, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. & SEGURA-CARRETERO, A. Characterisation of phenolic compounds in Algerian honeys by RP-HPLC coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. **LWT – Food Science and Technology**, vol. 85, p. 460-469, 2017.

PAIVA, P. P. **Avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória da fração rica em alcaloides fenantroquinolizidínicos de *Boehmeria caudata* Sw.** Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 2016.

PEREIRA, A. C. & SANTOS, E. R. Frutas nativas do Tocantins com potencial de aproveitamento econômico. **AGRI-ENVIRONMENTAL Sciences**, vol. 1, nº 1, p. 22-37, 2015.

PEREIRA, M. N.; JUSTINO, A. B.; MARTINS, M. M.; PEIXOTO, L. G.; VILELA, D. D.; SANTOS, P. S.; TEIXEIRA, T. L. DA SILVA, C. V. GOULART, L. R.; PIVATTO, M. & SPINDOLA, F. S. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity

isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. **Industrial Crops and Products**, vol. 97, p. 324-329, 2017.

PONRASU, T. & SUGUNA, L. Efficacy of *Annona squamosa* L in the synthesis of glycosaminoglycans and collagen during wound repair in Streptozotocin induced diabetic rats. **BioMed Research International** doi 10.1155/2014/124352, 2014.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B. & JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 51, p. 3273-3279, 2003.

POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; KOLLAR, V.; RHODES, C. J. & VALCO, M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol. 38, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>, 2017.

RASIK, A. M. & SHUKLA, A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. **International Journal of Experimental Pathology**, vol. 81, p. 257-263, 2000.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. & RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 26, p. 1231-1237, 1999.

RIBEIRO, L. R.; SANTOS, M. F.; SILVA, Q. M.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. & DAVIDE, L. C. Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Biologia**, vol. 68, n° 3, p. 433-438, 2013.

RODRIGUES, H. G. **Modulação do processo de cicatrização pelos ácidos oleico e linoleico**. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2011.

RODRÍGUEZ-BONILLA, P.; GANDÍA-HERRERO, F.; MANTECIO, A.; GARCÍA-CARMONA, F. & LÓPEZ-NICOLÁS, J. M. Comparative study of the antioxidant capacity of four stilbenes using ORAC, ABTS⁺, and FRAP techniques. **Food Analytical Methods**, vol. 10, p. 2994-3000, 2017.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 31, n° 1, p. 93-100, 2011.

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, p. 1048-1054, 2007.

ROESLER, R.; LORENCINI, M. & PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 30, p. 814-821, 2010.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S. & PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 27, p. 53-60, 2007.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L. C. & PASTORE, G. Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**, vol. 71, p. 102-107, 2006.

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**, vol. 42, nº 3, p. 705-707, 1996.

SANTOS, A. F. & SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, vol. 8, nº 2, p. 115-120, 2001.

SANTOS, G. L.; PEREIRA, M. G.; DELGADO, R. C.; TORRES, J. L. R. Natural regeneration in anthropogenic environments due to agricultural use in the cerrado, Uberaba, MG, Brazil. **Bioscience Journal**, vol. 33, nº 1, p. 169-176, 2017.

SHETTY, S.; UDUPA, S. & UDUPA, L. Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and aqueous extract of *Ocimum sanctum* Linn in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 5, p. 95-101, 2008.

SILVA, J. J.; CERDEIRA, C. D.; CHAVASCO, J. M.; CINTRA, A. B. P.; SILVA, C. B. P.; MENDONÇA, A. N.; ISHIKAWA, T.; BORIOLLO, M. F. G. & CHAVASCO, J. K. *In vitro* screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. Against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (orsa) from the aerial environment at the dental clinic. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, vol. 56, p. 333-340, 2014.

SINGH, B.; SINGH, J. P.; KAUR, A. & SINGH, N. Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – a review. **Food Chemistry**, vol. 206, p. 1-11, 2016.

SONG, Y.; ZENG, R.; HU, L.; MAFFUCCI, K. G.; REN, X. & QU, Y. *In vivo* wound healing and *in vitro* antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 92, p. 451-461, 2017.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V. & CARNEIRO, J. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, vol. 134, p. 381-386, 2012.

SUDAN, S. & RUPASINGHE, H. P. V. Quercetin-3-*O*-glucoside induces human DNA topoisomerase II inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. **Anticancer Research**, vol. 34, p. 1691-1699, 2014.

SUVANTO, J.; NOHYNEK, L.; SEPPANEN-LAAKSO, T.; RISCHER, H.; SALMIEN, J. & PUUPPONEN-PIMIA, R. Variability in the production of tannins and other polyphenols in cell cultures of 12 Nordic plant species. **Planta**, vol. 246, p. 227-241, 2017.

SWAIN, T. & HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of Science and Food Agriculture**, vol. 10, p. 63-68, 1959.

TAKAGI, N.; KAWAKAMI, K.; KANNO, E.; TANNO, H.; TAKEDA, A.; ISHII, K.; IMAI, Y.; IWAKURA, Y. & TACHI, M. IL-17A promotes neutrophilic inflammation and disturbs acute wound healing in skin. **Experimental Dermatology**, vol 26, p. 137-144, 2017.

TOHMA, H.; GÜLÇİN, I.; BURSAL, E.; GÖREN, A. C.; ALWASEL, S. H. & KÖKSAL, E. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. **Food Measure**, vol. 11, p. 556-566, 2017.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R.; PALAFOX-CARLOS, H.; WALL-MEDRANO, A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; CHEN, C. Y.; ROBLES-SÁNCHEZ, M.; ASTIAZARAN-GARCÍA, H.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food & Function**, vol. 5, nº 2, p. 189-197, 2014.

VENDRAMINI-COSTA, D. B. & CARVALHO, J. E. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 18, p. 3831-3852, 2012.

VENDRAMINI-COSTA, D. B.; ALCAIDE, A.; PELIZZARO-ROCHA, K. J.; TALERO, E.; ÁVILA-ROMÁN, J.; GARCIA-MAURIÑO, S.; PILLI, R. A.; CARVALHO, J. E. & MOTILVA, V. Goniothalamine prevents the development of chemically induced and

spontaneous colitis in rodents and induces apoptosis in the HT-29 human colon tumor cell lines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 300, p. 1-12, 2016.

VENDRAMINI-COSTA, D. B.; FRANCESCONI, R.; POSOCCO, D.; HOU, V.; DMITRIEVA, O.; HENSLEY, H.; CAVALHO, J. E.; PILLI, R. A. & GRIVENNIKOV, S. Anti-inflammatory natural product goniotalamin reduces colitis-associated and sporadic colorectal tumorigenesis. **Carcinogenesis**, vol. 38, n° 1, p. 51-63, 2017.

VILAR, J. B.; FERREIRA, F. L.; FERRI, P. H.; GUILLO, L. A. & CHEN CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 68, p. 141-147, 2008.

WALSBY, E. J.; COLES, S. J.; KNAPPER, S. & BURNETT, A. K. The topoisomerase II inhibitor voreloxin causes cell cycle arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with cytarabine. **Haematologica**, vol. 96, n° 3, p. 393-399, 2011.

WALTER, M. N. M.; WRIGHT, K. T.; FULLER, H. R.; MACNEIL, S. & JOHNSON, W. E. B. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an *in vitro* study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Experimental Cell Research**, vol. 316, p. 1271-1281, 2010.

YAN, J.; TIE, G.; WANG, S.; TUTTO, A.; DEMARCO, N.; KHAIR, L.; FAZZIO, T. T. & MESSINA, L. M. Diabetes impairs wound healing by Dnmt1-dependent dysregulation of hematopoietic stem cells differentiation towards macrophages. **Nature Communications**, vol. 9, doi: 10.1038/s41467-017-02425-z, 2018.

YANG, L.; ZHENG, Z.; ZHOU, Q.; BAI, X.; FAN, L.; YANG, C.; SU, L. & HU, D. miR-155 promotes cutaneous wound healing through enhanced keratinocytes migration by MMP-2. **Journal of Molecular Histology**, vol. 48, p. 147-155, 2017.

ZHANG, L.; RAVIPATI, A. S.; KOYYALAMUDI, S. R.; JEONG, S. C.; REDDY, N.; SMITH, P. T.; BARTLETT, J.; SHANMUGAM, K.; MUNCH, G. & WU, M. J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 59, n° 23, p. 12361-12367, 2011.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T. & JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, vol. 64, p. 555-559, 1999.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A6587E1

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A6587E1
Usuário:	UNICAMP
CPF/CNPJ:	46.068.425/0001-33
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

***Annona crassiflora* Mart.**

Título da Atividade:	Avaliação da atividade cicatrizante e anticâncer de araticum (<i>Annona crassiflora</i> Mart.) in vitro.
----------------------	---

Equipe

Livia Garcia Prado	UNICAMP
Henrique Silvano Arruda	UNICAMP
Lucia Elaine de Oliveira Braga	UNICAMP
Thais Petrochelli Banzato	UNICAMP
Nayara Macêdo Peixoto	UNICAMP
Gustavo Araujo Pereira	UNICAMP
Mariana Cecchetto Figueiredo	UNICAMP
Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz	UNICAMP
Marcos Nogueira Eberlin	UNICAMP
João Ernesto de Carvalho	UNICAMP
Glaucia Maria Pastore	UNICAMP

Data do Cadastro:	23/01/2018 16:49:33
Situação do Cadastro:	Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético