

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAOLA DE PAULA

ANÁLISE QUANTITATIVA E SAZONAL DE ALCALOIDES POR LC-MS/MS E
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGEM DE
CARCINOMA CERVICAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE
Annona rugulosa (SCHLTDL.) H. RAINER

CURITIBA

2019

PAOLA DE PAULA

ANÁLISE QUANTITATIVA E SAZONAL DE ALCALOIDES POR LC-MS/MS E
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGEM DE
CARCINOMA CERVICAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE
Annona rugulosa (SCHLTDL.) H. RAINER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr^a Francinete Ramos Campos

CURITIBA

2019

Paula, Paola de

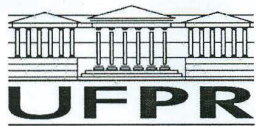
Análise quantitativa e sazonal de alcaloides por LC-MS/MS e determinação da atividade antiproliferativa em linhagem de carcinoma cervical do extrato hidroalcoólico de folhas de *Annonarugulosa* (SCHLTDL.) H. Rainer [recurso eletrônico] / Paola de Paula – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Francinete Ramos Campos

1. Alcaloides. 2. Análise quantitativa. 3. Annonaceae. 4. *Annonarugulosa*.
I. Campos, Francinete Ramos. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 583.115



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **PAOLA DE PAULA** intitulada: **Análise quantitativa e sazonal de alcaloides por LC-MS/MS, e determinação da atividade antiproliferativa em linhagem de carcinoma cervical de extrato hidroalcoólico de folhas de *Annona rugulosa* (Schltdl.) H. Rainer.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 04 de Janeiro de 2019.

FRANCINETE RAMOS CAMPOS

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

FÁBIO SEIGI MURAKAMI

Avaliador Interno (UFPR)

FLAVIA LADA DEGAUT PONTES

Avaliador Interno Pós-Doc (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre me proteger e dar forças, é o maior mestre que alguém pode ter.

A minha orientadora **Professora Dra. Francinete Ramos Campos**, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, por todas as colaborações, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Meu mais sincero obrigada por confiar em mim. Estarei sempre aqui para o que precisar.

A **Professora Dra. Karina Bettega Felipe** pela colaboração nas análises, e por ser um exemplo de profissional e de pessoa. Também a **Mariana Atherino** e **Andressa Santos** pela ajuda e por disponibilizarem seu tempo para as análises.

Aos meus pais, **Cleuza e Rubens**, que permitiram e me deram a oportunidade de estudar e realizar meus sonhos, por estarem sempre ao meu lado mesmo com a distância, e por sempre me incentivarem e darem forças. Tenho orgulho de ser filha de vocês e agradeço todos os dias pela família que tenho. Vocês são os melhores exemplos de força, caráter e amor que alguém poderia ter.

Aos meus irmãos, **Felipe e Paloma** pela preocupação, amor e cumplicidade.

Ao **Gabriel R. Borkoski** pela paciência, carinho e dedicação. Tenho imenso orgulho em dizer que você faz parte da minha vida.

A **Letícia Dalmédico e Thalita de Paula** que sempre me apoiaram e ajudaram quando foi preciso. Obrigada pelas risadas, histórias e principalmente força para continuar.

Agradeço aos meus amigos de LABICEM e UFPR **Allan Vinícius Félix Lourenço, Jane Cristina Marques Lara, Leticia Bonancio Cerqueira, Tatiana Zuccolotto**, por todos os momentos juntos. E agradeço a **Estevan Rafael Dutra Bruginski e Leticia Meier Pereira** em especial por toda a ajuda e parceria, sem vocês não seria possível.

Aos técnicos da Central de Salas, **Maurício e Maria das Graças**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** da UFPR, pela oportunidade e formação.

A todos, o mais sincero muito obrigado!

RESUMO

O gênero *Annona* Linn (Annonaceae) apresenta cerca de 200 espécies encontradas no Brasil. Dentre elas a espécie *Annona rugulosa* (Schltdl.) H. Rainer, conhecida como araticum, e utilizada na medicina popular para o tratamento de dores renais e infecções de garganta. Estudos realizados com esta espécie, identificaram treze alcaloides, sendo oito aporfínicos, dois oxoaporfínicos e três benzilisoquinolínicos. Os alcaloides destas classes apresentam diversos efeitos biológicos tais como, atividade antimicrobiana, antioxidante, citotóxica e antiproliferativa. Devido à escassez de estudos químicos e biológicos referentes a esta espécie, objetivou-se desenvolver um método de quantificação para análise sazonal de alcaloides nas folhas de *A. rugulosa* por cromatografia à líquido de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS), além de avaliar a atividade antiproliferativa do extrato bruto das folhas em células de câncer cervical (Hela). Para isso, foram coletadas amostras de folhas de 5 exemplares desta espécie, localizadas no Capão do Cifloma – UFPR, durante um período de 12 meses. O método de análise sazonal dos alcaloides presentes nas folhas se mostrou eficaz apresentando ótima precisão e exatidão. Não houve diferença significativa das concentrações dos alcaloides nas folhas durante o período de tempo avaliado. A utilização do alcaloide da classe das metil-xantinas como padrão interno (cafeína) foi eficaz para as análises de quantificação dos alcaloides das classes dos aporfínicos, oxoaporfínicos e benzilisoquinolínicos encontrados na espécie, podendo assim substituir os padrões analíticos destes alcaloides nestas análises. Ainda, o extrato bruto apresentou significativo efeito antiproliferativo sendo capaz de potencializar a atividade citotóxica da vincristina, indicando que o mesmo trata-se de um potencial coadjuvante a ser utilizado no tratamento de câncer cervical.

Palavras-chave: Alcaloides. Análise Quantitativa. LC-MS/MS. *A. rugulosa*. Atividade Antiproliferativa.

ABSTRACT

Around 200 species of the genus *Annona* Linn (Annonaceae) are found in Brasil. Among these, the species *Annona rugulosa* (Schltdl.) H. Rainer, known as araticum, is commonly used in folk medicine to treat kidney pain and throat infections. Studies in this species have identified thirteen alkaloids, eight of which are aprocaine, two oxoapocaine and three benzyloquinoline alkaloids. The alkaloids of these classes present several biological effects such as antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and antiproliferative activity. Due to the lack of chemical and biological studies on this species, the objective was to develop a quantification method for seasonal analysis of alkaloids in *A. rugulosa* leaves with the Ultra High Performance Liquid Chromatography - tandem mass Spectrometer (UPLC-MS/MS) in addition the antiproliferative activity of the raw extract was tested on cervical cancer cells (Hela). In order to do this, during twelve months leaves were collected from five individuals of this species, located at the Capão do Cifloma- UFPR. The method of season analysis of the the alkaloids was efficient, and presented high precision and accuracy. The alkaloids' concentration did not present a significant difference during the study. The use of the methyl-xanthine class alkaloid as an internal standard (caffeine) also proved itself sufficient in the quantitative analysis of the aprocaine, oxoapocaine and benzyloquinoline alkaloids found in the species and could thus replace the analytical standards of the alkaloids in these analyzes. In addition, the use of the raw extract has significant antiproliferative consequences and is capable of potentializing the cytotoxic activity of the alkaloid vincristine. Therefore, this raw extract can be used to potentialize the treatment of cervical cancer.

Key words: Alkaloids. Quantitative Analysis. LC-MS/MS. *A. rugulosa*. Antiproliferative activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – FLORES E FOLHAS DE ESPÉCIES DE ANNONACEAE.....	16
FIGURA 2 – FRUTOS, FOLHAS E FLORES DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Annona</i>	17
FIGURA 3 - BIODIVERSIDADE DE ALCALOIDES ISOQUINOLÍNICOS.....	20
FIGURA 4 - CLASSES DE ALCALOIDES DE <i>ANNONA</i> L.....	21
FIGURA 5 – ESTRUTURA VINCRISTINA.....	30
FIGURA 6 – ESQUEMA DE CONTAGEM DE CÉLULAS APÓS 72 h DE TRATAMENTO.....	42
FIGURA 7 – CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DO EXPERIMENTO DE MRM DOS ALCALOIDES EM MISTURA (1500 ng.mL ⁻¹) UTILIZANDO OS PARÂMETROS OTIMIZADOS.....	48
FIGURA 8 – GRÁFICO DE COMPARAÇÃO DOS SOLVENTES EXTRATORES PARA OS ALCALOIDES MINORITARIOS ENCONTRADOS EM <i>Annona rugulosa</i>	50
FIGURA 9 - GRÁFICO DE COMPARAÇÃO DOS SOLVENTES EXTRATORES PARA OS ALCALOIDES MAJORITARIO ENCONTRADOS EM <i>Annona rugulosa</i> E DA CAFEINA ADICIONADO AOS EXTRATOS.....	50
FIGURA 10 LINARIDADE.....	53
FIGURA 11 – EFEITO MATRIZ.....	55
FIGURA 12 – REGISTROS DAS PRINCIPAIS INFORMAÇÕES REFERENTES AS COLETAS.....	57
FIGURA 13 - EXEMPLO DE ESPECTROGRAMA DAS ANÁLISES QUANTITATIVAS.....	58
FIGURA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE COLETAS PARA CADA ALCALOIDE UTILIZANDO <i>ONE-WAY</i> ANOVA.....	60
FIGURA 15 - GRÁFICO DE <i>SCORES</i> E <i>LOADINGS</i> DOS EXTRATOS DE <i>Annona rugulosa</i> NAS 12 COLETAS REPRESENTADO EM PC1XPC2.....	62
FIGURA 16 - EFEITO CITOTÓXICO E/OU ANTIPROLIFERATIVO DO EXTRATO BRUTO (EB) (50 – 25000 ng.mL ⁻¹) DE <i>ANNONA RUGULOSA</i> SOBRE CÉLULAS HELA APÓS 72 H DE TRATAMENTO DE ACORDO COM O ENSAIO DE MTT (A) E VN (B).	67

FIGURA 17 - EFEITO CITOTÓXICO E/OU ANTIPROLIFERATIVO DO EXTRATO BRUTO (EB) (50 – 25000 ng.mL ⁻¹) DE <i>Annona rugulosa</i> SOBRE CÉLULAS NIH-3T3 APÓS 72 H DE TRATAMENTO DE ACORDO COM O ENSAIO DE MTT.....	68
FIGURA 18 - EFEITO ANTICLONOGÊNICO DO EXTRATO BRUTO (EB) OBTIDO DE <i>ANNONA RUGULOSA</i> . CÉLULAS HELA FORAM CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> E TRATADAS POR 72 H COM EB (150 – 750 ng.mL ⁻¹).	69
FIGURA 19 - EFEITO ANTICLONOGÊNICO DO EXTRATO BRUTO (EB) OBTIDO DE <i>ANNONA RUGULOSA</i> FRENTE A CÉLULAS NIH/3T3 CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> E TRATADAS POR 72 H COM EB (300 E 600 ng.mL ⁻¹).	70
FIGURA 20 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO (EB) OBTIDO DE <i>Annona rugulosa</i> SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS DAS LINHAGENS HELA. NOS DIAS 0, 2 E 4 APÓS A RETIRADA DO TRATAMENTO.....	71
FIGURA 21 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO (EB) DE <i>Annona rugulosa</i> SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS DAS LINHAGENS HELA.	72
FIGURA 22 - EFEITO CITOTÓXICO E/OU ANTIPROLIFERATIVO DA VINCRISTINA (VC -0,80 – 20,62 ng.mL ⁻¹) ADMINISTRADA ISOLADAMENTE EM ASSOCIAÇÃO AO EXTRATO BRUTO (EB -150, 300 E 450 ng.mL ⁻¹) SOBRE CÉLULAS HELA APÓS 72 H DE TRATAMENTO DE ACORDO COM O ENSAIO DE MTT (A, C, E) E VN (B, D, F).....	76
FIGURA 23 - EFEITO ANTICLONOGÊNICO DA VINCRISTINA (VC-8,25 NG.ML ⁻¹), EXTRATO BRUTO (EB 300 E 450 NG.ML ⁻¹) E DA ASSOCIAÇÃO VC (8,25 NG.ML ⁻¹) + EB (450 NG.ML ⁻¹).	77
FIGURA 24 - EFEITO DA VINCRISTINA (VC-8,25 NG.ML ⁻¹), EXTRATO BRUTO (EB 450 NG.ML ⁻¹) E DA ASSOCIAÇÃO VC (8,25 NG.ML ⁻¹) + EB (450 NG.ML ⁻¹) SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS DAS LINHAGENS HELA NOS DIAS 0, 2 E 4 APÓS A RETIRADA DO TRATAMENTO	78
FIGURA 25 - EFEITO DA VINCRISTINA (VC-8,25 ng.mL ⁻¹), EXTRATO BRUTO (EB 450 ng.mL ⁻¹) E DA ASSOCIAÇÃO VC (8,25 ng.mL ⁻¹) + EB (450 ng.mL ⁻¹) SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS DAS LINHAGENS HELA. 80	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PRINCIPAIS CLASSES DE ALCALOIDES EM <i>A. rugulosa</i> E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	21
TABELA 2 - ANÁLISE QUANTITATIVA DE ALCALOIDES UTILIZANDO UPLC-MS24	
TABELA 3 – ALCALÓIDES COM ATIVIDADE ANTINEOPLASICA.....	28
TABELA 4 - COORDENADAS DOS EXEMPLARES COLETADOS DE <i>A. rugulosa</i>	33
TABELA 5 - QUANTIDADES DE DROGA VEGETAL E SOLVENTES UTILIZADOS NO PREPARO DOS EXTRATOS.	34
TABELA 6 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DEPENDENTES DE VOLTAGEM DO ESPECTROMETRO DE MASSAS.	44
TABELA 7 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DOS ALCALOIDES DE <i>A. rugulosa</i>	44
TABELA 8 - PARAMETROS UTILIZADOS NO MÉTODO DE MRM.....	45
TABELA 9 - TEMPO DE RETENÇÃO E DWELL TIME DE CADA PADRÃO DE ALCALOIDE	47
TABELA 10 - PARÂMETROS ENCONTRADOS PARA ANONAINA, XILOPINA E NORNANTENINA.....	51
TABELA 11 – PRECISÃO E EXATIDÃO DIA 1	53
TABELA 12 – PRECISÃO E EXATIDÃO DIA 2.....	53
TABELA 13 – DESVIO PADRÃO DO ENSAIO DE LINEARIDADE	54
TABELA 14 – IDENTIFICAÇÃO DO PERÍODO DE MAIOR PRODUÇÃO DE ALCALOIDES ENCONTRADOS NOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>A. rugulosa</i>	58
TABELA 15 - VALORES DE P OBTIDOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS COLETAS PARA CADA ALCALOIDE ATRAVÉS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (<i>ONE-WAY ANOVA</i>).....	61
TABELA 16 - PADRÕES CLIMÁTICOS NORMAIS DO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 1961-1990.....	64
TABELA 17 - DADOS MÉDIOS DE PRECIPITAÇÃO E TEMPERATURA ENTRE NOVEMBRO DE 2016 E OUTUBRO DE 2017.	65
TABELA 18 - VALORES DE CI_{50} DETERMINADOS PARA EXTRATO BRUTO (EB) EM CÉLULAS HELA TRATADAS POR 24, 48 E 72 HORAS	66

TABELA19 - VALORES DE CI_{50} DETERMINADOS PARA EXTRATO BRUTO (EB),
VINCRISTINA (VC) E PARA VC ASSOCIADA AO EB (150, 300 E 450
 $ng.mL^{-1}$) EM CÉLULAS HELA TRATADAS POR 72 HORAS.....75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>m/z</i>	- Relação massa/carga
Da	- Dalton
ESI	- do inglês, <i>Electrospray Ionization</i>
MS/MS	- do inglês, <i>Tandem Mass Spectrometry</i>
HPLC	- do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
GC-MS	- do inglês, <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>
UHPLC-MS	- do inglês, <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>
LC-MS	- do inglês, <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	- do inglês, <i>Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA	15
2.1	FAMÍLIA ANNONACEAE	15
2.2	GÊNERO <i>Annona</i> Linn	16
2.3	<i>Annona rugulosa</i> (SCHLTDL.) H. RAINER	18
2.4	CLASSES DE ALCALOIDES PRESENTES NO GÊNERO <i>Annona</i> L.	18
2.5	EFEITO DA SAZONALIDADE NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	22
2.6	QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES POR LC-MS.	23
2.7	ATIVIDADE CITOTÓXICA E/OU ANTIPROLIFERATIVA DE ALCALOIDES	26
2.7.1	ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER	26
2.7.1	TRATAMENTO DO CÂNCER	27
2.7.2	ALCALOIDES COMO AGENTES ANTINEOPLASICOS	27
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAL E MÉTODO	32
4.1	PADRÕES E REAGENTES	32
4.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ALCALOIDES	32
4.3	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS VEGETAIS	32
4.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA O PREPARO DOS EXTRATOS	33
4.5	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	34
4.5.1	INJEÇÃO DIRETA	34
4.5.2	OTIMIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA	35
4.6	ANÁLISE DE SAZONALIDADE	36
4.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUANTITATIVO	36
4.7.1	LINEARIDADE	37

4.7.2	LIMITE DE DETECÇÃO.....	37
4.7.3	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	37
4.7.4	PRECISÃO.....	37
4.7.5	EXATIDÃO	38
4.7.6	EFEITO MATRIZ.....	38
4.8	ANÁLISES QUANTITATIVAS	38
4.9	ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO BRUTO DE <i>A. rugulosa</i>	39
4.9.1	AMOSTRA UTILIZADA	39
4.9.2	CULTIVO DE CÉLULAS	39
4.9.1	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO SAL DE TETRAZOLIUM (MTT)	39
4.9.2	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO VERMELHO NEUTRO (VN).....	40
4.9.3	ENSAIO DE CONTAGEM DE CÉLULAS.....	41
4.9.4	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS – ENSAIO CLONOGÊNICO	42
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS/ANÁLISE DOS DADOS	44
5.1	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS E PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DOS ALCALOIDES	44
5.2	OTIMIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA	45
5.3	ESCOLHA DA MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO.....	48
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUANTITATIVO	51
5.4.1	LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	52
5.4.2	PRECISÃO E EXATIDÃO	52
5.4.3	LINEARIDADE E EFEITO MATRIZ.....	53
5.5	ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES	55
5.6	ANÁLISE QUANTITATIVA E CORRELAÇÃO COM A SAZONALIDADE	

5.7	ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>Annona rugulosa</i>	66
5.7.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE <i>Annona rugulosa</i> FRENTE AO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO SAL DE TETRAZOLIUM (MTT) E VERMELHO NEUTRO (VN)	66
5.7.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE <i>Annona rugulosa</i> FRENTE AO ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS – CLONOGÊNICO	68
5.7.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE <i>Annona rugulosa</i> FRENTE AO ENSAIO DE CONTAGEM CELULAR	71
5.7.4	AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DE CÉLULAS HELA FRENTE AO TRATAMENTO COM EXTRATO BRUTO (EB) DE <i>Annona rugulosa</i>	72
5.7.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE <i>Annona rugulosa</i> ASSOCIADO A VINCRISTINA FRENTE AO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO SAL DE TETRAZOLIUM (MTT) E VERMELHO NEUTRO (VN).....	75
5.7.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE <i>Annona rugulosa</i> ASSOCIADO A VINCRISTINA FRENTE AO ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (CLONOGÊNICO).....	77
5.7.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE <i>Annona rugulosa</i> ASSOCIADO A VINCRISTINA FRENTE AO ENSAIO DE CONTAGEM CELULAR.....	78
5.7.8	AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DE CÉLULAS HELA FRENTE AO TRATAMENTO COM EXTRATO BRUTO (EB) DE <i>Annona rugulosa</i> ASSOCIADO A VINCRISTINA.....	79
6	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	82
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A família Annonaceae Juss compreende cerca de 3000 espécies distribuídas em 160 gêneros. (ALMEIDA et al., 2012; LEBOEUF et al., 1980; RABELO et al., 2014), sendo que no Brasil, segundo o projeto Flora do Brasil 2020, são encontrados 29 gêneros e 386 espécies aproximadamente.

Esta família apresenta grande importância econômica devido a comercialização dos seus frutos “*in natura*”, uso na indústria madeireira e alimentícia, onde é utilizada como matéria-prima para fabricação de sucos, geleias e sorvetes. (JOSÉ et al., 2014; LEBOEUF et al., 1980). Além disso, muitas espécies são usadas na medicina popular para o tratamento de úlceras, dor de estômago, diarreia, infecções renais e infecções de garganta. (BRITO et al., 2008; RABELO et al., 2014; VEGA et al., 2007). Dentro dessa família encontra-se o gênero *Annona* Linn, no qual estão inseridas espécies como *Annona squamosa* L. (fruta-do-conde), *Annona muricata* L. (graviola), *Annona reticulata* L. (condessa), *Annona cherimola* Mill. (*cherimóia*) e *Annona rugulosa* (Schltdl.) H. Rainer (araticum).

Na literatura já são descritas atividades biológicas atribuídas a estas espécies, como a atividade antitumoral (BOSCOLO; DE SENNA VALLE, 2008; SOMKID et al., 2015), anti-inflamatória (DE SOUSA et al., 2010), antimalárica (BOSCOLO; DE SENNA VALLE, 2008), antibacteriano pela *A. muricata* L. (VIERA et al., 2010), atividade antioxidante exibida por *A. cherimola* Mill. (BARRECA et al., 2011), atividade antioxidante da *A. crassiflora* Mart. (ROESLER; LORENCINI; PASTORE, 2010), além das espécies *A. crassiflora* Mart., *A. glabra* L. e *A. squamosa* L. que possuem atividade contra larvas de *Aedes aegypti* (DE OMENA et al., 2007).

A espécie *Annona rugulosa* também está inserida no gênero *Annona* L., sendo esta espécie relatada apenas uma vez na literatura, em estudo realizado com o extrato das suas folhas. Neste estudo foram identificados 15 metabólitos sendo eles dois esteroides (β -sitosterol e estigmasterol) e 13 alcaloides dentre os quais oito são aporfínicos (anonaina, nornantenina, nornuciferina, xilopina, norisocoridina, litseferina, asimilobina e isoboldina), dois oxoaporfínicos (lauginosina e liriodenina) e três benzilisoquinolínicos (magnococlina, reticulina e N-metilcoclaurina). (VENDRAMIN et al., 2013). Esta espécie, assim como as demais inseridas no gênero são produtoras destes e outros metabólitos secundários, aos quais podem ser atribuídas suas atividades biológicas. Desta forma, torna-se necessário investigar a concentração

destes na composição química da planta a qual pode variar ou não devido a influência de fatores edafoclimáticos e sazonalidade.

Além disso, também são encontrados estudos relacionando as classes de alcaloides encontradas na espécie *A. rugulosa* com diversas atividades biológicas, como a atividade antimicrobiana e anti-leishmania de alcaloides benzilisoquinolínicos (COSTA et al., 2013; VILA-NOVA et al., 2011), atividade vasodilatadora; antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antidepressiva, citotóxica e antiparasitária de alcaloides aporfínicos (CHEN et al., 2008; COSTA et al., 2013; LI et al., 2013; MOGHADAMTOUSI et al., 2015), e atividade antiagregante plaquetária, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária de alcaloides oxoaporfínicos. (COSTA et al., 2011; DA SILVA et al., 2007; WU et al., 1993). Apesar de identificados alcaloides destas classes nas folhas de *Annona rugulosa*, a espécie ainda não apresenta estudos referentes a atividade biológica e a sua relação com a composição química.

Estes dados justificam a importância da contínua investigação química e farmacológica desta espécie, visto que esta apresenta grande potencial biológico, devido a sua constituição química.

Com base nisto, um estudo de quantificação destes alcaloides torna-se importante e com a obtenção destes dados é possível realizar um estudo de sazonalidade para avaliar a influência da mesma sob a composição química da planta, além de auxiliar outros pesquisadores que queiram sintetizar ou modificar estes compostos que apresentam diversas atividades importantes.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da sazonalidade na produção dos alcaloides desenvolvendo um método de quantificação por LC-MS/MS, assim como buscar possíveis atividades biológicas como a atividade antiproliferativa do extrato bruto elaborado a partir das folhas desta espécie.

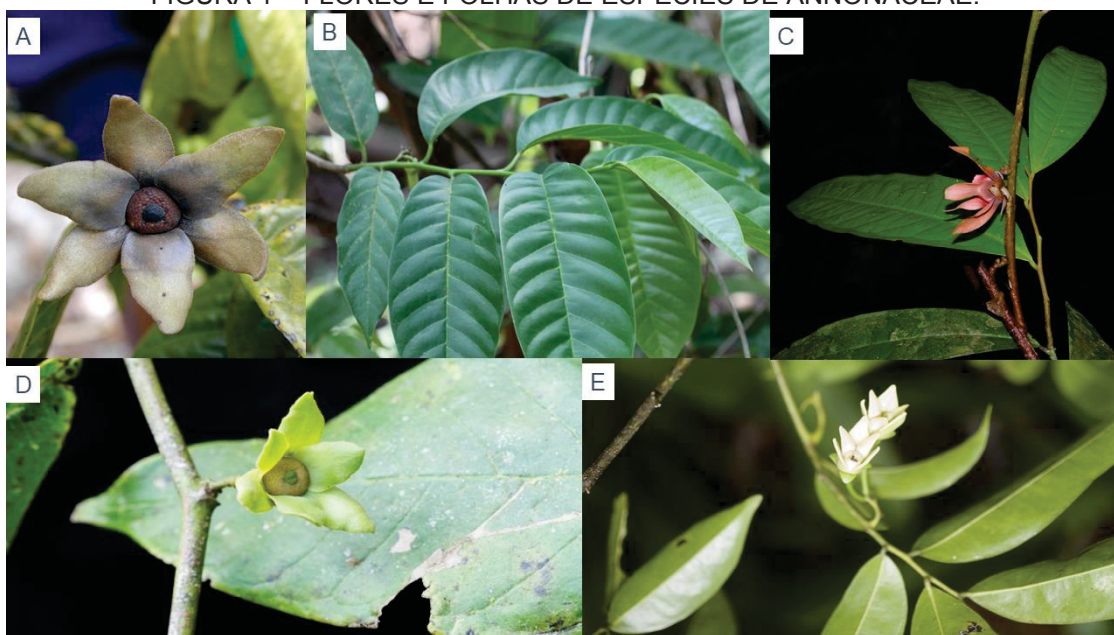
2 REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA

2.1 FAMÍLIA ANNONACEAE

A família Annonaceae, é representante do subgrupo de plantas Magnoliidae, do grupo das Angiospermas, o qual é o mais diversificado das plantas, apresentando aproximadamente 250.000 espécies. A família Annonaceae Juss é frequente nas regiões tropical e subtropical (sendo nativa do Brasil), e é representada por plantas aromáticas, arbustos ou trepadeiras que apresentam casca fibrosa e madeira com amplos raios. As suas folhas são simples, alternas e dísticas, com pecíolo reduzido e sem estípulas, e as flores variam em tamanho e cor, podendo ser desde esbranquiçadas até alaranjadas e vinho dependendo da espécie. Os seus frutos são comestíveis e o sincarpo apresenta numerosos carpelos individualizados sobre um receptáculo carnoso. (ALMEIDA et al., 2012; LEBOEUF et al., 1980; RABELO et al., 2014).

Conforme descrito no sistema da Flora do Brasil 2020, a sua ocorrência já foi confirmada no Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina). Esta família compreende quatro subfamílias, Anaxogoreoideae, Annonoideae, Ambavioideae e Malmeoideae, dentre as quais a subfamília Annonoideae é mais prevalente no Brasil, sendo que os gêneros *Annona* L., *Duguetia* A. St. –Hil., *Guatteria* Ruiz & Pav. e *Xylopia* L. são os que possuem a maior diversidade de espécies, e estão representados na FIGURA 1. (CHATROU et al., 2012; “Flora do Brasil de 2020”, 2017; LOPES; MELLO-SILVA, 2014).

FIGURA 1 – FLORES E FOLHAS DE ESPÉCIES DE ANNONACEAE.



FONTE: www.tropicos.org, acessado em maio de 2017

LEGENDA: A) Flores de espécies da família Annonaceae; B) Folhas de *Annona* L.; C) Folhas e Flores de *Duguetia* A. St.-Hil.; D) Folhas e Flores de *Guatteria* Ruiz & Pav; E) Folhas e Flores de *Xylopia* L.

Ao todo, a família Annonaceae compreende cerca de 3000 espécies distribuídas em 160 gêneros (AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI; WIART, 2011), sendo que no Brasil, segundo o projeto Flora do Brasil 2020, são encontrados 29 gêneros e 386 espécies aproximadamente.

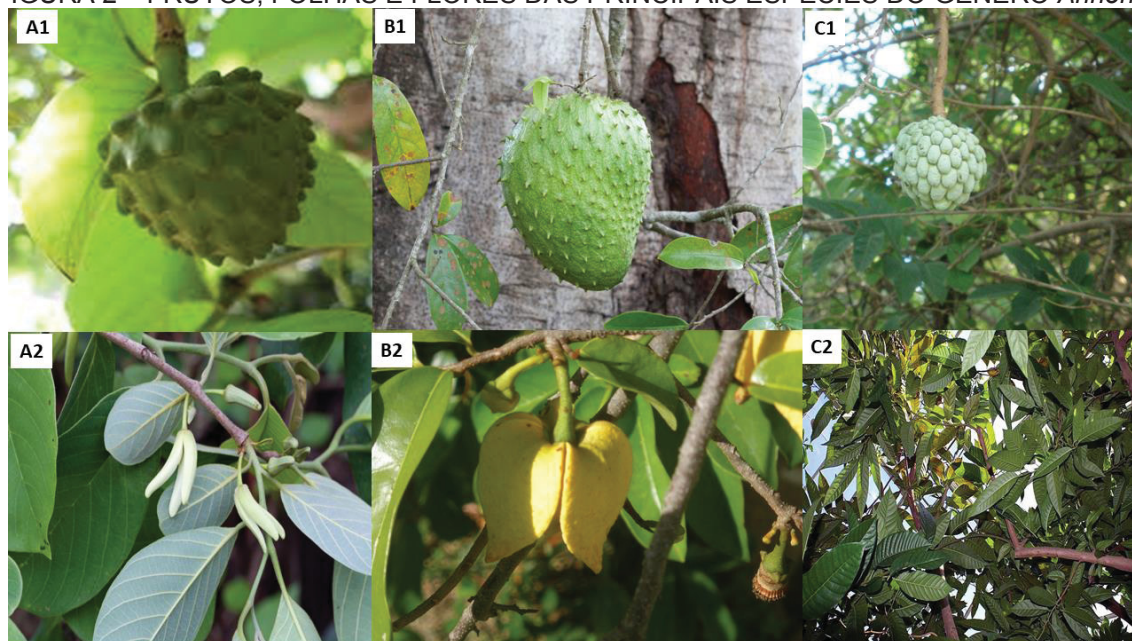
Esta família apresenta grande importância econômica, devido ao seu amplo uso, como a comercialização de seus frutos, produção de óleos alimentares e sabão, indústria madeireira, matéria-prima para fabricação de aromatizantes e indústria farmacêutica e de cosméticos. (JOSÉ et al., 2014; LEBOEUF et al., 1980). Além disso, muitas espécies são utilizadas na medicina popular no tratamento de diversas enfermidades, sendo assim amplamente estudadas com relação ao seu potencial farmacológico, relacionado principalmente com as diversas classes de metabólitos secundários encontrados nas espécies desta família como flavonoides, terpenoides, óleos essenciais, acetogeninas e alcaloides. (ALMEIDA et al., 2012; AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI; WIART, 2011; RABELO et al., 2014).

2.2 GÊNERO *Annona* Linn

O gênero *Annona* Linn é conhecido por ser uma grande fonte de frutos comestíveis, popularmente conhecido como “araticum”, “graviola”, “fruta-do-conde”,

“pinha”, “ata”, “biribá”, “condessa”, “marolo”. Este gênero compreende cerca de 200 espécies sendo que 82 podem ser encontradas no Brasil principalmente na região do Cerrado brasileiro, Floresta Amazônica, Pantanal e Caatinga. As espécies mais comuns presentes em território nacional estão representadas na FIGURA 2 e são elas: *Annona cherimola* Mill. (cherimóia) (A1 e A2), *Annona muricata* (graviola) (B1 e B2) e *Annona squamosa* Linn. (fruta-do-conde) (C1 e C2). (EGYDIO; SANTOS, 2011; RAINER, 2007).

FIGURA 2 – FRUTOS, FOLHAS E FLORES DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO *Annona*.



FONTE: O Autor (2017).

Além da importância econômica, devido a comercialização dos frutos e derivados e de seu valor nutricional, as espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular no tratamento de úlceras, dor de estômago, diarreia (BRITO et al., 2008; RABELO et al., 2014; VEGA et al., 2007), e apresentam atividade antitumoral, antiparasitária, anti-inflamatória e inseticida comprovadas. (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014; RINALDI et al., 2017).

Devido a estas aplicações na medicina popular, as espécies deste gênero vêm sendo amplamente estudadas, e relatadas na literatura de acordo com as atividades biológicas que apresentam como, por exemplo, *A. muricata* L. que apresenta atividade antitumoral (BOSCOLO; DE SENNA VALLE, 2008; SOMKID et al., 2015), anti-inflamatória (DE SOUSA et al., 2010), antimalária (BOSCOLO; DE SENNA VALLE, 2008) e efeito bactericida (VIERA et al., 2010); *A. cherimola* Mill. que apresenta atividade antioxidante (BARRECA et al., 2011); *A. crassiflora* Mart., *A.*

glabra L e *A. squamosa* L que apresentam atividade contra larvas de *Aedes aegypti* (DE OMENA et al., 2007); e *A. crassiflora* Mart. que também apresenta atividade antioxidante. (ROESLER; LORENCINI; PASTORE, 2010). Estes dados justificam a importância da contínua investigação química e farmacológica destas espécies, visto que estas apresentam grande potencial biológico, devido a sua constituição química, como exemplo *A. rugulosa*.

2.3 *Annona rugulosa* (SCHLTDL.) H. RAINER

Annona rugulosa é uma árvore de aproximadamente 12 metros de altura e 40 cm de diâmetro encontrada nas regiões Sul e Sudeste do país. Esta espécie é popularmente conhecida como “araticum-de-porco”, “araticum-verde” ou “araticum-de-comer”. Assim como as outras espécies do gênero *Annona*, apresenta frutos comestíveis, e na medicina popular, a infusão de suas folhas é utilizada para o tratamento de dores renais e infecções de garganta (DICKEL; RATES; RITTER, 2007). Com base em evidências físicas (morfologia e palinologia) observadas por pesquisadores, as espécies do gênero antes classificadas como *Rollinia* foram reclassificadas e realocadas por H. Rainer (2007) para o gênero *Annona* L., sendo portanto, o nome da espécie antes *Rollinia rugulosa* nomeada como *Annona rugulosa*.

O único estudo existente na literatura realizado com *A. rugulosa*, refere-se a um trabalho desenvolvido com o extrato das folhas dessa espécie, no qual foram identificados 15 metabólitos sendo eles dois esteroides (β -sitosterol e estigmasterol) e 13 alcaloides, oito da classe dos aporfínicos (anonaina, nornantenina, nornuciferina, xilopina, norisocoridina, litseferina, assimilobina e isoboldina), dois da classe dos oxoaporfínicos (lauginosina e liriodenina), e três da classe dos benzilisoquinolínicos (magnococlina, reticulina e N-metilcoclaurina). (VENDRAMIN et al., 2013).

2.4 CLASSES DE ALCALOIDES PRESENTES NO GÊNERO *Annona* L.

Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas distribuídas no reino vegetal, principalmente entre as angiospermas. Estes compostos ainda podem ser encontrados em bactérias, fungos, e alguns mamíferos (FATTORUSSO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2008; SCHLÄGER; DRÄGER, 2016). Os alcaloides contêm um ou mais átomos de nitrogênio, encontrados tipicamente como aminas

primárias, secundárias ou terciárias, o que confere basicidade aos mesmos, facilitando seu isolamento e purificação através da formação de sais solúveis em água na presença de ácidos. (DEWICK, 2009).

Estes metabólitos, assim como outros, são importantes para o organismo que o produz, apresentando funções de fonte de reserva de nitrogênio, atração de polinizadores, regulação do crescimento, auxílio no equilíbrio ácido/ base, proteção contra raios UV (ultravioleta), e principalmente defesa contra micro-organismos e predadores. (DEWICK, 2009). Geralmente estão presentes na forma de mistura, onde encontram-se alcaloides majoritários e minoritários, além da presença de outros metabólitos secundários, somando os benefícios para a planta e para o potencial biológico da mesma. (FATTORUSSO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2008).

Desde a antiguidade são relatados o uso de alcaloides. O primeiro alcaloide identificado, proveniente do ópio, foi isolado pelo farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Sertürner, aproximadamente em 1800, o qual atribuiu a este alcaloide o nome de morfina, relacionando-o com o deus grego Morfeu, o deus dos sonhos. O uso de extratos e infusões de plantas contendo alcaloides também é relatado desde a antiguidade. Alguns exemplos muito conhecidos incluem o uso de atropina por Cleópatra, com a finalidade de dilatar suas pupilas para parecer mais atraente, e a morte de Sócrates causada pelo uso de cicuta, que contém o alcaloide conina. (CABRAL; PITA, 2015; KUTCHAN, 1995; ROBERTS; WINK, 1998).

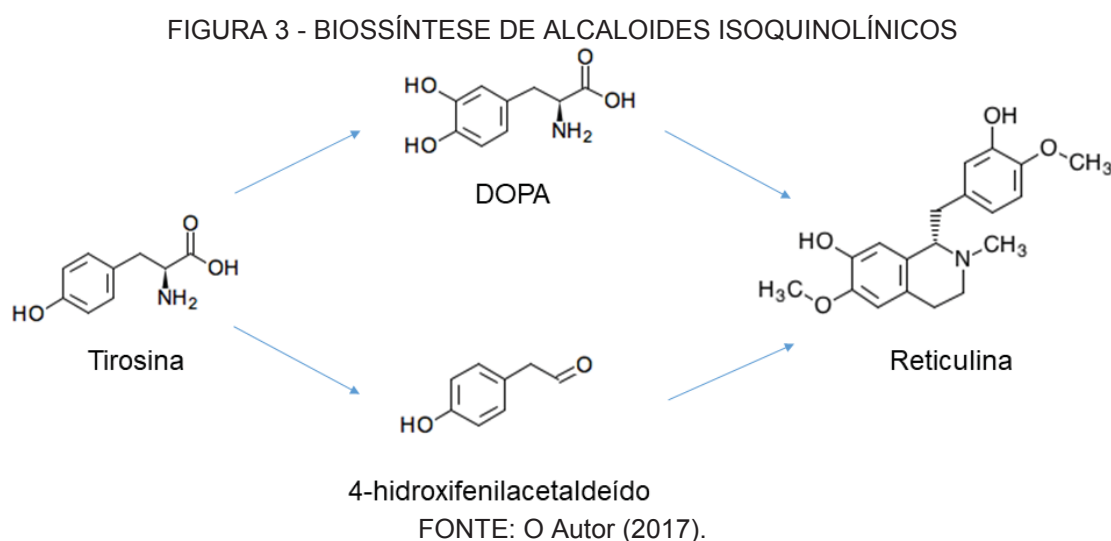
Desde então os alcaloides vêm sendo utilizados com diferentes propósitos, pode-se citar como exemplo, a ingestão de café, que por conter a cafeína, apresenta propriedades estimulantes, bem como o hábito de fumar cigarros, os quais contêm nicotina, um alcaloide capaz de promover redução do apetite, relaxamento muscular, aumento dos batimentos cardíacos, da pressão arterial, dentre outros efeitos. Além disso, destaca-se que diversos alcaloides também serviram como protótipos para a síntese de fármacos, como a colchicina, hoje sintetizada e utilizada como anti-inflamatório no tratamento de gota; a codeína, utilizado como antitussígeno, e o antitumoral paclitaxel. (CABRAL; PITA, 2015; KUTCHAN, 1995; ROBERTS; WINK, 1998).

As estruturas dos alcaloides, de modo geral, se originam a partir de um aminoácido, normalmente ornitina, lisina, tirosina, triptofano, ácido antranílico, e histidina, ou então de outros precursores como terpenos e esteroides, sendo que para os alcaloides derivados dos aminoácidos, o átomo de nitrogênio presente na estrutura

dos mesmos é proveniente do aminoácido de origem, já para os derivados de outros precursores, a inserção do átomo ocorre em outras etapas. (DEWICK, 2009).

As espécies da família Annonaceae apresentam em sua composição uma grande quantidade de alcaloides, sendo que aproximadamente 800 já foram isolados nos diferentes gêneros da família. (LÚCIO et al., 2015). A maioria destes tratam-se de alcaloides isoquinolínicos, provenientes da via biossintética do ácido chiquímico, e derivados do aminoácido tirosina. (DEWICK, 2009; DIAMOND; DESGAGNE-PENIX, 2015).

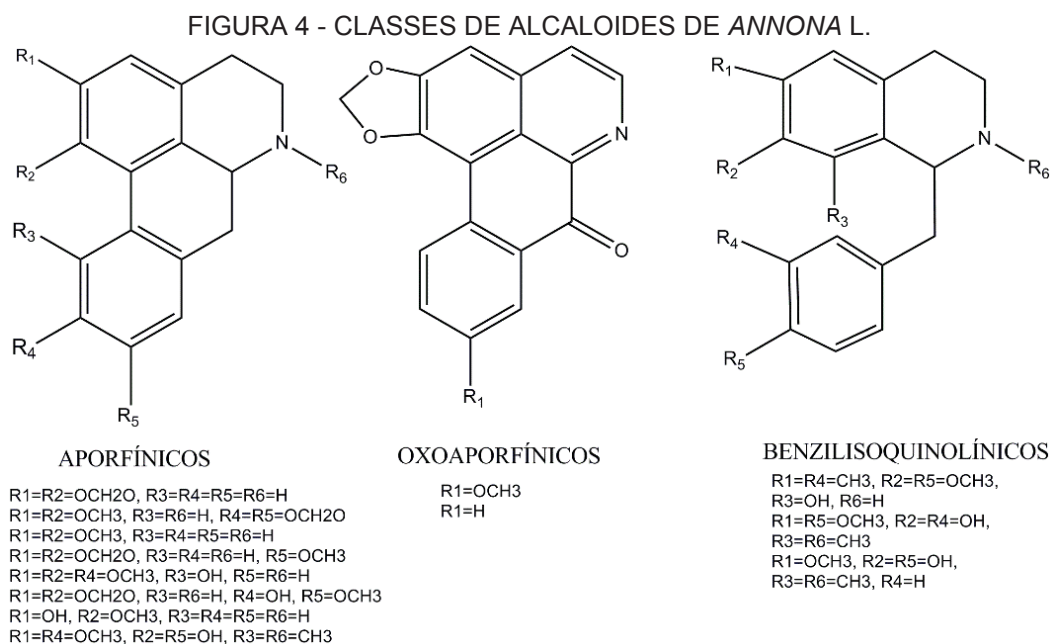
Estes alcaloides apresentam um esqueleto isoquinolínico, que através de diversas etapas dão origem à reticulina (conforme representado na Figura 3), precursor importante de vários outros alcaloides das classes dos aporfínicos, protoberberínicos e benzofenantridínicos. Os alcaloides isoquinolínicos são de grande importância e atuam principalmente na proteção do vegetal contra a ação de agentes patógenos. (DEWICK, 2009; DIAMOND; DESGAGNE-PENIX, 2015).



Os alcaloides isoquinolínicos são divididos em várias outras classes que incluem os alcaloides aporfínicos, protopínicos, protoberberínicos e benzilisoquinolínicos. Em relação a distribuição, o grupo dos aporfínicos é o maior, seguido do grupo dos oxoaporfínicos, e outros grupos menores como os fenantrênicos, benziltetrahydroisoquinolínicos e bisbenziltetrahydroisoquinolínicos. (AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI; WIART, 2011; LEBOEUF et al., 1980; LÚCIO et al., 2015).

Dentre os alcaloides encontrados no gênero *Annona L.* destacam-se os alcaloides das classes dos aporfínicos, oxoaporfínicos e benzilisoquinolínicos,

representados na FIGURA 4. (CAMPOS et al., 2008; CHEN et al., 2001; COSTA et al., 2011; DA SILVA et al., 2007; OROZCO-CASTILLO et al., 2016; SANTOS et al., 2015; VILA-NOVA et al., 2011). Os alcaloides anonaina (aporfínico), lirodenina (oxoaporfínico) e reticulina (benzilisquinolínico) são os que prevalecem no gênero supracitado e, por isso, são considerados os marcadores quimiotaxonômicos deste. (LEBOEUF et al., 1980).



FONTE: O Autor (2017).

Diversas atividades biológicas já foram atribuídas a estas classes de alcaloides presentes nos extratos das folhas de *A. rugulosa*, as quais são representados na TABELA 1 a seguir:

TABELA 1 – PRINCIPAIS CLASSES DE ALCALOIDES EM *A. rugulosa* E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.

Classe	Alcaloide	Atividade
Benzilisquinolínicos	Reticulina, Magnococlina e N-metilcoclaurina	Atividade Antimicrobiana; Leishmanicida. (COSTA et al., 2013; VILA-NOVA et al., 2011).
Aporfínicos	Asimilobina, Anonaina, Nornantenina, N- Nornuciferina, Xilopina, Litseferia, Isoboldina e Norisocoridina	Atividade vasodilatadora; antibacteriana e antifúngica, antioxidante, antidepressiva, citotóxica, antiparasitária. (CHEN et al., 2008; COSTA et al., 2013; LI et al., 2013; MOGHADAMTOUSI et al., 2015).
Oxoaporfínicos	Liriodenina e Lanuginosina	Atividade antiagregante plaquetária, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária. (COSTA et al., 2011; DA SILVA et al., 2007; WU et al., 1993)

FONTE: O Autor (2016).

Uma vez que a espécie *A. rugulosa* é constituída por diversos alcaloides que apresentam alto potencial biológico, bem como diante do fato de que até o momento, nenhuma atividade biológica desta espécie foi investigada, salienta-se a necessidade de investigar os possíveis efeitos biológicos da mesma.

2.5 EFEITO DA SAZONALIDADE NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As anonáceas apresentam grande diversidade química e são produtoras de várias classes de metabólitos secundários, como os alcaloides. Diferente dos metabólitos primários produzidos pelas plantas, os metabólitos secundários não são essenciais à vida da planta, porém a sua ausência afeta a sobrevivência, fecundidade ou a estética dos espécimes. A produção de metabólitos secundários de diferentes classes químicas pode ser específica para famílias, subfamílias e gêneros, ou até mesmo para espécies e subespécies vegetais. (DEWICK, 2009).

Os metabólitos secundários representam a ligação química entre as espécies vegetais e o ambiente que as circunda, sendo assim a produção destes é influenciada por diversos fatores, como a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataques de agentes patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Com base nisso, podemos citar algumas alterações como por exemplo, no período reprodutivo, no qual a concentração de alguns metabólitos diminui nos tecidos vegetativos e aumenta nos tecidos reprodutivos. (CASTRO-MORENO et al., 2013; MARINHO, 2011). Alguns estudos também mostram que fatores como a intensidade da luz alteram a composição e concentração de algumas classes, assim como a produção de metabólitos nitrogenados, como os alcaloides, aumenta com a disponibilidade de nitrogênio no solo, e quantidade incorporada aos tecidos da planta. (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Desta forma, devido a estas alterações a quantidade de metabólitos produzidos por uma espécie pode variar conforme o local ou a época em que se encontra, justificando a importância de uma análise sazonal, na qual é avaliada a influência dos diversos fatores ambientais na quantidade dos alcaloides produzidos, como exemplo na espécie *A. rugulosa*, identificando períodos de maior ou menor

produção dos mesmos, visto que estes alcaloides pertencem às classes com alto potencial biológico.

Para a realização desta análise do efeito da sazonalidade na quantidade de alcaloides presentes nas folhas da espécie, é necessário o uso de técnicas e métodos analíticos como a cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

2.6 QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES POR LC-MS.

Desde os anos 90, os métodos de extração foram se tornando mais eficientes, assim como métodos de separação cromatográfica. Ainda, a espectrometria de massas se difundindo no mundo, juntamente com o aprimoramento destes métodos e técnicas analíticas, têm a capacidade de nos fornecer cada vez mais resultados satisfatórios em análises envolvendo produtos naturais, se tornando a linha de frente das análises quantitativas e qualitativas de extratos contendo alcaloides. (FATTORUSSO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2008; JARMUSCH; COOKS, 2014; NICULAU et al., 2016).

Nos dias de hoje para análises de alcaloides são utilizados métodos de LC-MS (UHPLC, UPLC), devido a detecção de quantidades mínimas desses componentes em matrizes complexas (extratos); separações cromatográficas rápidas que detém excelentes formas de pico (BOTELHO, 2011; WANG et al., 2014); e uma melhor reprodutibilidade e detecção, o que é muito importante para o controle de qualidade de medicamentos à base de plantas. (LIANG et al., 2010; MUSHARRAF; GOHER; ZAREENA, 2015). Além disso, a seletividade, sensibilidade e robustez da técnica permitem que limites de detecção mais baixos possam ser utilizados para a análise de alcaloides, bem como a redução do tempo de análise o qual permite um maior número de amostras a serem analisadas. (BOURNINE et al., 2013; LIN et al., 2016; LU et al., 2012).

Portanto métodos de análise quantitativa utilizando LC-MS, tornam-se ideais para estudos de quantificação de produtos à base de plantas. (LI et al., 2015). Estas análises quantitativas de alcaloides através de métodos utilizando a técnica do UPLC-MS já vêm sendo realizadas por autores, utilizando a ESI como fonte de ionização e o modo positivo de ionização, e com base em revisão da literatura, seguem os parâmetros utilizados na TABELA 2.

TABELA 2 - ANÁLISE QUANTITATIVA DE ALCALOIDES UTILIZANDO UPLC-MS

Classe de Alcaloides	Alcaloides	Coluna	Fase móvel	Referência
Aporfínico	Magnoflorina	C18	Água + 0,1% ácido fórmico; Acetonitrila	(SINGH et al., 2015)
Bisbenzilisquinolinico	Neferina	C18	Água + 0,02M acetato de amônia; Acetonitrila	(LIN et al., 2014)
Pirrolizidinico	Senecionina	C18	Água + 5 mM acetato de amônia; Acetonitrila	(SCHENK et al., 2015)
Aporfínico; Benzilisquinolinico, Protoberberinico	Isocoridina; Reticulina; Tetrahidropalmatina	C18	Água + 0,1% ácido fórmico; Acetonitrila	(BAJPAI et al., 2016)

FONTE: O Autor (2016).

São crescentes os estudos utilizando técnicas cromatográficas a fim de identificar e quantificar metabólitos com potencial atividade biológica, que possam contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos. (JORGE; MATA; ANTÓNIO, 2016). Porém, as pesquisas envolvendo a quantificação de alcaloides das classes dos aporfínicos, oxoaporfínicos e benzilisquinolínicos são escassas, visto que o desenvolvimento de métodos de quantificação destes metabólitos ainda apresenta muitos empecilhos, como exemplo a falta de padrões de alcaloides destas classes.

No desenvolvimento de métodos de quantificação de determinada substância em uma amostra, tem-se a possibilidade de realizar a quantificação absoluta ou relativa (semi-quantificação) desta. Nas análises de quantificação absoluta existe a exigência da presença de um padrão analítico de alta pureza da substância de interesse, ou ainda a utilização de um padrão deuterado, onde tem-se a substância marcada isotopicamente com deutério. Estes padrões são utilizados para avaliar a resposta do método, especificidade e eventuais interferências. (LOOS; SCHEPDAEL; CABOOTER, 2016; WANG et al., 2016).

Neste sentido, as plantas são muito complexas e apresentam diversos metabólitos ainda não identificados, sendo que para o isolamento dos mesmos são utilizadas grandes quantidades de solventes e material vegetal. Estes metabólitos muitas vezes são encontrados em baixíssimas quantidades, tendo como consequência a escassez de padrões analíticos para as análises de rotina (FRASER et al., 2007; WANG et al., 2016), acarretando na falta de estudos de quantificação absoluta utilizando os padrões de referência para os metabólitos destas classes de alcaloides. (FRASER et al., 2007).

No entanto, quando os padrões analíticos de referência ou padrão deuterado da substância a ser quantificada não estão disponíveis, padrões analíticos de classes análogas da classe da substância de interesse podem ser utilizados, podendo estes estarem presentes ou não na matriz em estudo. (LOOS; SCHEPDAEL; CABOOTER, 2016). Assim, quando utilizados estes padrões tem-se uma resposta instrumental dos analitos de interesse em relação a um padrão adicionado em concentração conhecida à amostra. (BANERJEE et al., 2012; HU et al., 2011; WANG et al., 2016).

Para a utilização destes padrões, a substância e quantidade a serem utilizadas devem ser definidas e descritas, bem como a resposta do método frente a esta substância, como uma curva de calibração utilizando a matriz em análise. Além disso deve-se demonstrar, em LC-MS que a substância não interfira na eluição dos picos, e não cause supressão iônica dos compostos em estudo (JORGE; MATA; ANTÓNIO, 2016; LOOS; SCHEPDAEL; CABOOTER, 2016); e essa deve apresentar respostas semelhantes a dos analitos de interesse. (BANERJEE et al., 2012).

Sendo assim, métodos de quantificação são desenvolvidos utilizando uma substância de referência análoga ao analito de interesse, de concentração e pureza conhecidas, para comparação destes com a substância escolhida. Utilizando estas substâncias, tem-se como objetivo a obtenção de um método tão eficaz quanto os já desenvolvidos para quantificação absoluta que utilizam padrões de referência, porém com menor custo de análise e maior facilidade de acesso aos padrões.

Na área de produtos naturais para quantificação de substâncias, são utilizadas as técnicas de LC-MS/MS usando métodos de monitoramento de reações múltiplas (MRM). No método do MRM são monitoradas transições específicas para cada analito, onde o primeiro e terceiro quadrupolos funcionam como filtros para selecionar os íons precursores e íons fragmentos para cada transição, a fim de garantir a alta seletividade. Porém, mesmo se tratando de uma técnica altamente sensível, a otimização das transições monitoradas ainda é dificultada pela falta de padrões autênticos. (WANG et al., 2016).

Outro problema relatado na literatura para a utilização de outros padrões é o efeito matriz onde a co-eluição dos componentes da matriz (extrato) utilizada e do padrão afetam a ionização dos analitos, comprometendo a quantificação. (JORGE; MATA; ANTÓNIO, 2016). Portanto, para a utilização destes padrões, testes de efeito matriz devem ser realizados a fim de comprovar que o mesmo não sofre interferências da matriz.

Com o desenvolvimento de um método de quantificação preciso e exato e com a utilização de experimentos altamente sensíveis como o de MRM, a análise torna-se confiável para metabólitos de baixa abundância. Além disso, quando definido o efeito matriz e comprovando que a utilização de padrões de classes diferentes não afeta a quantificação dos analitos de interesse, a utilização desses torna-se promissora sem que a análise seja afetada, trazendo benefícios visto que esses já são caracterizados, purificados, de fácil acesso e de menor custo frente aos poucos padrões de substâncias naturais autênticos. (JORGE; MATA; ANTÔNIO, 2016).

2.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA E/OU ANTIPROLIFERATIVA DE ALCALOIDES

2.7.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

O câncer tem se tornado uma das principais causas de morte em todo o mundo, apresentando dados preocupantes devido ao aumento da ocorrência de novos casos. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que a incidência de casos de câncer no Brasil seja de aproximadamente 635 mil, no ano de 2018.

De acordo com o INCA, o termo câncer refere-se a um conjunto de doenças que apresentam desordem sobre os mecanismos que controlam o ciclo celular e a apoptose, tendo como consequência uma proliferação exacerbada de células e aquisição de fenótipo invasor, levando ao desenvolvimento de tumores e ocorrência de metástase. (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Muitos estudos indicam que o processo de carcinogênese ocorre em múltiplas etapas, sendo decorrente de alterações genéticas que ativam a transformação de células normais em células malignas. Estas alterações são desencadeadas por inúmeros fatores, podendo ser geneticamente pré-determinadas ou estar vinculadas a hábitos sociais (poluição, radiação, tabagismo, alcoolismo, alimentação). (ALMEIDA et al., 2005; HANAHAN; WEINBERG, 2000; INCA, 2018).

As mutações genéticas envolvidas na carcinogênese ocorrem em dois grupos de genes: protooncogenes e genes supressores tumorais. Quando as mutações ocorrem nos chamados protooncogenes, estes que antes eram inativos em células normais, podem ser ativados e se transformar em oncogenes, que são responsáveis

pela malignização das células normais, transformando-as em células neoplásicas. Já as mutações que ocorrem nos genes supressores tumorais, inativam estes genes que são responsáveis por inibir o crescimento de células malignas (FELIPE, 2014; SANTOS, 2018). Desta forma, as células, durante o processo de carcinogênese, passam a se multiplicar de maneira descontrolada, podendo formar tumores malignos, e, ainda podem se desprender do tumor primário e migrar, originando metástases (INCA, 2018).

2.7.1 TRATAMENTO DO CÂNCER

O tratamento do câncer é feito principalmente por excisão cirúrgica dos tumores, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Dentre estes tratamentos, a retirada cirúrgica é eficaz quando o tumor é local, ou seja, quando não existe metástase. Nos demais casos, uma abordagem de tratamento sistêmico é necessária, sendo a quimioterapia considerada o tratamento de maior eficácia (ALMEIDA et al., 2005; SANTOS, 2018).

Dentre as classes de fármacos utilizados na quimioterapia, as principais são:

- 1) Antimetabólitos: agem principalmente na fase S do ciclo celular. Inibem a ação de purinas e pirimidinas, impedindo a síntese do DNA (exemplos: mercaptopurina, tioguanina, citarabina);
- 2) Inibidores da topoisomerase: inibem a síntese de DNA e RNA ao agirem sobre enzimas envolvidas nos processos de transcrição e replicação, tais como a topoisomerase II (exemplo: doxorrubicina);
- 3) Inibidores da formação de desoxiribonucleotídeos: provoca uma inibição imediata da síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA), agindo como um inibidor da ribonucleotídeo redutase (exemplo: hidroxiuréia, fluoracila);
- 4) Alquilantes: se ligam ao DNA causando ruptura da cadeia ou replicação defeituosa. Agem principalmente durante a fase de síntese de DNA (exemplo: cisplatina);
- 5) Inibidores de Microtúbulos: inibem a polimerização dos microtúbulos. Inibem a mitose na fase da metáfase (exemplos: vincristina, vimblastina) (ALMEIDA et al., 2005; FELIPE, 2014; RANG et al., 2012)

2.7.2 ALCALOIDES COMO AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

Mesmo diante do enorme arsenal de fármacos antineoplásicos existentes, a maioria destes, não apresenta boa especificidade, o que faz com que se tornem

tóxicos ao paciente. Além disso, os fármacos disponíveis não são completamente eficazes, sendo bastante frequente o desenvolvimento de resistência a quimioterápicos e reincidência da doença. Desta forma, a descoberta de novos fármacos antitumorais é de extrema importância e urgência para complementar as terapias convencionais. (ALMEIDA et al., 2005; BRANDÃO et al., 2010; FELIPE, 2014).

Assim como já mencionado anteriormente, o uso de plantas no tratamento das mais diversas enfermidades, dentre elas, o câncer, é bastante expressivo. Entretanto, são poucos os estudos que comprovam cientificamente as propriedades terapêuticas das plantas, sendo ainda escasso o número de possibilidades de novos medicamentos com base em produtos naturais para o tratamento destas patologias.

Apesar de existirem poucos estudos comprovando estas atividades, dentre os principais metabólitos secundários com efeito antineoplásico já relatados na literatura, destacam-se os alcalóides, presentes nas mais diversas espécies vegetais, conforme já descrito anteriormente, sendo demonstrados alguns exemplos na

TABELA 3 a seguir:

TABELA 3 – ALCALÓIDES COM ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

(continua)

Alcalóide	Espécie	Neoplasia	Referência
Vimblastina	<i>Catharanthus roseus</i> G. Don.	Cancer de próstata, bexiga, melanoma, entre outros	(BRANDÃO et al., 2010; HOLANDA et al., 2008)
Montamine	<i>Centaurea montana</i> .	Cancer de cólon	(MOHAN; JEYACHANDRAN, 2012)
Tomatina	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Adenocarcinoma	(HABLI et al., 2017)
Berberina	<i>Rhizoma coptidis</i>	Câncer de Cólon	(MOHAN; JEYACHANDRAN, 2012)
Harringtonine	<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Leucemias	(ISAH, 2016)
Camptotecina	<i>Camptotheca acuminata</i>	Câncer de ovário	(MARQUES, 2016; MOHAN; JEYACHANDRAN, 2012; ZHANG et al., 2015),

TABELA 3 – ALCALÓIDES COM ATIVIDADE ANTINEOPLASICA

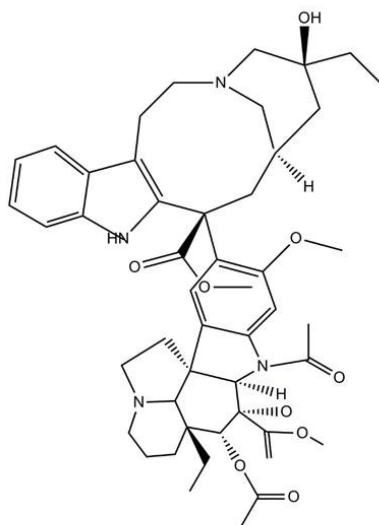
			(conclusão}
Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Câncer de mama, colon, próstata, osteosarcoma	(GRINEVICIUS, 2016).
6,7-dimetoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-ácido carboxílico	<i>Mucunapruriens</i>	Carcinoma Hepático	(KUMAR et al., 2016)
Anonaína	Annonaceae	Cancer do colo do útero	(CHEN et al., 2008)
Liriodenina	Annonaceae	Cancer de Laringe, Ovario e Pulmão	(HABLI et al., 2017; MOHAN; JEYACHANDRAN, 2012; NORDIN et al., 2015)
Vincristina	<i>Catharanthus roseus G. Don.</i>	Cancer de Mama, ovário, mieloma entre outros	(BRANDÃO et al., 2010; HOLANDA et al., 2008)

FONTE: o Autor (2018).

A vincristina, fármaco foco deste trabalho, trata-se de um alcaloide utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer tais como leucemias, linfomas, Sarcoma de Kaposi e câncer de cólo de útero. Tal alcalóide foi isolado da espécie vegetal *Catharanthus roseus G. Don.* sinonimia *Vinca rosea*, tendo sido aprovado seu uso como agente antineoplásico pelo FDA em 1965. (BRANDÃO et al., 2010; FREIRE, 2015; HABLI et al., 2017; MOHAN; JEYACHANDRAN, 2012; TANG et al., 2008).

Este fármaco é muito utilizado na prática clínica, porém alguns estudos tem identificado que este vem causando resistência (FROMMANN et al., 2018; SYED et al., 2017), e promovendo a ocorrência de efeitos colaterais com uso frequente do mesmo, como alteração da motilidade e mucosa gastrointestinal, neuropatia (GAUTAM; RAMANATHAN, 2018; L et al., 2018), e hepatotoxicidade. (SHATI; ELSAID, 2018). Assim, a associação deste fármaco com outras substâncias é uma alternativa para diminuir as suas doses e conseqüentemente seus efeitos colaterais.

FIGURA 5 – ESTRUTURA VINCRISTINA

**Vincristina**

FONTE: O autor (2018).

Com base neste potencial antineoplásico encontrado para diversas espécies, e principalmente para os alcaloides, e na busca por novos medicamentos à base de plantas para as mais diversas enfermidades, investigações onde as atividades dos mesmos são comprovadas merecem cada vez mais atenção.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método de quantificação por LC-MS/MS para avaliar o efeito da sazonalidade na produção de alcaloides nos extratos brutos de folhas de *Annona rugulosa*, e determinar a atividade antiproliferativa do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. rugulosa* frente a linhagem de carcinoma cervical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar o material botânico da espécie de *A. rugulosa*;
- Testar diferentes condições de extração para alcaloides;
- Obter os extratos vegetais brutos do material coletado, utilizando a melhor condição para a quantificação de alcaloides;
- Desenvolver um método analítico por LC-MS/MS para a quantificação de alcaloides;
- Aplicar o método analítico desenvolvido para quantificar os alcaloides presentes em extratos brutos de folhas de *A. rugulosa*;
- Avaliar o efeito da sazonalidade na quantidade de alcaloides presentes em *A. rugulosa*;
- Avaliar a atividade citotóxica e/ou antiproliferativa do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. rugulosa* frente a células Hela.
- Avaliar a atividade citotóxica e/ou antiproliferativa do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. rugulosa* em associação à vincristina, frente a células Hela.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 PADRÕES E REAGENTES

O metanol e acetonitrila (ambos grau HPLC) foram adquiridos da marca J.T. Baker, bem como o ácido fórmico (88%). A água ultrapura foi obtida através do Sistema de Purificação Mili-Q (Millipore, Bedford, EUA). Os alcaloides utilizados para o desenvolvimento do método foram isolados e identificados pelo grupo de pesquisa em 2013, sendo eles asimilobina, nornuciferina, liriodenina, lanuginosina, litseferina, isoboldina, reticulina e N-metilcoclaurina. (VENDRAMIN et al., 2013). O padrão interno de Cafeína de pureza $\geq 99\%$ foi adquirido da marca Sigma-Aldrich.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ALCALOIDES

Os alcaloides foram solubilizados em uma solução de metanol:água (80:20, v/v) com adição de 0,1% de ácido fórmico, a fim de se obter uma solução mãe de concentração final de 2 mg.mL⁻¹. Para as análises de infusão direta foram obtidas soluções de trabalho a partir da solução mãe em concentração final de 1 mg.mL⁻¹, também em metanol:água (80:20, v/v). Para as análises de LC-MS/MS as soluções de trabalho foram preparadas por meio de diluição em acetonitrila:água:ácido fórmico (8:92:0,1, v/v/v). Para a análise quantitativa foi utilizado um padrão interno de cafeína de teor $\geq 99\%$. A solução mãe de cafeína foi preparada em uma concentração de 1 mg.mL⁻¹ (solubilizada em metanol 100%) e as soluções de trabalho do padrão de cafeína foram preparadas por meio de diluição em acetonitrila:água:ácido fórmico (8:92:0,1, v/v/v) em concentrações necessárias para cada experimento.

4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS VEGETAIS

As coletas das folhas de *A. rugulosa* foram realizadas no Capão do Cifloma, localizado no Campus Botânico da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR. As coletas foram realizadas com o auxílio de uma tesoura de poda alta (podão) em 5

exemplares da espécie, escolhidos aleatoriamente, sendo efetuada uma coleta por mês em cada exemplar

TABELA 4 - COORDENADAS DOS EXEMPLARES COLETADOS DE *A. rugulosa*

Exemplar	Coordenadas	
1	25°26'48.67" S	49°14'21.52" W
2	25°26'48.66" S	49°14'20.66" W
3	25°26'48.80" S	49°14'21.23" W
4	25°26'49.39" S	49°14'21.88" W
5	25°26'50.23" S	49°14'21.88" W

FONTE: O Autor (2017).

Após a coleta, foi realizada a identificação botânica através de comparação com exsicata do material localizada no Herbário do Departamento de Botânica (UPCB) da Universidade Federal do Paraná, sob registro número 74117 (coordenadas originais: (25°50'05" S, 49°04'39" W) (SisGen nº A30DAFF). As folhas foram limpas e secas em temperatura ambiente por aproximadamente uma semana, em seguida moídas com moinho de facas e, posteriormente pulverizadas em almofariz com o auxílio de nitrogênio líquido, obtendo-se aproximadamente 50 gramas das folhas moídas. O material vegetal teve o tamanho padronizado utilizando uma peneira granulométrica de mesh 48 e então prosseguiu-se com a obtenção dos extratos. Este procedimento foi realizado uma vez por mês, durante um período de 12 meses (11/2016 a 10/2017), utilizando sempre os mesmos exemplares da espécie, e obtendo-se assim um extrato para cada exemplar em cada mês do ano.

4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA O PREPARO DOS EXTRATOS

O material pulverizado referente a amostra de um exemplar escolhido aleatoriamente em 3 coletas foi submetido a extrações utilizando como solventes extratores água e etanol, conforme recomendado pela Farmacopéia Brasileira 5ª edição, em diferentes concentrações demonstradas na TABELA 7 a fim de se obter o melhor extrato. Também foi testado como solvente extrator o metanol (TABELA 7). Para a obtenção dos extratos testes foi utilizado 1,0 g de droga vegetal seca e pulverizada e 25 mL de solvente especificado (Farmacopéia Br. 5ª ed.). Essa mistura foi submetida a extração em ultrassom por 30 minutos, e filtrada. O solvente foi

eliminado em rota evaporador a 35 °C, e o remanescente foi liofilizado para padronização e estabilidade do mesmo, sendo armazenado em freezer -20 °C até o momento das análises.

Para os testes do melhor sistema extrator, foi utilizado o exemplar 3 nas coletas 1, 2 e 3, referentes aos meses de Novembro/2016 (1/3), Dezembro/2016 (2/3) e Janeiro/2017 (3/3), respectivamente, e os solventes foram testados conforme a TABELA 5 a seguir:

TABELA 5 - QUANTIDADES DE DROGA VEGETAL E SOLVENTES UTILIZADOS NO PREPARO DOS EXTRATOS.

Exemplar 3	Solvente extrator	Concentração		
		H ₂ O	Etanol	Metanol
4 g de 1/3, 2/3 e 3/3	1	30%	70%	0%
4 g de 1/3, 2/3 e 3/3	2	10%	90%	0%
4 g de 1/3, 2/3 e 3/3	3	30%	0%	70%
4 g de 1/3, 2/3 e 3/3	4	10%	0%	90%

FONTE: O Autor (2017).

Os extratos secos foram diluídos em proporção 1:1, v/v cada um no seu solvente extrator e as amostras foram analisados em um cromatógrafo à líquido de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo (Waters Xevo™ TQD), equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI).

Após a obtenção dos cromatogramas foram utilizadas as áreas dos picos de cada alcaloide em comparação com a área do padrão interno de cafeína para identificar a melhor condição de extração.

4.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

O método foi desenvolvido utilizando-se amostras de alcaloides previamente purificados e armazenadas em freezer -20 °C. As análises foram conduzidas em cromatógrafo à líquido de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo do modelo Waters Xevo™ TQD (UPLC – MS/MS), equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI).

4.5.1 INJEÇÃO DIRETA

O primeiro passo para o desenvolvimento do método é a identificação e checagem do sinal dos alcaloides por infusão direta no espectrômetro de massas. A

infusão foi realizada no modo positivo de ionização e os parâmetros do mesmo foram ajustados a fim de se obter a seletividade e sensibilidade necessárias. Para isso, as soluções de trabalho dos alcaloides foram preparadas na concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ utilizando como diluente uma mistura de metanol:água (80:20, v/v) com adição de 0,1% de ácido fórmico, usado como aditivo para melhorar a condição de ionização dos analitos. Foi injetada uma quantidade de $5 \mu\text{L}$ de cada solução separadamente, e os parâmetros testados foram: voltagem do capilar de +2 a 5 kV; temperatura da fonte de 150 a 500 °C; voltagem do cone de 20 a 80 V; temperatura do gás de dessolvatação de 150 a 500 °C; e fluxo do gás de dessolvatação de 300 a 800 L/Hr. Os dados foram obtidos no modo *full scan*, com janela de massas de 100 a 500 Da, por 30 segundos.

Após a escolha dos melhores parâmetros para os íons precursores de cada alcaloide e, foram realizados experimentos de MS/MS para a determinação dos íons fragmentos a serem monitorados nas análises de Multiple Reaction Monitoring (MRM), descritas posteriormente, e otimização da energia de colisão para detecção dos respectivos íons fragmentos. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software MassLynx™ 4.1 (Waters).

4.5.2 OTIMIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA

Para a realização do experimento de MRM foram preparadas soluções da mistura de todos os alcaloides, a fim de se otimizar os parâmetros da cromatografia e para a identificação do tempo de retenção dos mesmos. Estas primeiras análises foram realizadas utilizando como parâmetros iniciais: Coluna C18 (ACQUITY UPLC BEH C18 $1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \times 50 \text{ mm}$, Waters) operando a 30 °C; Fase móvel composta por solução aquosa acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) em um fluxo de $0,3 \text{ mL}/\text{min}$ em um gradiente de 5% de B de 0 a 2 minutos, 30% de B de 2 a 4 minutos e 5% de B de 4 a 5 minutos; com um volume de injeção de $1 \mu\text{L}$. As soluções foram injetadas em concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ diluída em solução de água com adição de 0,1% de ácido fórmico:acetonitrila (95:5, v/v). (BAJPAI et al., 2016). A partir destes parâmetros, o método foi modificado e otimizado.

Após a otimização dos parâmetros do LC-MS/MS, na qual foram obtidos os tempos de retenção dos padrões, as transições adequadas para serem utilizadas no experimento de MRM e todos os parâmetros da cromatografia, o mesmo foi realizado para o padrão interno de cafeína. Por fim, obteve-se o método pronto para as análises

de quantificação, onde a concentração dos alcaloides foi calculada referente a concentração do padrão de cafeína adicionado as amostras.

Para a montagem do método completo de MRM as substâncias Anonaina, Normantenina e Xilopina (as quais não foi possível realizar as análises com as substâncias isoladas), os parâmetros foram definidos após escolhido o melhor solvente extrator e desenvolvido o método. Sendo assim, uma amostra de extrato em concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ com adição de 500 ng.mL^{-1} de cafeína foi injetada e com base dos dados de fragmentação encontrados na literatura os parâmetros do método de MRM para estas substâncias foi definido.

4.6 ANÁLISE DE SAZONALIDADE

Para a realização das análises de sazonalidade, foi realizada uma análise visual de todos os exemplares no período das coletas, bem como análise do clima da região neste período que foi comparado com um levantamento dos dados climáticos do Estado do Paraná nos últimos anos. Em seguida os dados de quantificação dos alcaloides presentes nas folhas de *Annona rugulosa* foram correlacionados aos dados climáticos da região neste período.

4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUANTITATIVO

A realização da validação de uma metodologia analítica tem como objetivo certificar que esta é apropriada para a finalidade pretendida, devendo garantir, experimentalmente, que a mesma atenda aos requisitos necessários para as quais foi designada, proporcionando a confiabilidade dos resultados. (BRASIL, 2017; FDA, 2015; ICH, 2005).

A RDC 166 de 24 de julho de 2017 estabelece os critérios para validação de métodos analíticos, sendo esta aplicada a métodos analíticos quantitativos, onde são analisados os limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, linearidade e efeito matriz, todos conforme descritos a seguir:

4.7.1 LINEARIDADE

Para o ensaio de linearidade, foi realizada uma curva utilizando o padrão interno de cafeína em solução acetonitrila:água:ácido fórmico (8:92:0,1, v/v/v) nas concentrações de 5 ng.mL⁻¹, 250 ng.mL⁻¹, 750 ng.mL⁻¹, 1500 ng.mL⁻¹ e 2000 ng.mL⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

4.7.2 LIMITE DE DETECÇÃO

Para esta análise foi utilizada uma amostra dos alcaloides isolados em diversas concentrações. Estas amostras foram diluídas várias vezes a fim de que seja detectada a menor concentração dos analitos fornecendo uma relação sinal ruído de 2:1 (pico:linha de base).

4.7.3 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LQ) também pode ser determinado por meio da relação sinal/ruído. Neste caso, foi determinado como sendo o limite de quantificação aquela concentração que produziu relação, no mínimo, 10 vezes maior que o ruído da linha de base. (BRASIL, 2017). Sendo assim para esta análise foi utilizada uma amostra dos alcaloides isolados em diversas concentrações. Estas amostras foram diluídas várias vezes a fim de que seja detectada a menor concentração dos analitos que forneçam uma relação sinal ruído de 10:1 (pico:linha de base).

4.7.4 PRECISÃO

Nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária as concentrações utilizadas foram 5 ng.mL⁻¹, 750 ng.mL⁻¹ e 2000 ng.mL⁻¹ de padrão interno de cafeína. Os ensaios foram realizados em quintuplicata de cada concentração.

Como critério de aceitação tem-se que o método é preciso desde que apresente desvio padrão de no máximo 15%.

4.7.5 EXATIDÃO

Para o teste de exatidão foram utilizadas amostras do extrato escolhido em concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ fortificadas com padrão interno de cafeína utilizando 3 concentrações, sendo 1 concentração mínima, 1 média e 1 máxima, em triplicata cada uma das concentrações, contemplando as 9 determinações. As concentrações utilizadas foram 5 ng.mL^{-1} , 750 ng.mL^{-1} e 2000 ng.mL^{-1} de padrão de cafeína.

4.7.6 EFEITO MATRIZ

Para o ensaio do efeito matriz, foi realizada uma curva utilizando o padrão interno de cafeína em solução nas concentrações de 5 ng.mL^{-1} , 250 ng.mL^{-1} , 750 ng.mL^{-1} , 1500 ng.mL^{-1} e 2000 ng.mL^{-1} e, posteriormente uma curva utilizando o extrato ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) fortificado com o padrão interno de cafeína nas mesmas concentrações. As análises foram realizadas em triplicata.

Após a realização das análises, os coeficientes e equação das retas foram comparados, sendo o teste do paralelismo realizado utilizando-se o programa estatístico Action Stat Pro[®] (Equipe Estatcamp, 2014, Software Action. Estatcamp).

4.8 ANÁLISES QUANTITATIVAS

Após o desenvolvimento do método, o mesmo foi aplicado para a quantificação dos alcaloides presentes nos extratos brutos de folhas de *A. rugulosa*.

Os extratos liofilizados obtidos com o sistema extrator 2 (etanol:água (80:20, v/v)), definido como melhor solvente extrator, foram ressuspendidos e diluídos em solução acetonitrila:água:ácido fórmico (8:92:0,1, v/v/v), a fim de se obter uma concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. A estas soluções, foi adicionada uma quantidade de 500 ng.mL^{-1} de padrão de cafeína. Para o preparo das amostras para as análises de quantificação, os solventes utilizados foram definidos após as etapas anteriores de desenvolvimento do método e escolha do melhor solvente extrator. Além disso, optou-se por utilizar em cada amostra de extrato a quantidade de 500 ng.mL^{-1} de padrão de cafeína, pois esta concentração foi escolhida por apresentar, quando testada, boa intensidade de sinal, não afetando a identificação dos outros compostos em questão.

Os dados das análises quantitativas realizadas foram reportados em ng.mL^{-1} para 1 grama de material vegetal seco em 25 mL de solvente.

4.9 ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO BRUTO DE *A. rugulosa*

4.9.1 AMOSTRA UTILIZADA

Para os ensaios de avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa foi utilizado o extrato bruto obtido após a identificação do melhor sistema extrator (etanol:H₂O 90:10, v/v) para alcaloides, em diversas concentrações.

4.9.2 CULTIVO DE CÉLULAS

As linhagens celulares utilizadas (Hela e NIH/3T3) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro. As células de câncer cervical Hela foram cultivadas em meio RPMI (GIBCO, Baltimore, EUA), enquanto os fibroblastos murinos NIH/3T3 foram cultivados em DMEM (GIBCO, Baltimore, EUA). Nos dois casos, o meio de cultivo foi suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U.mL^{-1}) (GIBCO, Baltimore, EUA) e estreptomicina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (GIBCO, Baltimore, EUA).

As células foram mantidas em uma densidade de 1×10^5 células/ml de meio, à temperatura de 37 °C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.9.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO SAL DE TETRAZOLIUM (MTT)

O ensaio do ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo) foi realizado de acordo com metodologia proposta por Mosmann (1983), com algumas modificações.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (2500, 1500 ou 750 células/poço, para 24, 48 e 72 horas, respectivamente) em meio RPMI 1640 suplementado, seguido de incubação a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas para adesão celular. Transcorrido esse período, foi removido o meio de cultivo e

adicionado meio com diferentes concentrações de EB (50-500.000 ng.mL⁻¹), VC (0,8-20,62 ng.mL⁻¹), e associação EB (150; 300 e 450 ng.mL⁻¹) + VC (0,8-20,62 ng.mL⁻¹). Para o controle negativo, foi utilizado meio de cultivo com o veículo de diluição do extrato (etanol 0,5%). O tratamento foi realizado pelo período de 24, 48 e/ou 72 horas. Uma vez realizado o tratamento, o meio de cultura contendo os compostos, combinações ou veículo foi retirado e os poços foram lavados com tampão fosfato-salina (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 37 °C por três vezes. Em seguida, foi adicionada aos poços, 100 µL de uma solução de MTT (0,5 mg.mL⁻¹) diluído em meio de cultivo. As placas foram então incubadas por 2 horas. Após, o MTT foi retirado, sendo acrescentado aos poços 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazam. As placas foram homogeneizadas e lidas em espectrofotômetro multiskan FC (ThermoScientific, Massachusetts, EUA) a 570 nm.

O ensaio foi realizado em triplicata, sendo o valor de absorbância do controle negativo considerado 100% da redução do sal, ou seja, ou seja, 100% de viabilidade e/ou proliferação celular.

4.9.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO VERMELHO NEUTRO (VN)

O ensaio do ensaio do VN foi realizado de acordo com metodologia proposta por Lowik e colaboradores (1993), com algumas modificações.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (750 células/poço) em meio RPMI 1640 suplementado, seguido de incubação a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas para adesão celular. Decorrido o período de 24 horas, foi removido o meio de cultivo e adicionado meio com diferentes concentrações de EB (50-25000 ng.mL⁻¹), VC (0,8-20,62 ng.mL⁻¹), e associação EB (150; 300 e 450 ng.mL⁻¹) + VC (0,8-20,62 ng.mL⁻¹). Para o controle negativo, foi utilizado meio de cultivo com o veículo de diluição do extrato (etanol 0,5%). O tratamento foi realizado pelo período de 72 horas. Uma vez realizado o tratamento, o meio de cultura contendo os compostos, combinações ou veículo foi retirado e os poços foram lavados com tampão fosfato-salina (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 37° C por três vezes. Posteriormente, foi adicionado aos poços, uma solução de VN (0,05 mg.mL⁻¹ 100 µL/poço) diluído em meio de cultivo. A placa foi novamente incubada em estufa por 2 horas. Após o tempo de incubação, a solução contendo VN foi retirada e acrescentou-

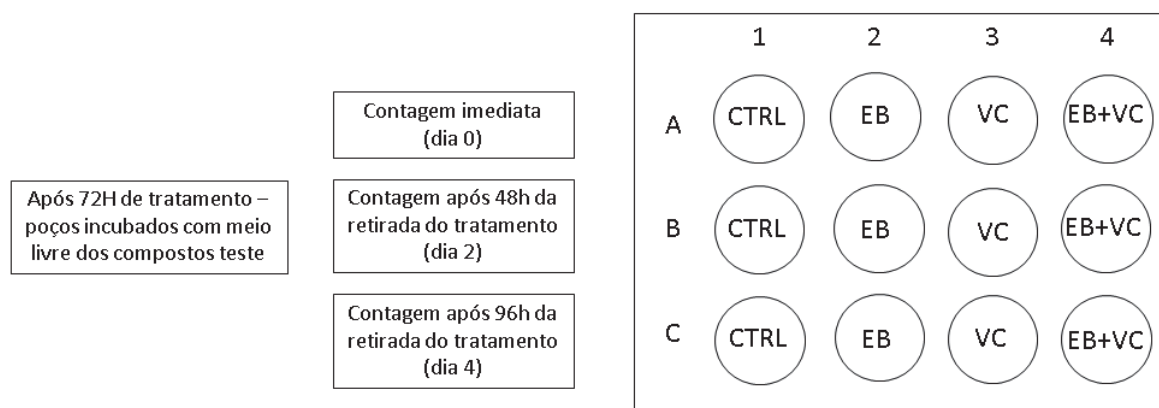
se aos poços uma solução de NaH_2PO_4 0,05M em etanol 50% (100 μL /poço). A placa foi homogeneizada e lida por espectrofotômetro com leitor de placas Multiskan a 540 nm.

Os valores de absorvância do controle negativo foram considerados como 100% de redução de incorporação do sal, ou seja, 100% de viabilidade e/ou proliferação celular.

4.9.3 ENSAIO DE CONTAGEM DE CÉLULAS

As células Hela foram plaqueadas (cada uma) em placas de 12 poços. O plaqueamento foi realizado com densidade celular de 1500 células por poço, seguido de incubação em estufa (37 °C) por 24 h para adesão celular. Após a incubação, o meio foi removido e as células tratadas por 72 h com EB (300, 450 e 750 ng.mL^{-1}), VC (8,25 ng.mL^{-1}) e associação VC (8,25 ng.mL^{-1}) + EB (450 ng.mL^{-1}) e/ou veículo (etanol 0,5 %). Realizou-se uma contagem do número de células imediatamente após 72 h de tratamento, conforme esquema presente na FIGURA 9. Tal contagem foi considerada como dia 0, e foi efetuada para caracterizar a resposta imediata das células ao extrato. Em relação aos demais poços, o tratamento foi retirado e estes foram lavados com PBS e incubados com meio livre de compostos. Foram realizadas contagens 2 e 4 dias após a exposição aos tratamentos (FIGURA 6). Tais contagens foram efetuadas com o objetivo de verificar se o efeito citotóxico/antiproliferativo promovido por EB administrado isoladamente é persistente após a retirada dos tratamentos, além de verificar se este extrato é capaz de potencializar a ação persistente da vincristina. Todas as contagens foram realizadas utilizando-se hemocitômetro.

FIGURA 6 – ESQUEMA DE CONTAGEM DE CÉLULAS APÓS 72 h DE TRATAMENTO



Fonte: Dados do Autor (2018).

4.9.4 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS – ENSAIO CLONOGÊNICO

As células Hela foram plaqueadas em placas de 24 poços em densidade de 100 células por poço, seguido de 24 horas de incubação em estufa (37 °C). Após esse período, as células foram tratadas com o extrato teste (150-750 ng.mL⁻¹), VC (8,25 ng.mL⁻¹), e associação EB (300 e 0,450 ng.mL⁻¹) + VC (8,25 ng.mL⁻¹), por 72 horas. Como controle negativo foi utilizado o veículo de diluição do extrato (etanol 0,5%).

Após a incubação, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS por três vezes. As células foram incubadas com meio livre de compostos até verificação da formação de colônias (presença de uma ou mais colônias com aproximadamente 50 células).

Visualizadas as colônias, estas foram fixadas com metanol 70%, coradas com solução de cristal violeta 0,2% e fotografadas para posterior quantificação das mesmas. As imagens foram analisadas pelo software Schiefer Counter desenvolvido e descrito por Santos, 2018. Os resultados foram expressos pela área ocupada pelas colônias em um poço com superfície para crescimento das células de 1,93 cm².

Para a execução do ensaio clonogênico com a linhagem NIH-3T3, procedeu-se da mesma forma descrita com as células Hela, entretanto, as células foram tratadas apenas com EB nas concentrações de 300 e 600 ng.mL⁻¹.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados dos ensaios de atividade citotóxica e/ou antiproliferativa foi realizada através da análise de variância ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo $p < 0,05$.

Para as análises estatísticas dos dados de quantificação, para comparação das quantidades obtidas em cada mês, foram realizadas análise de variância *One-Way* (*One-Way* ANOVA) utilizando o software GraphPad Prisma® 6, e posteriormente foi realizada a análise de Componentes Principais (PCA) utilizando o software Matlab® 2017b empregando o PLS-Toolbox 8.6.

5 RESULTADOS/ANÁLISE DOS DADOS

5.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS E PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DOS ALCALOIDES

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados através dos experimentos de injeção direta dos alcaloides isolados em concentração de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Primeiramente, foram realizadas análises de varredura (*full scan*), onde foram observados os íons protonados (TABELA 7). Para a obtenção desses espectros os parâmetros foram testados e na TABELA 6 são mostrados os valores utilizados.

TABELA 6 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DEPENDENTES DE VOLTAGEM DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.

Parâmetros	Faixa	Valores utilizados
Voltagem do capilar	2 a +5 kV	3.5 kV
Voltagem do cone	20 a 80 V	33 V
Fluxo do gás de dessolvatação	300 a 800 L/hr	600 L/HR
Temperatura do gás de dessolvatação	150 a 500 °C	349 °C
Temperatura da fonte	150 a 500 °C	150 °C
Faixa de massas	100 a 500 Da	100 a 500 Da

FONTE: Dados do autor (2017).

Após a obtenção dos íons protonados de cada composto, foi realizado o experimento de MS/MS para a obtenção do perfil de fragmentação dos mesmos. Estes valores de m/z estão representados na TABELA 7.

TABELA 7 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DOS ALCALOIDES DE *A. rugulosa*.

Alcaloide	[M+H] ⁺	Íon Fragmento	
Asimilobina (C ₁₇ H ₁₇ O ₂ N)	m/z 268	m/z 251	m/z 219
Nornuciferina (C ₁₈ H ₁₉ O ₂ N)	m/z 282	m/z 265	m/z 250
Liriodenina (C ₁₇ H ₉ O ₃ N)	m/z 276	m/z 218	m/z 248
Lanuginosina (C ₁₈ H ₁₁ O ₄ N)	m/z 306	m/z 291	m/z 263
Litseferina (C ₁₈ H ₁₇ O ₄ N)	m/z 312	m/z 295	m/z 263
Isoboldina/ Norisocoridina (C ₁₉ H ₂₁ O ₄ N)	m/z 328	m/z 297	m/z 265
Reticulina (C ₁₉ H ₂₃ O ₄ N)	m/z 330	m/z 192	m/z 175
N-Metilcoclorina/ Magnococlorina (C ₁₉ H ₂₃ O ₄ N)	m/z 300	m/z 175	m/z 137

FONTE: Dados do Autor (2017).

Estes dados de fragmentação obtidos por meio de infusão direta, corroboram os dados da literatura, onde são descritos os prováveis mecanismos de fragmentação destes alcaloides. (DA SILVA et al., 2012; WANG; MINGXUN, 2016).

5.2 OTIMIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA

Nesta etapa foram realizados os experimentos de MRM utilizando soluções de mistura dos alcaloides em diferentes concentrações, e uma solução de 500 ng.mL⁻¹ do padrão interno de cafeína para otimização dos parâmetros do LC-MS/MS, utilizando como ponto de partida os parâmetros cromatográficos de um método já descrito. (BAJPAI et al., 2016). Além destes dados, para a montagem do método de MRM alguns parâmetros são necessários como: a transição que será monitorada, energia de colisão, voltagem do cone, tempo de retenção e *dwell time*.

Estes parâmetros estão descritos na TABELA 8, sendo que para a primeira análise, foi utilizado um *dwell time* de 0,200 como ponto de partida.

TABELA 8 - PARAMETROS UTILIZADOS NO MÉTODO DE MRM

Substância de Referência	Transição monitorada (m/z)	Energia de Colisão (V)	Voltagem do cone (V)
Asimilobina	268 → 219	15	55,43
Nornuciferina	282 → 265	18	49,08
Liriodenina	276 → 218	33	63,74
Lanuginosina	306 → 291	30	54,95
Litseferina	312 → 295	14	54,95
Isoboldina/Norisocoridina	328 → 297	19	52,99
Reticulina	330 → 192	22	54,95
N-Metilcoclorina/Magnococlorina	300 → 107	23	54,46
Cafeína	195 → 138	20	50,00

FONTE: Dados do Autor (2017).

Realizando injeções de uma mistura dos alcaloides em concentração inicial de 300 ng.mL⁻¹ em solução de água (0,1% ácido fórmico):acetonitrila (95:5, v/v) utilizando os parâmetros descritos. (BAJPAI et al., 2016), os picos referentes aos alcaloides começam a aparecer quando a proporção de fase B aumenta de 5% para 30%, com base nisso, os próximos testes foram com a proporção de fase móvel diferente deste.

Foram realizadas tentativas utilizando um gradiente com 8% de fase B de 0 a 2 minutos, 45% de B de 2 a 4 minutos e 8% de B de 4 a 5 minutos; um gradiente de 8% de B de 0 a 1 minuto, 45% de B de 1 a 3 minutos e 8% de B de 3 a 4 minutos; e

um método isocrático com 45% de fase B e 55% de fase A. Ao utilizar um método isocrático, os picos não foram identificados na corrida, e ao diminuir a corrida para 4 minutos, iniciando com a maior proporção de B (45%) em 1 minuto, alguns picos co-eluíram e outros não foram identificados. Mudanças no fluxo também foram realizadas, porém sem grandes ganhos.

O método cromatográfico mais adequado observado foi aquele em que utilizou-se um gradiente de 8% de B de 0 a 1,5 minutos, 20% de B de 1,5 a 3 minutos, 25% de B de 3 a 5 minutos, de 30% de B de 5 a 6 minutos, de 45% de B de 6 a 7 minutos e de 7 a 10 minutos uma concentração de 8% de B. Após estas mudanças foi feita uma nova solução mix dos alcaloides com uma concentração de 1500 ng.mL⁻¹. A aquisição dos dados ocorreu apenas até 8 minutos, sendo que os últimos dois minutos auxiliaram na limpeza da coluna e estabilização da mesma.

Posteriormente, foram realizados testes utilizando fase móvel com adição de 0,1% de ácido fórmico tanto em A quanto em B, além de testadas ambas as fases sem adição de ácido fórmico.

Também foi realizada a injeção de um branco de ACN para identificação do volume morto, o qual foi identificado em 0,4 min.

Após definidas estas condições da cromatografia, foram feitas injeções dos alcaloides isolados separadamente, em uma concentração de 1 mg.mL⁻¹ diluída em solução de água (0,1% ácido fórmico):acetonitrila (92:8, v/v), conforme o parâmetro inicial da corrida cromatográfica, para a obtenção do tempo de retenção de cada composto. Na TABELA 9 são mostrados os tempos de retenção de cada alcaloide, bem como o seu *dwell time* calculado a partir da largura do pico de cada padrão e do valor de *inter channel delay* do equipamento (neste caso: 0,003 segundos). Vale ressaltar que o *dwell Time* nada mais é que o período em que os íons serão monitorados, ou seja o tempo de aquisição (em segundos) para a detecção do sinal de cada íon, e que este é ajustado para que seja obtido o melhor formato de cada pico, evitando assim problemas de repetibilidade, linearidade, queda de sensibilidade e quantificação.

TABELA 9 - TEMPO DE RETENÇÃO E DWELL TIME DE CADA PADRÃO DE ALCALOIDE

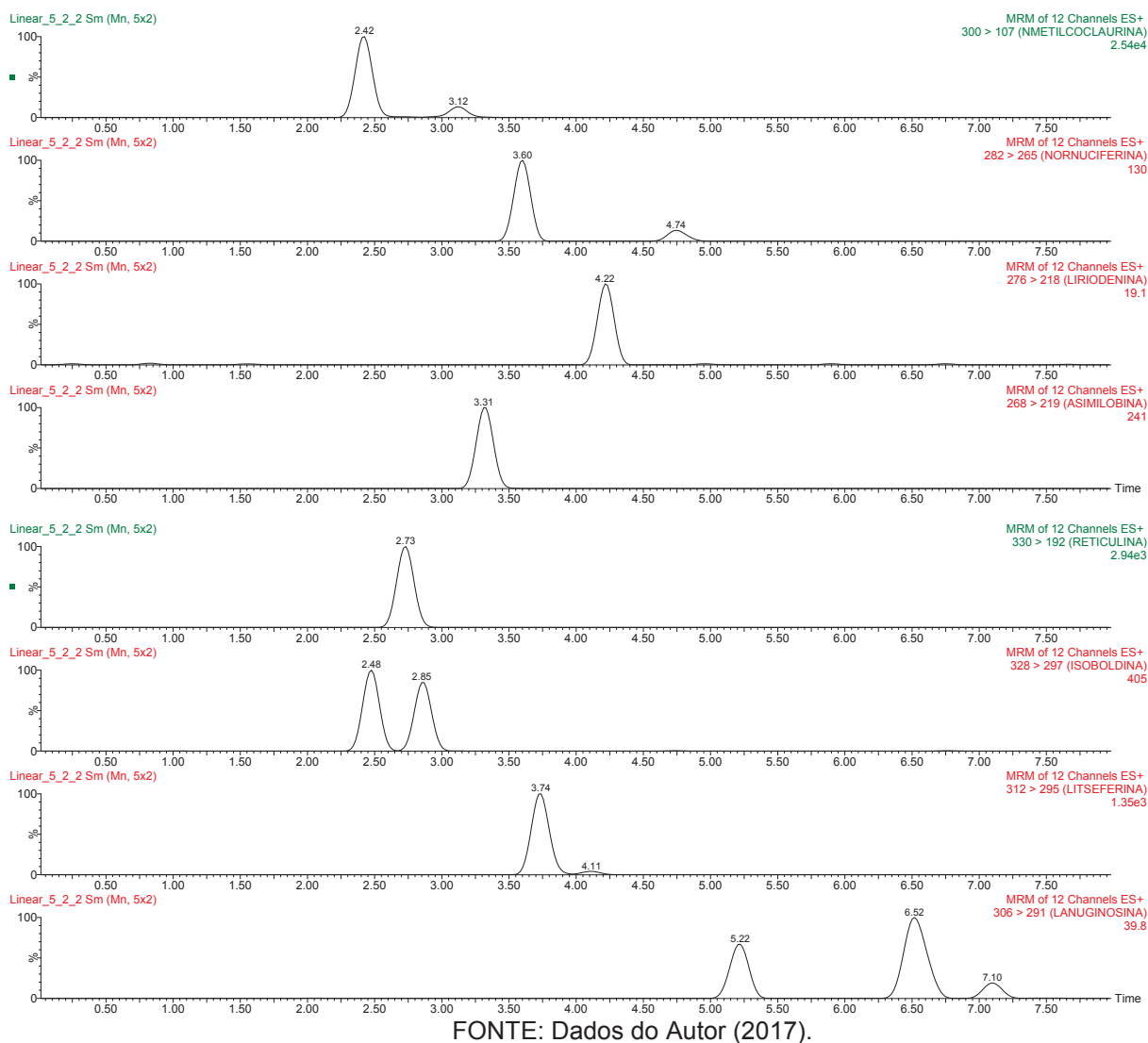
Padrão	Tempo de Retenção (min)	Dwell Time
Asimilobina	3,31	0,084
Nornuciferina	3,60	0,070
Liriodenina	4,22	0,070
Lanuginosina	5,22	0,090
Reticulina	2,73	0,061
N-Metilcocclaurina/Magnococclina	2,42	0,061
Litseferina	3,74	0,070
Isoboldina/Norisocoridina	2,48	0,090
Cafeína	2,02	0,200

FONTE: Dados do Autor. (2017).

Após todos estes testes, as condições ideais para estas análises foram definidas como: Fase móvel A (água) e B (acetonitrila) ambas com adição de 0,1% de ácido fórmico, em um fluxo de 0,3 mL/min com um gradiente de 8% de B de 0 a 1,5 minutos, 20% de B de 1,5 a 3 minutos, 25% de B de 3 a 5 minutos, de 30% de B de 5 a 6 minutos, de 45% de B de 6 a 7 minutos e de 7 a 10 minutos uma concentração de 8% de B; Coluna C 18 a 30 °C; volume de injeção de 1 µL; e utilizando para o MRM os dados das tabelas 9 e 10. Uma nova mistura foi preparada em concentrações de 1500 ng.mL⁻¹ e injetada utilizando estes parâmetros. O cromatograma extraído dos alcaloides desta mistura é mostrado na FIGURA 7.

Para os alcaloides que não foram testadas as substâncias químicas de referência (Anonaina, Xilopina e Nornantenina), após o desenvolvimento completo do método e obtenção do melhor sistema extrator, foram injetadas amostras e as mesmas foram testadas para que fossem definidos os parâmetros descritos anteriormente para estes alcaloides.

FIGURA 7 – CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DO EXPERIMENTO DE MRM DOS ALCALOIDES EM MISTURA (1500 ng.mL⁻¹) UTILIZANDO OS PARÂMETROS OTIMIZADOS



Após desenvolvido o método, este foi utilizado para a escolha do melhor sistema extrator, descrito a seguir.

5.3 ESCOLHA DA MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO

As pesquisas envolvendo produtos naturais na busca por novas substâncias e novos medicamentos a base destas vem crescendo muito nos últimos anos. Como já citado, as plantas são fonte de metabólitos com alto potencial biológico, os quais ainda são pouco estudados.

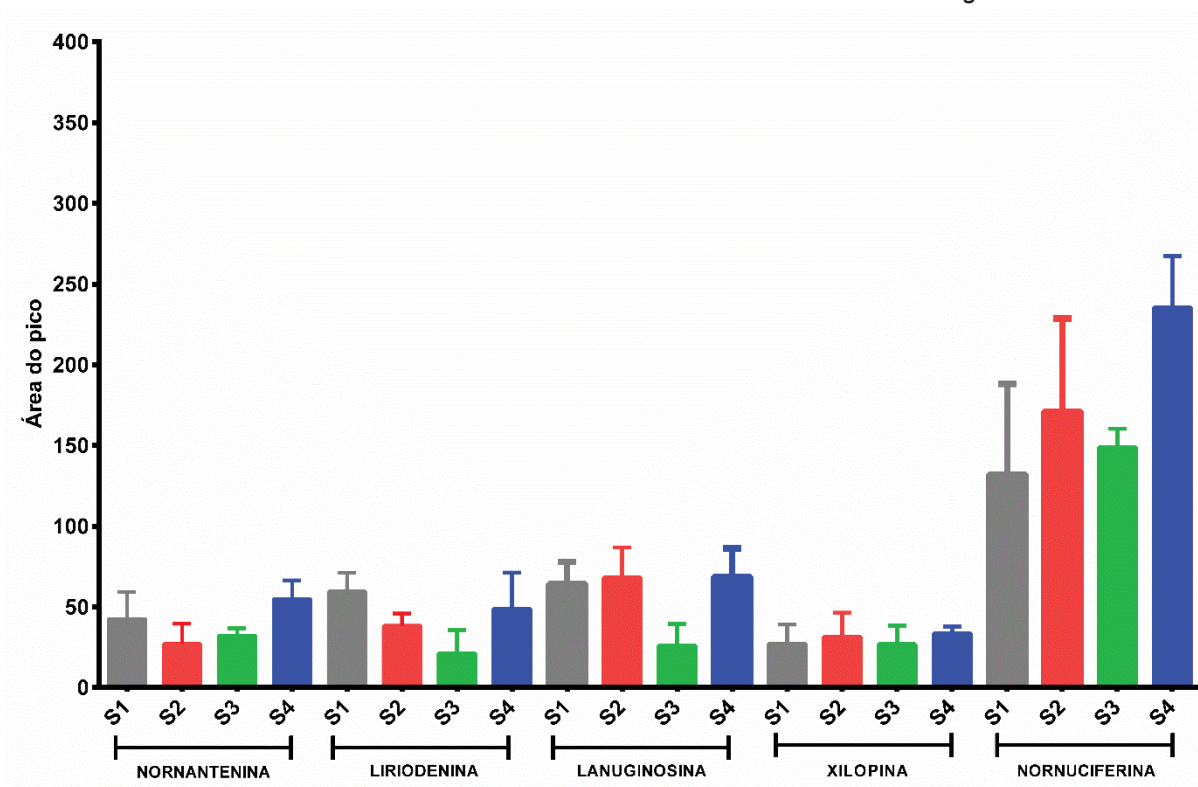
A fim de se obter um medicamento fitoterápico de alta qualidade proveniente de uma espécie com atividade biológica comprovada, alguns cuidados devem ser tomados.

Além das preocupações com a toxicidade dos solventes, bem como a influência do uso destes para o meio ambiente, o processo de extração, um dos primeiros passos das análises de produtos naturais, deve ser realizado de maneira adequada a fim de evitar problemas no resultado final da análise e no produto final obtido. Sendo assim, fatores como o solvente, a temperatura e o tempo de extração devem ser otimizados. (AZMIR et al., 2013). Para isto, diversos testes são realizados a fim de se obter o melhor extrato, e por fim este é padronizado. A padronização dos extratos é muito utilizada na indústria farmacêutica de fitoterápicos e tem como finalidade garantir a qualidade e eficácia destes medicamentos.

Segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, o extrato seco, o qual foi produzido neste trabalho, é considerado tecnologicamente o mais viável para fins de produção em larga escala, devido à estabilidade física, química e microbiológica.

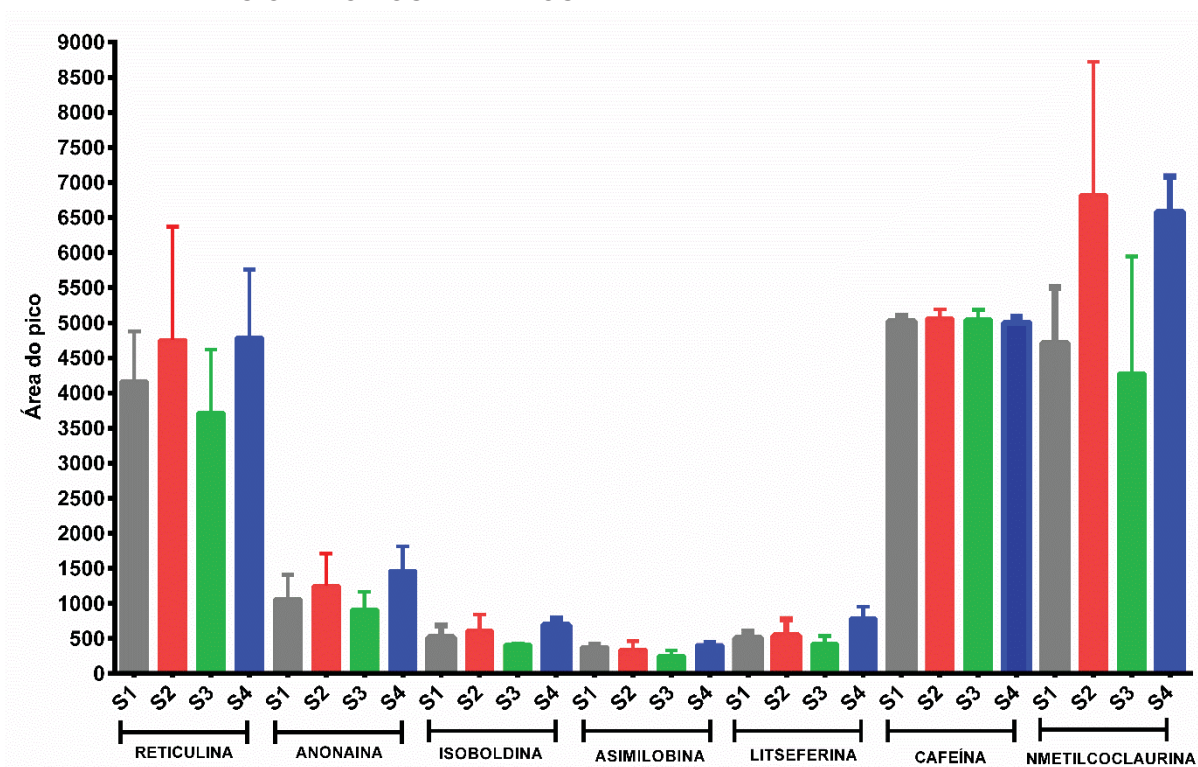
Para a produção deste extrato o parâmetro melhor solvente ou sistema extrator foi avaliado. Para escolha do melhor sistema extrator para as substâncias em análise, após a extração do material pulverizado de um exemplar em 3 coletas (exemplar 3, nas coletas 1, 2 e 3) com os 4 sistemas extratores, os extratos foram ressuspensos em fase móvel (acetonitrila:água:ácido fórmico (8:92:0,1, v/v/v)) a fim de se obter uma concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Estas soluções foram fortificadas com 500 ng.mL^{-1} de padrão de cafeína. Após prontas estas soluções, as análises foram realizadas, sendo que o volume de injeção foi de $1 \text{ }\mu\text{L}$. As médias das áreas dos picos de cada alcaloide foram comparadas para cada sistema extrator utilizando análise estatística *one-way* ANOVA.

FIGURA 8 – GRÁFICO DE COMPARAÇÃO DOS SOLVENTES EXTRATORES PARA OS ALCALOIDES MINORITARIOS ENCONTRADOS EM *Annona rugulosa*



Fonte: Dados do Autor (2017).

FIGURA 9 - GRÁFICO DE COMPARAÇÃO DOS SOLVENTES EXTRATORES PARA OS ALCALOIDES MAJORITARIO ENCONTRADOS EM *Annona rugulosa* E DA CAFEÍNA ADICIONADO AOS EXTRATOS



Fonte: Dados do Autor (2017).

Nas FIGURAS 8 e 9 é possível visualizar a média de área de pico de cada alcaloide para cada sistema extrator. Em relação aos dados da análise estatística observou-se que, os sistemas extratores apresentaram diferença significativa na extração dos alcaloides nornantenina, liriodenina, lanuginosina, nornuciferina, litseferina e N-metilcoclaurina/magnococlina, os quais apresentaram na análise de variância valor de $p < 0,05$. Já para os alcaloides reticulina, anonaina, isoboldina/norisocoridina, assimilobina e xilopina, os sistemas extratores extraíram estes alcaloides de forma equivalente, sendo que na análise de variância os sistemas extratores não apresentaram diferença significativa entre eles, sendo o valor de $p > 0,05$.

Analisando em conjunto os valores de área, o gráfico e os valores de p , os dados demonstram que os sistemas extratores mais efetivos foram os sistemas 2 e 4, quando comparados os 4 sistemas extratores para cada alcaloide isoladamente. Nestes sistemas extratores foi utilizada mistura dos solventes etanol:água (90:10, v/v) e metanol:água (90:10, v/v) para os sistemas 2 e 4 respectivamente. Uma vez que a Farmacopeia Brasileira 5ª edição preconiza que os extratos sejam feitos com água ou etanol, ou mistura dos dois; bem como levando-se em consideração, o custo, e a toxicidade apresentada pelo metanol, o sistema extrator 2 foi escolhido para o preparo dos extratos.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUANTITATIVO

Após desenvolvido o método e escolhido o melhor sistema extrator, como não foi possível realizar as análises das substâncias isoladas dos alcaloides Anonaina, Xilopina e Nornantenina, uma amostra de extrato foi injetada utilizando as mesmas condições desenvolvidas e foram testados os parâmetros a fim de se obter o método de MRM para estas substâncias. Os parâmetros definidos estão na tabela a seguir:

TABELA 10 - PARÂMETROS ENCONTRADOS PARA ANONAINA, XILOPINA E NORNANTENINA

Padrão	Tempo de Retenção (min)	Dwell Time	Transição monitorada	Energia de Colisão (V)	Voltagem do cone (V)
Anonaina	4,69	0,060	266 - 249	20	50
Xilopina	3,11	0,060	296 - 281	20	50
Nornantenina	3,81	0,070	326 - 263	20	50

FONTE: Dados do Autor (2017).

Em seguida, com o método completo, prosseguiu-se com a realização dos testes para definição dos limites de quantificação e detecção, precisão, exatidão e efeito matriz.

5.4.1 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LIQ) foram estimados através da relação sinal/ruído. Para estes testes foram utilizados os alcaloides isolados em diversas concentrações até a obtenção do menor pico detectável, sendo que o LD foi definido por relação sinal/ruído de no mínimo 2/1 enquanto que o LIQ foi definido pela relação sinal/ruído de no mínimo 10/1 em triplicata com Desvio Padrão Relativo <20%.

O LD determinado foi determinado em 0,5 ng.mL⁻¹ para a assimilobina, reticulina, litseferina e lanuginosina; 0,8 ng.mL⁻¹ para a isoboldina; 0,09 ng.mL⁻¹ para a n-metilcoclorina; e 1 ng.mL⁻¹ para a lanuginosina, todos com uma relação sinal/ruído acima de 3,82 onde o Desvio Padrão Relativo foi menor que 20% entre a triplicata.

O LQ também foi definido com os alcaloides, onde o desvio padrão relativo foi menor que 20% entre a triplicata. O LQ determinado pelo método foi de 0,5 ng.mL⁻¹ para a lanuginosina; 0,09 ng.mL⁻¹ para a n-metilcoclorina; 0,8 ng.mL⁻¹ para a reticulina e isoboldina; 1 ng.mL⁻¹ para a assimilobina e 1,25 ng.mL⁻¹ para a nornuciferina, liriodenina e litseferina, todos com uma relação sinal/ruído acima de 10,80.

Após definidos os limites, foram calculados os pontos utilizados nas próximas análises, sendo eles 5 ng.mL⁻¹, 250 ng.mL⁻¹, 750 ng.mL⁻¹, 1500 ng.mL⁻¹, 2000 ng.mL⁻¹, onde:

5.4.2 PRECISÃO E EXATIDÃO

Para os ensaios de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão foram utilizadas as amostras contemplando valores de concentração baixo (5 ng.mL⁻¹), médio (750 ng.mL⁻¹) e alto (2000 ng.mL⁻¹). As amostras foram realizadas individualmente em quintuplicata, em dois dias, por dois analistas diferentes. Os resultados destes ensaios estão representados nas tabelas a seguir:

TABELA 11 – PRECISÃO E EXATIDÃO DIA 1

Amostra	Concentração Teórica (ng.mL ⁻¹)	Concentração Prática (ng.mL ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)	Exatidão (%)
Baixa concentração	5	5,0	2,66	100,00
Média Concentração	750	749,7	4,86	99,96
Alta Concentração	2000	2000,3	2,92	100,01

FONTE: Dados do Autor (2017).

TABELA 12 – PRECISÃO E EXATIDÃO DIA 2

Amostra	Concentração Teórica (ng.mL ⁻¹)	Concentração Prática (ng.mL ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)	Exatidão (%)
Baixa concentração	5	4,97	12,70	99,48
Média Concentração	750	755,9	9,11	100,79
Alta Concentração	2000	1994,3	6,76	99,71

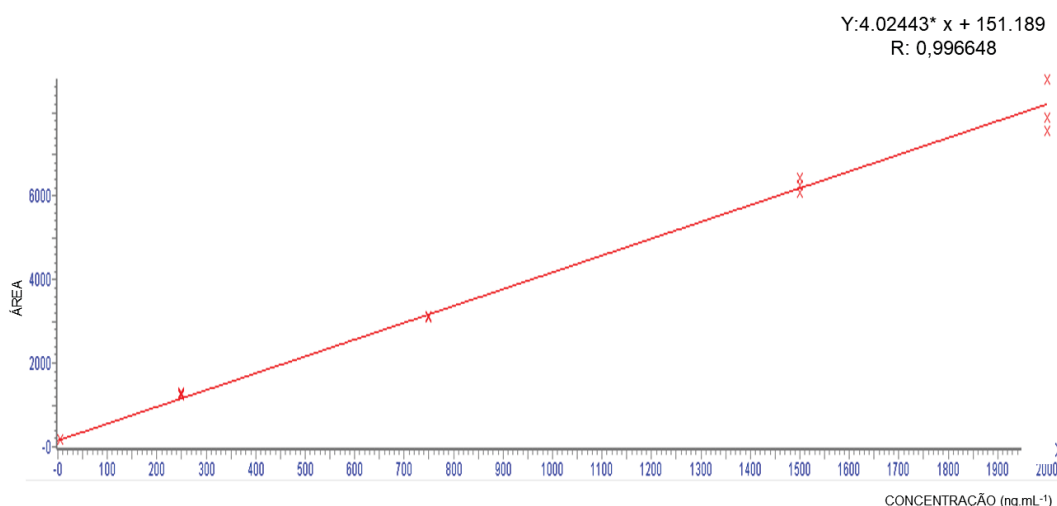
FONTE: O Autor (2018).

A exatidão foi calculada com relação a concentração teórica. Com estes dados, o método desenvolvido pode ser considerado preciso e exato, com valores de DPR entre 2,66% e 12,70%.

5.4.3 LINEARIDADE E EFEITO MATRIZ

Para o ensaio de linearidade, foi realizada a curva do padrão de cafeína em solução nas concentrações determinadas anteriormente. A curva juntamente com o valor de R e desvio padrão de cada concentração estão demonstradas na FIGURA 9 e TABELA 13.

FIGURA 10 LINARIDADE



FONTE: Dados do Autor (2017).

TABELA 13 – DESVIO PADRÃO DO ENSAIO DE LINEARIDADE

Concentração Teórica (ng.mL ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)
5	4,32
250	0,00
750	0,10
1500	2,33
2000	6,26

FONTE: Dados do Autor (2017).

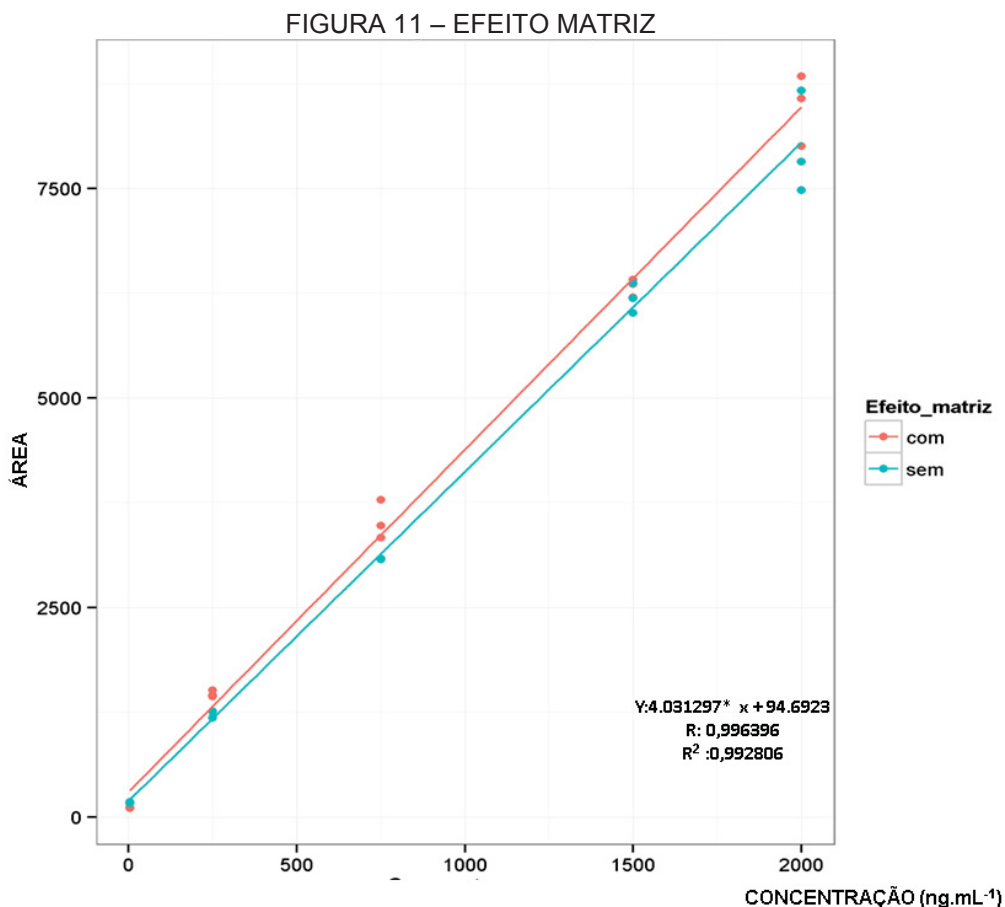
Em espectrometria de massas alguns analitos podem sofrer a interferência de outros de modo que a ionização seja reduzida ou aumentada, apresentando os efeitos de supressão ou intensificação de ionização. Estes efeitos são muito comuns e podem surgir devido à presença desses interferentes na matriz em questão, portanto, uma análise deste efeito deve ser realizada.

As curvas para o efeito matriz foram construídas com base no descrito anteriormente, e posterior a elaboração da curva, foi realizado o teste do paralelismo para confirmar se existe ou não interferência da matriz (extrato) na quantificação dos analitos.

O teste do efeito matriz consistiu em comparar o paralelismo entre as duas retas obtidas separadamente, através do conjunto de dados da área dos picos e os coeficientes angulares, obtidos tanto na análise em solução do padrão de cafeína, quanto na análise da matriz fortificada com este padrão.

Quando se obtém um valor de p menor que 0,05, considerado um nível de significância de 95%, a hipótese nula é rejeitada, tendo assim efeito dos constituintes da matriz. Já quando se obtém um valor de p maior que 0,05 a hipótese nula é aceita e não se tem efeito.

O teste do paralelismo foi realizado utilizando o programa Action Stat Pro, o qual forneceu um valor de p de 0.21, confirmando que a amostra não apresenta interferência dos constituintes da matriz através do paralelismo das retas conforme é demonstrado a seguir:



5.5 ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES

Além dos cuidados na obtenção dos extratos, conforme já citado, a fim de se obter análises satisfatórias e êxito nas pesquisas na área de produtos naturais que visam a descoberta de novos medicamentos, os dados climáticos, as características de solo e o cultivo destas plantas deve ser estudado e adequado.

No ano de 2006 o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) publicou um documento com orientações gerais para o cultivo de plantas medicinais. Nesse documento são descritas as Boas Práticas de cultivo e colheita, fatores que influenciam na produção dos princípios ativos, bem como métodos de limpeza, secagem, armazenamento e comercialização destas plantas. Para a indústria de fitoterápicos estas orientações são de grande importância para a seleção adequada das espécies que serão utilizadas na fabricação dos medicamentos descobertos a partir de pesquisas com os metabólitos presentes nas mesmas.

Algumas recomendações feitas pelo MAPA são importantes ressaltar, como, a influência dos fatores ambientais, já descrito anteriormente, a qual pode ou não

alterar composição dos metabólitos produzidos pela planta. Um exemplo importante é a influência da latitude na produção de alcaloides, onde as plantas cultivadas em latitude Sul podem apresentar maior teor deste metabolito em comparação a latitude Norte. Também vale citar os cuidados com o solo, adubação e irrigação, garantindo a disponibilidade de nutrientes para a planta. Deve-se também tomar cuidado e não utilizar agrotóxicos nestes cultivos, pois estes podem alterar a composição das plantas, além de deixar resíduos.

Portanto, durante todas as coletas, realizou-se uma análise visual de todos os exemplares, na qual foram avaliadas a incidência solar sobre as mesmas, as características foliares, e os dados climáticos do período que antecedeu os dias das coletas, para posterior discussão e comparação da influência destes fatores com os dados de quantificação obtidos

Em geral, os exemplares não apresentaram grandes diferenças ao longo dos meses coletados, porém, alguns eventos que poderiam interferir nas análises finais foram observados, como a presença de flores pequenas em todos os exemplares durante as coletas 1 e 2, referentes aos meses de novembro e dezembro respectivamente.

Foram observados frutos pequenos desde a coleta 2 (dezembro) até a coleta 6 (abril). Também foi notado que o exemplar 1, em todas as coletas, ficava em local de maior incidência solar que os demais exemplares.

A coleta 4 (fevereiro) foi realizada em períodos de alta temperatura (30 °C), já a coleta 7 (maio) em períodos de baixa temperatura (10 °C) e muita umidade. Nas coletas 8 (junho) e 9 (julho) observou-se bastante fragilidade das folhas e coloração amarelada das mesmas para todos os exemplares, devido ao período de baixas temperaturas (2° C) e geadas. A coleta 3 (janeiro) foi realizada em meio a um período chuvoso; e as coletas 10, 11 e 12 (agosto, setembro e outubro, respectivamente) foram realizadas em períodos de temperaturas mais controladas, em torno de 20 °C, porém nestas coletas observa-se a transição das folhas que estavam debilitadas devido ao período de temperaturas mais amenas, para folhas maiores e início da produção de flores e frutos. A seguir são demonstradas algumas destas informações registradas no momento das coletas:

FIGURA 12 – REGISTROS DAS PRINCIPAIS INFORMAÇÕES REFERENTES AS COLETAS

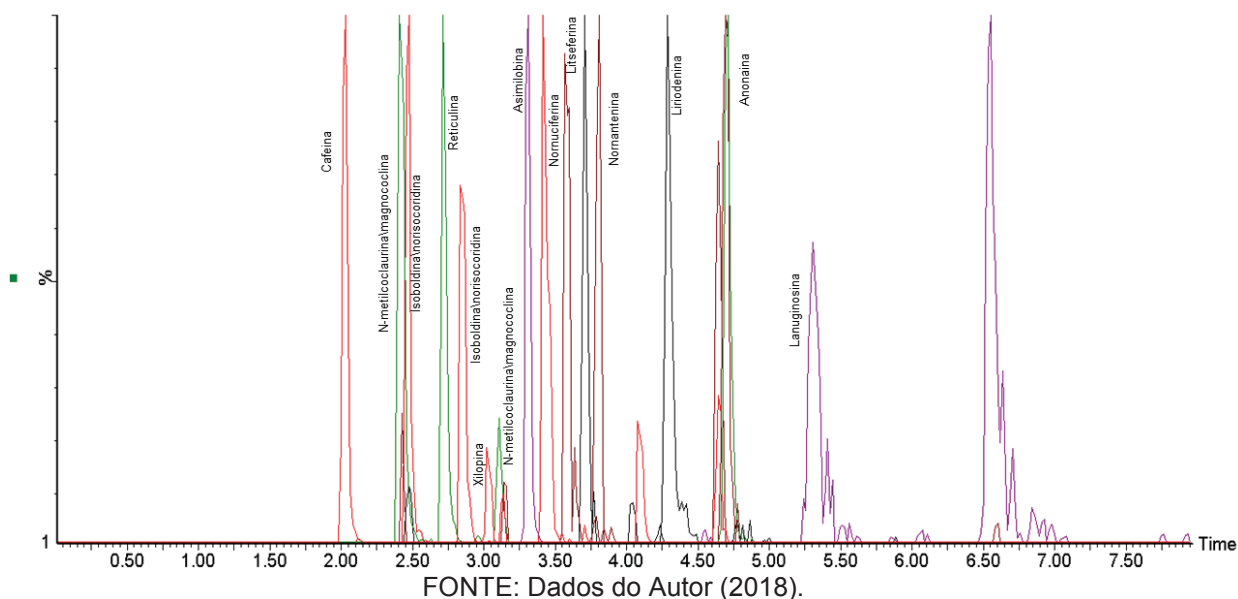


FONTE: Dados do Autor (2017-2018).

LEGENDA: A) Coleta 1 – Flores e folhas de *A. rugulosa*; B) Coleta 3 – Frutos de *A. rugulosa*; C) Coleta 8 – Folhas de *A. rugulosa* danificadas

Após finalizadas todas as etapas iniciais (coletas, preparo das folhas para o preparo dos extratos, escolha do melhor sistema extrator, obtenção dos extratos e otimização do método), os alcaloides presentes nos extratos brutos obtidos das 12 coletas de cada um dos 5 exemplares de *A. rugulosa* foram quantificados por LC-MS/MS utilizando-se o método desenvolvido. As concentrações dos alcaloides, relativas ao padrão de cafeína, foram calculadas pelo software TargetLynx®, e os resultados nos mostram em um primeiro momento, ao analisar os cromatogramas obtidos (FIGURA 13) e as concentrações obtidas (TABELA 14) que ao realizar uma comparação simples para cada alcaloide entre todos os extratos, as concentrações são muito baixas, sendo os alcaloides N-metilcoclaurina/magnococlina e reticulina presentes em maior concentração nos extratos e liriodenina, nornuciferina, xilopina, lanuginosina e litseferina em menor concentração. Na FIGURA 13 temos o espectrograma referente a uma análise de extrato bruto do exemplar 1 na coleta 9 onde é possível observar o padrão de cafeína, os alcaloides N-metilcoclaurina/magnococlina e reticulina presentes em maior concentração, e os alcaloides presentes em menor concentração como a liriodenina, xilopina e nornantenina.

FIGURA 13 - EXEMPLO DE ESPECTROGRAMA DAS ANÁLISES QUANTITATIVAS



Na TABELA 14, após consideradas as médias das concentrações nos 5 exemplares para cada coleta, visto que estes 5 exemplares são representativos do total de exemplares presentes no Capão do Cifloma, e que o intuito e objetivo principal do presente trabalho é verificar se existe uma diferença significativa da produção de alcaloides entre os meses onde as amostras foram coletadas, pode-se observar para cada alcaloide o mês em que se observa a maior concentração do mesmo.

TABELA 14 – IDENTIFICAÇÃO DO PERÍODO DE MAIOR PRODUÇÃO DE ALCALOIDES ENCONTRADOS NOS EXTRATOS BRUTOS DE *A. rugulosa*

Alcaloide	Mês	Concentração*
Anonaina	Julho	38.66
Asimilobina	Fevereiro	17.30
Liriodenina	Março	1.81
Normuciferina	Março	3.46
Xilopina	Abril	5.06
N-metilcoclaurina /Magnococlina	Fevereiro	333.60
Lanuginosina	Abril	0.8
Litseferina	Fevereiro	12.26
Isboldina/ Norisocoridina	Março	26.90
Nornantenina	Março	3.2
Reticulina	Mai	118.4

Fonte: Dados do Autor (2018).

NOTA: (*) Concentração expressa em ng mL^{-1} por grama de planta seca em 25 mL de solvente.

Pode-se observar que os alcaloides são encontrados em pequenas concentrações, e mesmo se tratando de uma pequena quantidade de material vegetal

utilizado para a obtenção dos extratos e uma concentração baixa utilizada do extrato, as concentrações encontradas são muito pequenas.

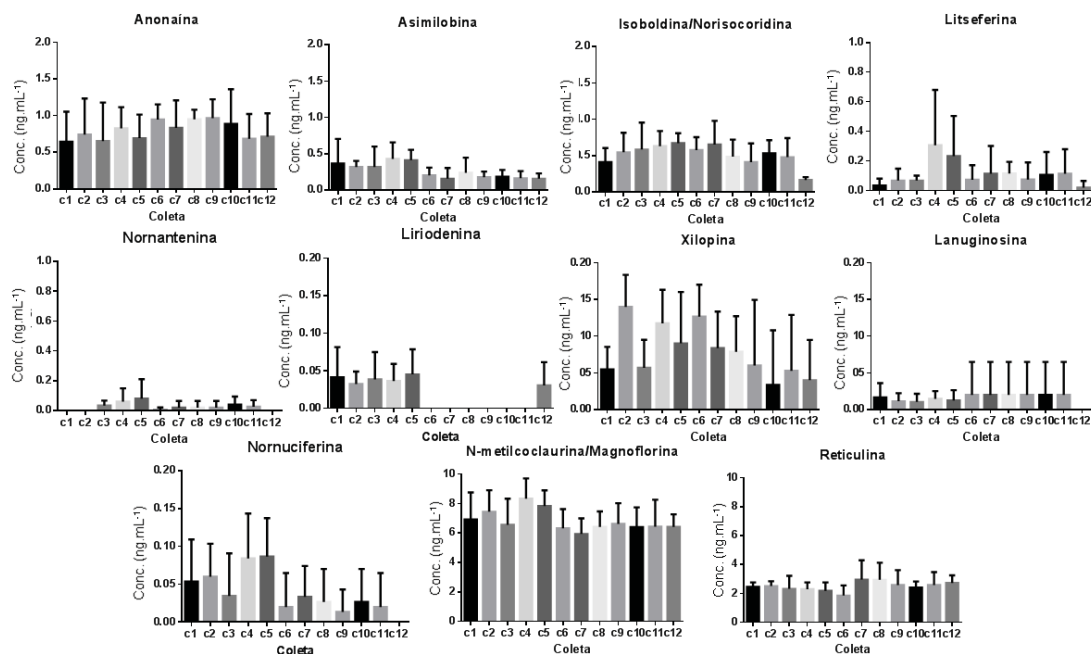
Temos evidenciado aqui o porquê da falta de padrão de metabólitos provenientes de produtos naturais, pois para a obtenção de um padrão analítico, ou uma substância química de referência dos mesmos são necessários muitos testes, os quais demandam uma quantidade grande destas substâncias.

Além disso, estas substâncias são obtidas por meio de extração e isolamento, sendo que para estas técnicas são necessárias grandes quantidades de material vegetal visto que esses metabólitos estão presentes em pequenas concentrações. Durante este estudo também vimos a dificuldade em se coletar grandes quantidades de material vegetal pois além de muitas plantas serem difíceis de encontrar, a coleta é prejudicada pela altura da árvore, local onde se encontra o exemplar e até mesmo pelas fases de coleta, como citado em alguns períodos encontramos uma quantidade maior de folhas nos exemplares, porém após o período de inverno as folhas se tornaram mais debilitadas e a quantidade das mesmas também diminuiu nos exemplares. Assim a importância deste estudo se dá para identificar os períodos de melhor coleta das amostras para um possível isolamento destas substâncias com alto potencial biológico.

Estes conjuntos de dados passaram por análise estatística para identificar se existe diferença significativa entre as concentrações de cada um dos alcaloides nas diferentes coletas, e identificar possíveis erros de análise.

Ao realizar a análise de variância (*One-Way* ANOVA) os dados foram caracterizados como dados paramétricos e prosseguiu-se com a análise de variância (*One-Way* ANOVA) onde cada alcaloide foi analisado separadamente e comparado entre as diferentes coletas, estes gráficos são demonstrados a seguir:

FIGURA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE COLETAS PARA CADA ALCALOIDE UTILIZANDO ONE-WAY ANOVA



FONTE: Dados do Autor (2018).

NOTA: Concentração expressa em ng mL⁻¹ por grama de planta seca em 25 mL de solvente.

Os resultados das análises nos mostram que os alcaloides anonaina, assimilobina, nornantenina, xilopina, N-metilcoclaurina/magnococlina, lanuginosina, litseferina, nornantenina, isoboldina/norisocoridina e reticulina não apresentaram diferença de concentração significativa entre as coletas (valores de $p > 0,05$). Já o alcaloide Liriodenina, apresentou diferença significativas (valores de $p < 0,05$), porém a análise estatística não foi capaz de mostrar entre quais coletas existe essa diferença. Os valores de p são apresentados na TABELA 15 a seguir:

TABELA 15 - VALORES DE P OBTIDOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS COLETAS PARA CADA ALCALOIDE ATRAVÉS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ONE-WAY ANOVA)

Alcaloide	Valor de p
Anonaina	0,8512
Asimilobina	0,1098
Litseferina	0,3186
Nornantenina	0,4597
Reticulina	0,6598
Liriodenina	0,0003*
Nornuciferina	0,0763
N-metilcocclaurina/Magnococclina	0,2614
Lanuginosina	0,1768
Isoboldina/Norisocoridina	0,0968
Xilopina	0,0798

FONTE: Dados do Autor (2018).

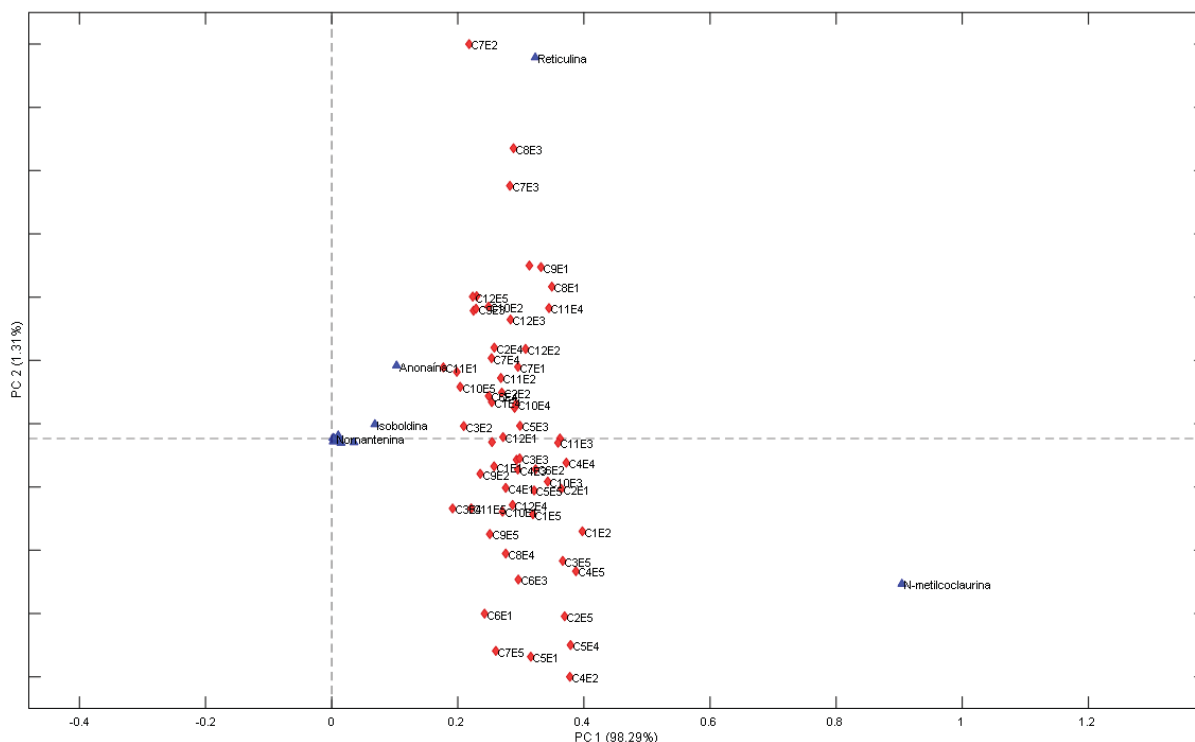
Nota: (*) denota diferença estatística de $p < 0,05$.

Para a PCA foi preparada a matriz contendo os dados e então foram realizadas análises. Foi realizado pré-processamento dos dados sendo que o pré-processamento escolhido foi a média. Posterior ao pré-processamento foi realizada a PCA entre as coletas e entre os alcaloides, para obter a discriminação (gráfico de *scores*) entre as coletas e identificar quais variáveis (alcaloides) poderiam ser responsáveis por essa discriminação (gráfico de *loadings*). Foi determinado o número de componentes principais (PCs) utilizados na análise através do gráfico de variância acumulada explicada *versus* número de PCs, sendo que o número de PCs foi definido como 2, gerando um acúmulo de 99,6% da variância explicada, sendo que valores superiores a 2 PCs não contribuem significativamente para o aumento da variância.

Após a determinação do número de PCs, construiu-se o gráfico de *scores* para identificar a separação das amostras por coleta e o gráfico de *loadings* para determinar qual variável é responsável pela separação das amostras. Através destes gráficos é possível observar a posição das amostras, e determinar as amostras que não fazem parte do conjunto e são, portanto, diferente das demais.

Na FIGURA 15 temos plotados os gráficos de *scores* e *loadings* formados por PC1 que explica 98,29% da variância e PC2 que explica 1,31% da variância. Conforme observado as amostras (coletas) permanecem agrupadas, dentro do intervalo de confiança, não havendo diferença significativa entre as mesmas.

FIGURA 15 - GRÁFICO DE SCORES E LOADINGS DOS EXTRATOS DE *Annona rugulosa* NAS 12 COLETAS REPRESENTADO EM PC1XPC2



FONTE: Dados do Autor (2018).

Com o gráfico de *loadings* podemos observar que as variáveis (alcaloides) apresentam concentrações diferentes, sendo a reticulina e a N-metilcoclaurina/magnococlina os alcaloides que tem as concentrações mais distintas dos demais.

Além disso o exemplar 2 na coleta 3 apresenta uma concentração maior de reticulina, porém esta diferença não é significativa.

Apesar da liriodenina apresentar diferença significativa na análise por ANOVA, na análise de PCA esta diferença não foi observada. Isto se deve ao fato de que na análise por ANOVA cada alcaloide foi analisado separadamente e as coletas foram comparadas entre cada alcaloide, porém ao realizar a PCA comparamos todos os dados do conjunto, sendo comparados os alcaloides entre si, cada alcaloide nas diferentes coletas e todas as coletas. Portanto dentro da comparação dos dados como um todo, tanto as coletas quanto os alcaloides permaneceram agrupados, mostrando que não existe diferença na concentração de alcaloides entre as coletas. Portanto, a produção de alcaloides em *A. rugulosa* não varia durante o ano, sendo possível realizar coletas em qualquer época do ano.

Vale Ressaltar que se tratando em dados de concentração expressa em ng mL^{-1} em 1 grama de planta seca em 25 mL de solvente, os alcaloides majoritários da espécie são a reticulina e N-metilcoclaurina/magnococlina.

5.6 ANÁLISE QUANTITATIVA E CORRELAÇÃO COM A SAZONALIDADE

O clima de uma região nos fornece informações sobre as condições médias de pluviosidade e temperatura da mesma. O sistema de classificação climática de Köppen- Geiger é o sistema utilizado para caracterizar o clima do estado do Paraná. Este é baseado na vegetação, temperatura e índices pluviométricos e é representado por um código referente a grupos e subgrupos climáticos.

No Paraná foram identificados dois tipos climáticos, segundo os dados do IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná) até 1998, sendo eles Cfa e Cfb, onde Cfa representa um clima subtropical com temperaturas médias de 18 °C no mês mais frio e acima de 22 °C no mês mais quente, com verões quentes, geadas pouco frequentes e concentração de chuvas no verão, e sem estação seca definida. Este tipo climático representa parte do Centro, o Sudoeste, o Oeste, o Norte do estado, e o Litoral. E, Cfb representa um clima temperado, com temperatura média de 18 °C no mês mais frio, com verões frescos, com temperatura média abaixo de 22 °C no mês mais quente e sem estação seca definida. Este tipo climático representa parte do Centro (Guarapuava e Ponta Grossa), pequena Parte do Sudoeste, o Sul e a Capital do Estado (Curitiba).

Nesta classificação climática a primeira letra, maiúscula, representa a característica geral do clima, sendo C um clima mesotérmico (subtropical e temperado). A segunda letra, minúscula, representa as precipitações onde f representa um clima sempre úmido (sem estação seca definida). E, a terceira letra, minúscula, representa a temperatura média, representada por a onde temos verões quentes (mês mais quente com temperatura superior a 22 °C), ou b com verões amenos (mês mais quente com temperatura inferior a 22 °C).

Definido o clima do Estado do Paraná, os dados climatológicos são registrados e avaliados. O INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) calcula os valores médios climáticos em um período longo e uniforme que compreende no mínimo três décadas, definidas como Normais pela OMM (Organização Meteorológica

Mundial). Os últimos padrões climáticos normais disponíveis foram realizados entre 01/01/1961 a 31/12/1990 e os dados seguem na TABELA 16:

TABELA 16 - PADRÕES CLIMÁTICOS NORMAIS DO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 1961-1990.

1961-1990	Precipitação acumulada (mm)
Nov/Dez/Jan	150,33
Fev/Mar/Abr	130,4
Mai/Jun/Jul	105,13
Ago/Set/Out	108,63
1961-1990	Temperatura média (°C)
Nov/Dez/Jan	19,26
Fev/Mar/Abr	19,13
Mai/Jun/Jul	13,5
Ago/Set/Out	15,2

FONTE: O Autor (2017).

O termo sazonal refere-se a algo temporário, um fenômeno que ocorre na mesma época do ano e periodicidade do mesmo, mostrando as características de uma época ou estação do ano. Antes de avaliar a quantidade dos alcaloides presentes nos exemplares coletados, uma análise comparativa do clima nas épocas de coleta foi realizada.

Em comparação aos dados das normais meteorológicas de 1961-1990, nos anos de 2016 e 2017 obteve-se dados médios muito semelhantes segundo o SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná), tanto para os dados de precipitação média de cada trimestre, quanto para os dados de temperatura média. Apesar de 2017 ter sido um ano no qual teve-se muitas épocas de frio, onde os termômetros chegaram a marcar $-1,3$ °C, como ocorreu em julho, por outro lado teve-se meses com temperaturas elevadíssimas, como em março, onde os termômetros marcaram $42,3$ °C na capital do Estado. Sendo assim, as médias de precipitação e temperatura acabaram por ficar muito próximas as das normais. Segundo dados do INMET o desvio de precipitação trimestral dos anos de 2016 e 2017 com relação as normais foi de aproximadamente 200 mm, e as diferenças das médias de temperatura dos mesmos períodos foi de $-0,5$ °C entre novembro de 2016 e abril de 2017 e de $+1,5$ °C entre maio e outubro de 2017.

A seguir são apresentados os dados de precipitação média e temperatura média, obtidos do SIMEPAR, entre novembro de 2016 a outubro de 2017, período em que as coletas foram realizadas.

TABELA 17 - DADOS MÉDIOS DE PRECIPITAÇÃO E TEMPERATURA ENTRE NOVEMBRO DE 2016 E OUTUBRO DE 2017.

2016-2017	Precipitação acumulada (mm)
Nov/Dez/Jan	150,33
Fev/Mar/Abr	130,66
Mai/Jun/Jul	105,33
Ago/Set/Out	108,33
2016-2017	Temperatura média (°C)
Nov/Dez/Jan	20,6
Fev/Mar/Abr	20
Mai/Jun/Jul	14,33
Ago/Set/Out	16,33

FONTE: O Autor (2017).

Apesar das médias muito próximas das normais, durante as coletas notou-se algumas diferenças. Nas 3 primeiras coletas novembro (2016), dezembro (2016) e janeiro (2017), os exemplares apresentaram flores e frutos, as temperaturas estavam altas e houve incidência de chuvas durante praticamente todo o mês de janeiro, assim como demonstrado nos dados do SIMEPAR, mantendo a média descrita nas normais referentes aos meses mais quentes e chuvosos.

Os meses de fevereiro, março e abril de 2017 onde foram realizadas a 4^a, 5^a e 6^a coletas, também foram marcados por temperaturas altas, porém, ocorreram chuvas leves, o que provavelmente afetou o desenvolvimento dos exemplares 4 e 5, os quais estavam sem incidência de luz solar, e passaram a apresentar folhas mais largas. Os meses de maio, junho e julho de 2017 (7^a, 8^a e 9^a coletas), foram caracterizados por dias frios e úmidos, onde as folhas dos exemplares se encontraram mais debilitadas devido a ocorrência de geadas e temperaturas muito baixas, corroborando dados das normais referentes aos meses mais frios. Em agosto, setembro e outubro de 2017 (10^a, 11^a e 12^a coleta), os exemplares apresentaram poucas folhas devido ao inverno. Os meses de setembro e outubro se caracterizaram pela ocorrência de chuvas e temperaturas um pouco mais baixas que os dados das normais.

Assim, após realizar a análise sazonal e concluir que mesmo com temperaturas muito baixas e muito altas, as médias climáticas permanecem praticamente iguais durante todo o ano e que estas médias são características da região, pode-se justificar o fato de que as concentrações de alcaloides presentes nas folhas de *A. rugulosa* não se alteram de forma significativa durante o ano, visto que não existem alterações climáticas significativas. Sendo assim, as coletas das folhas desta espécie na região de Curitiba, podem ser realizadas em qualquer período do

ano priorizando apenas os exemplares que apresentem maior número e melhor qualidade das folhas.

5.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Annona rugulosa*

Para as análises de atividade citotóxica e antiproliferativa foi utilizada um mix dos extratos obtidos de todos os 5 exemplares, em uma coleta escolhida aleatoriamente, visto que as concentrações dos alcaloides não variam durante o ano. Portanto, o extrato testado foi aquele obtido com a junção do extrato dos 5 exemplares, utilizando o sistema extrator 2, no mês de Dezembro (coleta 2). Este extrato foi ressuspendido em etanol e diluído nas concentrações adequadas para cada ensaio.

5.7.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE *Annona rugulosa* FRENTE AO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO SAL DE TETRAZOLIUM (MTT) E VERMELHO NEUTRO (VN)

Os resultados obtidos com os ensaios do MTT são apresentados na tabela a seguir:

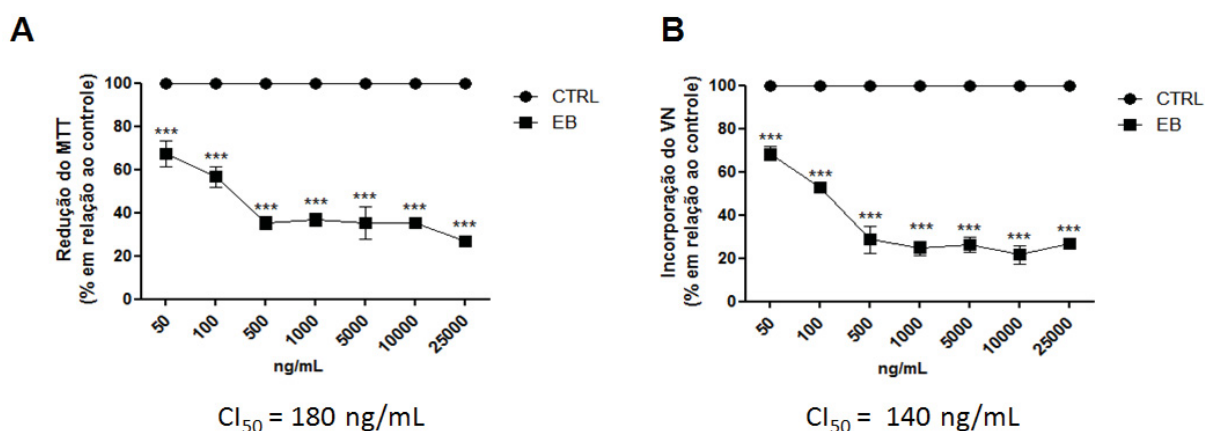
TABELA 18 - VALORES DE CI_{50} DETERMINADOS PARA EXTRATO BRUTO (EB) EM CÉLULAS HELA TRATADAS POR 24, 48 E 72 HORAS

Tratamento	CITOTOXICIDADE - CI_{50} $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$		
	24 horas	48 horas	72 horas
Extrato Bruto (EB)	105,56 \pm 9,8	9,49 \pm 1,1	0,18 \pm 0,9

FONTE: Dados do autor (2018).

De acordo com o National Cancer Institute (NCI), um produto natural com potencial antitumoral, trata-se daquele que apresenta um valor de $CI_{50} < 30 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Levando-se em consideração essa premissa, bem como os dados presentes na TABELA 18, pode-se observar que o EB de *Annona rugulosa* apresentou efeito citotóxico e/ou antiproliferativo tempo-dependente na linhagem celular avaliada, sendo tal efeito considerado significativo a partir de 48 h de tratamento. Ainda, foi demonstrado que o tratamento de 72 horas foi o mais efetivo.

FIGURA 16 - EFEITO CITOTÓXICO E/OU ANTIPROLIFERATIVO DO EXTRATO BRUTO (EB) (50 – 25000 ng.mL⁻¹) DE *ANNONA RUGULOSA* SOBRE CÉLULAS HELA APÓS 72 H DE TRATAMENTO DE ACORDO COM O ENSAIO DE MTT (A) E VN (B).



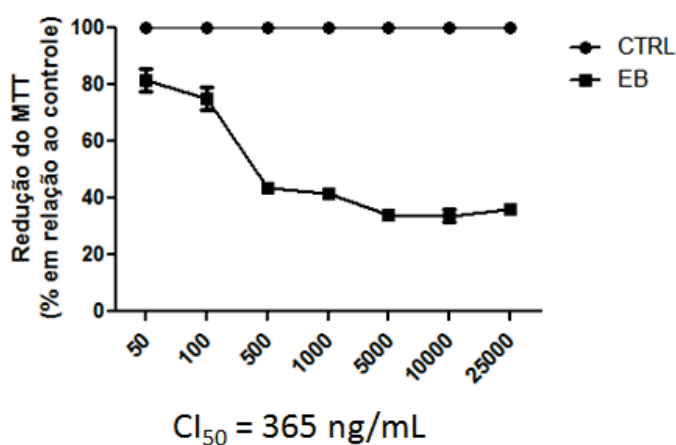
FONTE: Dados do autor (2018).

Ainda, conforme observado na FIGURA 16 A, EB promoveu efeito citotóxico e/ou antiproliferativo dose dependente até a concentração de 500 ng.mL⁻¹ após 72 de tratamento, onde reduziu a viabilidade/proliferação celular em torno de 65%. Todas as concentrações de EB acima de 500 ng.mL⁻¹ testadas apresentaram efeito semelhante ao induzido pela mesma, demonstrando a estagnação da ação biológica do extrato até a concentração de 25000 ng.mL⁻¹.

Com o intuito de confirmar o perfil citotóxico/antiproliferativo de EB caracterizado pelo MTT, foi realizado o teste do VN. A FIGURA 16 B demonstra o percentual de incorporação do VN nos lisossomos, e conseqüentemente, a estimativa de viabilidade/proliferação celular. Pode-se observar que EB, quando avaliado pelo ensaio do VN, apresentou um comportamento semelhante ao detectado pelo teste do MTT, ou seja, proeminente atividade citotóxica/antiproliferativa concentração dependente até 500 ng.mL⁻¹; e estagnação do efeito em concentrações até 50 vezes superiores a esta. Além disso, destaca-se que o valor de CI₅₀ obtido para as células Hela através do VN foi de 140 ng.mL⁻¹, um valor muito próximo ao estabelecido no MTT (180 ng.mL⁻¹).

Outro aspecto particularmente importante em relação à investigação do potencial antitumoral de compostos e/ou produtos naturais, refere-se ao fato destes apresentarem efeito seletivo em células neoplásicas. Nesse sentido, verificou-se a atividade citotóxica/antiproliferativa exercida por EB em células NIH-3T3. Os dados referentes a execução do ensaio do MTT na linhagem murina normal estão apresentados na FIGURA 17.

FIGURA 17 - EFEITO CITOTÓXICO E/OU ANTIPROLIFERATIVO DO EXTRATO BRUTO (EB) (50 – 25000 ng.mL⁻¹) DE *Annona rugulosa* SOBRE CÉLULAS NIH-3T3 APÓS 72 H DE TRATAMENTO DE ACORDO COM O ENSAIO DE MTT.



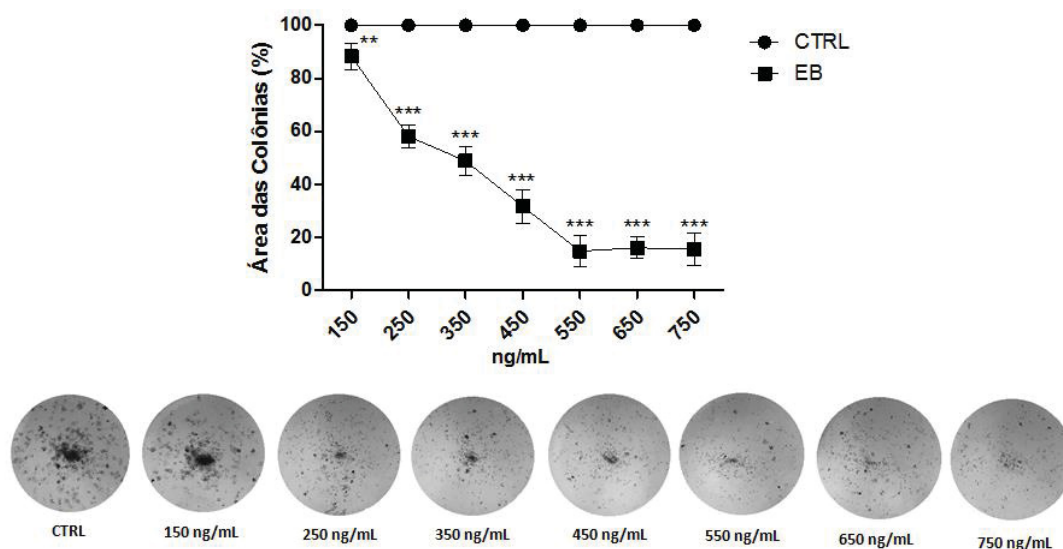
FONTE: Dados do autor (2018).

A execução do teste do MTT demonstrou um valor de CI₅₀ de 365 para os fibroblastos murinos. A partir dos valores de CI₅₀ determinados para a linhagem normal e tumoral, calculou-se o índice de seletividade de EB, que foi 2, sugerindo que o efeito citotóxico/antiproliferativo exercido por EB é seletivo em células Hela. Entretanto, a curva apresentada na FIGURA 17, mostra que a partir da concentração de 500 ng.mL⁻¹, EB promoveu citotoxicidade/inibição da proliferação celular semelhante nas linhagens analisadas, sugerindo que a seletividade ocorre quando EB é administrado em baixas concentrações.

5.7.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE *Annona rugulosa* FRENTE AO ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS – CLONOGÊNICO

O principal propósito do ensaio clonogênico é avaliar a capacidade de uma única célula em gerar clones frente a alguma injúria, como a exposição a radiação ou quimioterápicos (RUDIN et al., 1991, SANTOS 2018). A perda do potencial proliferativo é um indicativo de morte, visto que tal condição impossibilita a geração de clones. Como células viáveis conservam a capacidade de replicação, podem levar a formação de colônias, sendo consideradas como clonogênicas (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005, SANTOS, 2018).

FIGURA 18 - EFEITO ANTICLONOGÊNICO DO EXTRATO BRUTO (EB) OBTIDO DE *ANNONA RUGULOSA*. CÉLULAS HELA FORAM CULTIVADAS *IN VITRO* E TRATADAS POR 72 H COM EB (150 – 750 ng.mL⁻¹).



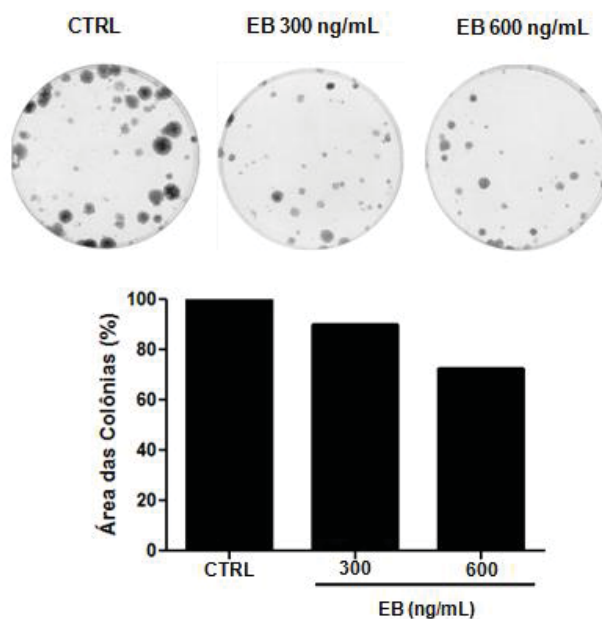
FONTE: Dados do Autor (2018).

Nota: (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL).

O ensaio clonogênico mostrou que EB reduziu significativamente a produção de clones em células HeLa, efeito evidenciado a partir da concentração de 150 ng.mL⁻¹, onde EB foi capaz de reduzir em torno de 12 % a área ocupada pelas colônias no poço de tratamento (FIGURA 18). A análise da FIGURA 18 permite observar que a atividade anticlonogênica exercida por EB é concentração dependente, ocorrendo uma redução de aproximadamente 85% da área ocupada pelas colônias no poço de tratamento, quando o mesmo foi realizado a partir da concentração de 550 ng.mL⁻¹. Por fim, cabe destacar que o ensaio de formação de colônias apresentou o mesmo perfil dos testes de MTT e VN, ou seja, uma significativa atividade citotóxica/antiproliferativa tempodependente até a concentração de 550 ng.mL⁻¹, seguida de estagnação de efeito (FIGURA 18).

O teste de colônia também foi realizado em células NIH/3T3, sendo os resultados desta análise mostrados na FIGURA 19.

FIGURA 19 - EFEITO ANTICLONOGÊNICO DO EXTRATO BRUTO (EB) OBTIDO DE *ANNONA RUGULOSA* FRENTE A CÉLULAS NIH/3T3 CULTIVADAS *IN VITRO* E TRATADAS POR 72 H COM EB (300 E 600 ng.mL⁻¹).



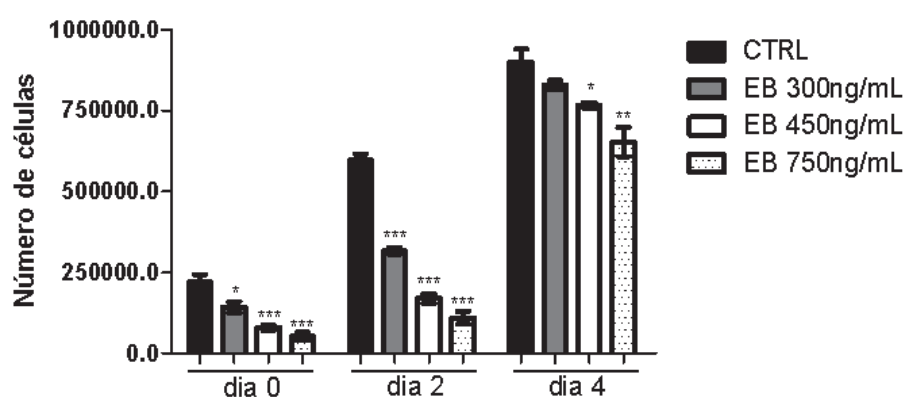
FONTE: Dados do Autor (2018).

Tal análise mostrou que EB reduziu em torno de 10 e 30 % a área ocupada pelas colônias nos poços de tratamento, quando as células foram tratadas com o extrato nas concentrações de 300 e de 600 ng.mL⁻¹, respectivamente. Como mostrado na FIGURA 18, o tratamento com EB nas concentrações de 250 e 550 ng.mL⁻¹ reduziu o potencial clonogênico de células Hela em torno de 40 e de 85%, respectivamente. A comparação do efeito promovido por EB em células NIH/3T3 e Hela em concentrações semelhantes (300 e 600 ng.mL⁻¹ para NIH/3T3 e 250 e 550 ng.mL⁻¹ para Hela) , sugere que a linhagem celular normal se recupera dos danos induzidos por EB de maneira mais rápida que a linhagem tumoral. Salienta-se que este ensaio foi realizado até o momento, uma única vez, estando a triplicata em andamento. Ainda, ressalta-se a necessidade da realização do ensaio de contagem com as células NIH/3T3 para confirmar esta hipótese.

5.7.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE *Annona rugulosa* FRENTE AO ENSAIO DE CONTAGEM CELULAR

Para confirmar o efeito citotóxico/antiproliferativo exercido por EB, realizou-se o ensaio de contagem celular, cujos resultados obtidos foram apresentados na FIGURA 20.

FIGURA 20 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO (EB) OBTIDO DE *Annona rugulosa* SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS DAS LINHAGENS HELA. NOS DIAS 0, 2 E 4 APÓS A RETIRADA DO TRATAMENTO



FONTE: Dados do Autor (2018)

NOTA: (*), (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL).

Como demonstrado na FIGURA 20, o EB de *A. rugulosa* reduziu em torno de 35, 64 e 76 % o número de células em relação ao controle, após a exposição a EB nas concentrações de 300, 450 e 750 ng.mL^{-1} , respectivamente, pelo período de 72 h (dia 0), corroborando os dados obtidos nos ensaios de MTT e VN. Entretanto, 4 dias após a retirada do tratamento, observa-se proliferação celular, mostrando recuperação das células Hela à injúria sofrida, uma vez que o número de células apresentou-se reduzido aproximadamente em 8, 15 e 27 %, em relação ao controle, quando foi administrado EB por 72 h nas concentrações de 300, 450 e 750 ng.mL^{-1} , respectivamente.

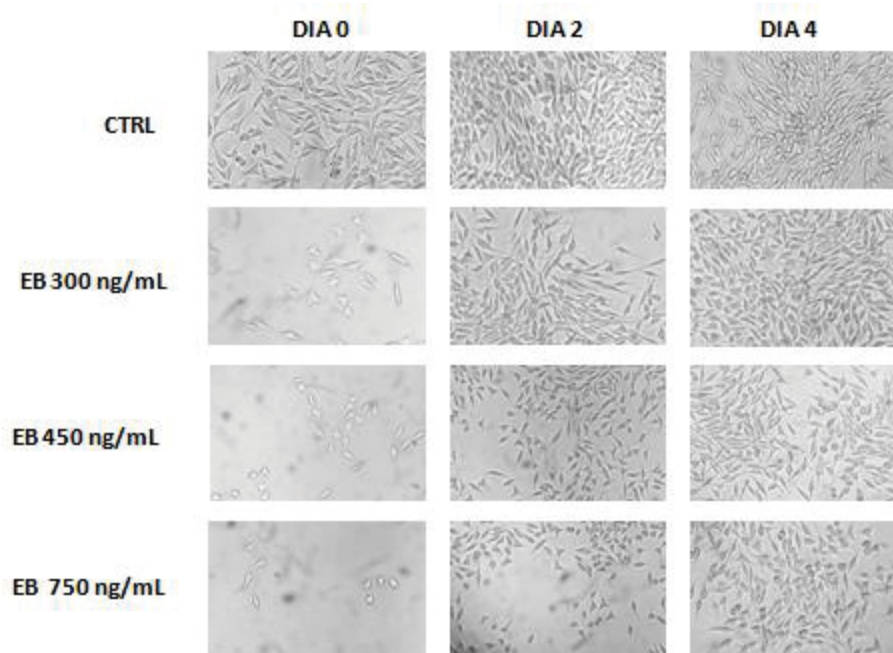
Os resultados do ensaio de contagem celular, quando associados aos dados obtidos pelo teste de formação de colônias, no qual as células permaneceram por 10 dias em cultivo após a retirada do tratamento, sugerem que EB apresenta atividade antiproliferativa e não citotóxica, uma vez que foi observada recuperação celular em ambos ensaios após o tratamento com a concentração de 750 ng.mL^{-1} , que trata-se

de uma concentração em torno de quatro vezes superior ao CI_{50} determinado pelo MTT.

5.7.4 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DE CÉLULAS HELA FRENTE AO TRATAMENTO COM EXTRATO BRUTO (EB) DE *Annona rugulosa*

Com o intuito de confirmar se o extrato bruto de *A. rugulosa* exerce apenas efeito antiproliferativo, foi avaliada a morfologia de células Hela paralelamente ao ensaio de contagem, ou seja, imediatamente após 72 h de tratamento com EB (dia 0), bem como após 2 e 4 dias da retirada do mesmo. A FIGURA 21 mostra os registros fotográficos obtidos.

FIGURA 21 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO (EB) DE *Annona rugulosa* SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS DAS LINHAGENS HELA.



FONTE: Dados do autor (2018).

Como pode-se observar, a FIGURA 21 reflete os resultados obtidos no ensaio de contagem celular, ou seja, que o tratamento com EB nas concentrações de 300, 450 e 750 $ng \cdot mL^{-1}$ foi capaz de reduzir significativamente o número de células após 72 h de tratamento, seguida de recuperação do número de células, 2 e 4 dias posteriormente a retirada do mesmo (FIGURA 21). Os registros fotográficos mostram claramente que tais tratamentos não alteraram a morfologia celular, e sim o número

de células. Dessa forma, os efeitos observados através dos ensaios de MTT, VN, clonogênico e contagem celular referem-se a atividade antiproliferativa do extrato, não existindo evidências de que ele possa causar morte celular nas concentrações e período de tempo avaliados.

Dados do Instituto Nacional do Câncer demonstraram que o câncer de colo uterino é um dos mais frequentes na população feminina brasileira, ocupando a 3ª posição das neoplasias mais incidentes, e sendo superado apenas pelos casos de câncer de mama e colorretal, que ocupam a 1ª e 2ª posição no *ranking* nacional, respectivamente. O câncer de colo uterino é a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. Ainda, para o biênio 2018/2019, foi estimada a ocorrência de 16.370 novos casos de câncer cervical na população feminina brasileira (INCA, 2018).

Com exceção da quimioterapia neoadjuvante, nenhuma abordagem terapêutica promoveu melhora significativa no prognóstico de pacientes portadoras de carcinoma cervical localmente avançado (FERNANDES et al., 2011). Ainda, deve-se levar em consideração o fato de que pacientes portadores de câncer de colo de útero podem desenvolver resistência à rádio e quimioterapia, o que pode levar a progressão tumoral e recorrência da doença (LU et al., 2017). As informações aqui apresentadas, demonstram a necessidade da busca de fármacos e/ou terapias mais eficazes para o câncer cervical.

Logo, este trabalho foi uma tentativa de colaborar na identificação de uma espécie vegetal, e conseqüentemente de metabolitos secundários capazes de exercer efeito antitumoral em células de carcinoma cervical cultivadas *in vitro*. Nesse sentido, a execução de tal trabalho, permitiu elucidar o significativo efeito antiproliferativo do extrato bruto etanólico obtido das folhas de *Annona rugulosa*, o qual pode ser associado a ação sinérgica dos alcalóides e outros metabólitos secundários presentes no mesmo.

Como mencionado anteriormente, tem sido descrito que compostos pertencentes a classe química dos alcalóides, bem como a classe das acetogeninas, presentes nas espécies de *Annonaceae* apresentam atividade antitumoral (AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI; WIART, 2011; MOHAN; JEYACHANDRAN, 2012). Conforme já citado, a atividade citotóxica de plantas pertencentes a este gênero vem sendo extensivamente relatada (AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI; WIART, 2011; FORMAGIO et al., 2015; MOGHADAMTOUSI et al., 2014; MOHAMAD et al., 2015; MOHAN;

JEYACHANDRAN, 2012). Em relação a atividade antiproliferativa em si, tem sido demonstrado que o extrato etanólico da espécie *Annona reticulata* foi capaz de inibir a proliferação de células A-549 (Adenocarcinoma Alveolar), K-562 (Leucemia Mielóide Crônica), HeLa (Câncer Cervical) e MDA-MB. (Adenocarcinoma de glândulas Mamárias) (SURESH et al., 2011). Também foi mostrado que o extrato das sementes de *Annona diversifolia* Saff foi capaz de inibir a proliferação de células HeLa (Câncer Cervical) (SCHLIE-GUZMAN; GARCÍA-CARRANCA; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2009), corroborando os resultados obtidos neste estudo.

Ainda, na literatura, são encontrados estudos com alcaloides isolados de extratos brutos e com atividade antiproliferativa, como a *claulansine* isolada das folhas de *Clausena haiananensis* que apresentou atividade antiproliferativa frente a células HL-60 (Leucemia Pro-Mielocítica), SMMC-7721 (Hepatocarcinoma) e A-549 (Adenocarcinoma Alveolar) (MA et al., 2018). Outro exemplo, trata-se do alcaloide isoquinolínico M1 (6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid) identificado e isolado das folhas de *Mucuna pruriens*, o qual apresenta atividade antiproliferativa frente a células Huh-7 (Hepatocarcinoma) (KUMAR et al., 2016).

Apesar do foco deste trabalho ter sido identificar os alcalóides presentes nas folhas de *A. rugulosa* e verificar a influência da sazonalidade na concentração dos mesmos, ressalva-se que o efeito biológico verificado também pode estar relacionado à presença de outros compostos não identificados, tais como as acetogeninas, que também são características do gênero *Annona*.

Visto que EB apresenta um significativo efeito antiproliferativo, começou-se a se questionar se tal extrato poderia ser utilizado como coadjuvante na terapia do câncer, reduzindo a concentração de quimioterápicos utilizados no tratamento de neoplasias, e conseqüentemente, diminuindo a ocorrência de efeitos adversos e/ou resistência celular. Desta forma, EB foi associado ao alcalóide indólico vincristina, que, como mencionado anteriormente, trata-se de um fármaco usado clinicamente para o tratamento de câncer cervical. Para avaliar se a ação da vincristina é potencializada pela associação a EB, foram realizados os mesmos testes utilizados para caracterizar a ação antiproliferativa deste extrato, sendo os resultados demonstrados a seguir.

5.7.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE *Annona rugulosa* ASSOCIADO A VINCRISTINA FRENTE AO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO SAL DE TETRAZOLIUM (MTT) E VERMELHO NEUTRO (VN)

Os resultados obtidos com os ensaios do MTT e VN referentes a exposição de células Hela a associação VC+EB por 72 horas estão demonstrados na TABELA 19,

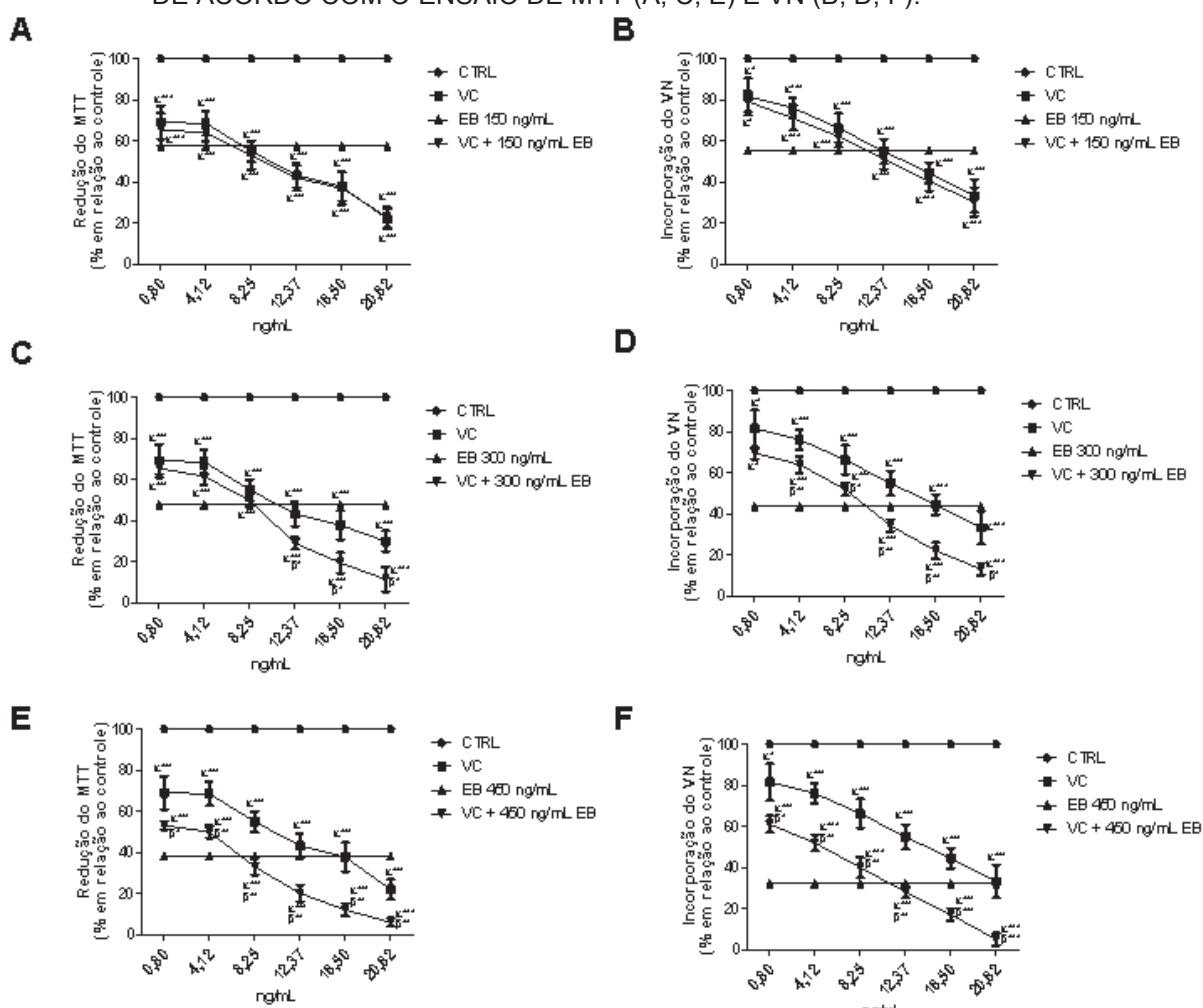
TABELA19 - VALORES DE CI_{50} DETERMINADOS PARA EXTRATO BRUTO (EB), VINCRISTINA (VC) E PARA VC ASSOCIADA AO EB (150, 300 E 450 $ng.mL^{-1}$) EM CÉLULAS HELA TRATADAS POR 72 HORAS.

Tratamento	CI_{50} ($ng.mL^{-1}$)	
	MTT	VN
Extrato Bruto (EB)	180 ± 0,09	140 ± 0,08
Vincristina (VC)	9 ± 1,77	11 ± 1,32
VC + EB 150 $ng.mL^{-1}$	9 ± 1,01	10 ± 1,68
VC + EB 300 $ng.mL^{-1}$	7 ± 1,15	8 ± 1,05
VC+ EB 450 $ng.mL^{-1}$	4 ± 1,06	5 ± 1,03

FONTE: Dados do Autor (2018).

Como pode-se observar na TABELA 19, a única associação capaz de potencializar o efeito da vincristina administrada isoladamente, foi aquela em que este fármaco foi administrado concomitantemente a EB na concentração de 450 $ng.mL^{-1}$, a qual reduziu significativamente os valores de CI_{50} obtidas nos ensaios do MTT e VN em comparação aos valores determinados após a exposição ao alcalóide isolado.

FIGURA 22 - EFEITO CITOTÓXICO E/OU ANTIPROLIFERATIVO DA VINCISTINA (VC -0,80 – 20,62 ng.mL⁻¹) ADMINISTRADA ISOLADAMENTE EM ASSOCIAÇÃO AO EXTRATO BRUTO (EB -150, 300 E 450 ng.mL⁻¹) SOBRE CÉLULAS HELA APÓS 72 H DE TRATAMENTO DE ACORDO COM O ENSAIO DE MTT (A, C, E) E VN (B, D, F).



FONTE: Dados do Autor (2018)

Além disso, as curvas dos ensaios do MTT e do VN (FIGURA 22) mostram que EB (450 ng.mL⁻¹) é capaz de potencializar a ação citotóxica/antiproliferativa de VC em células Hela, em todas as concentrações em que este fármaco foi administrado de forma isolada.

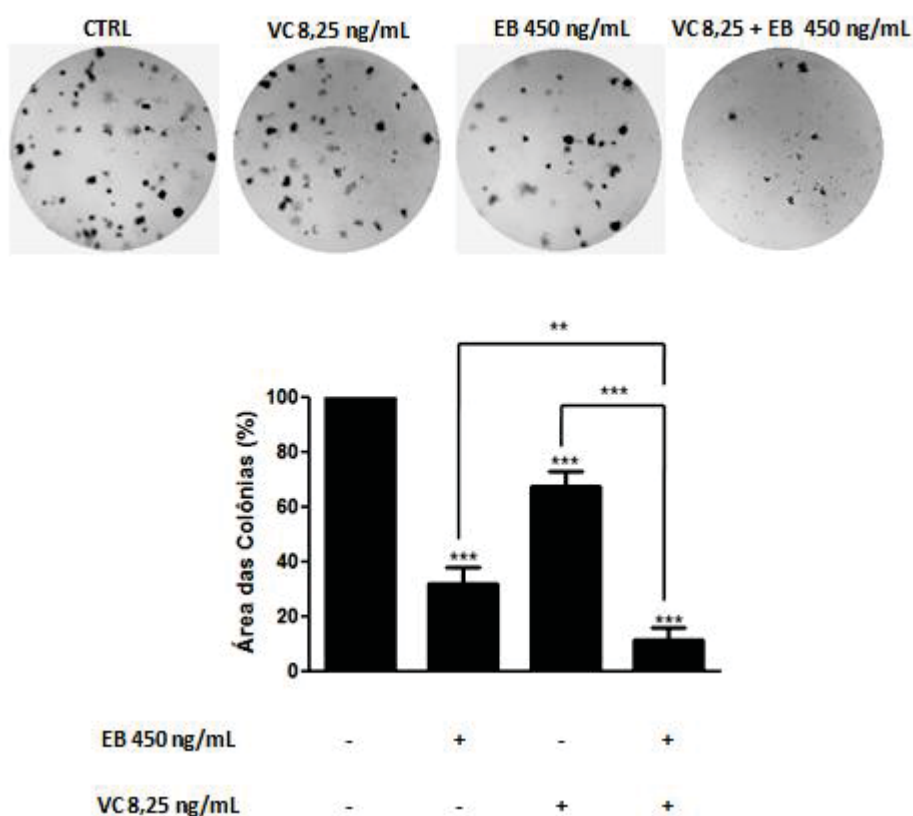
Apesar de EB, quando administrado isoladamente, ter promovido redução do MTT em torno de 40% e incorporação do VN em torno de 30%, deve-se considerar que tais efeitos se devem apenas a atividade antiproliferativa e não citotóxica do extrato, conforme caracterização mostrada anteriormente. Ainda, salienta-se a rápida recuperação da linhagem tumoral as injúrias causadas por EB, o que justifica a utilização do mesmo em concentrações relativamente elevadas em comparação aos valores de CI₅₀ obtidas nos ensaios do MTT (180 ng.mL⁻¹) e VN (140 ng.mL⁻¹), bem como o uso do extrato como co-adjuvante na terapia e não como quimioterápico

isolado. Por fim, os resultados obtidos sugerem que células normais também são capazes de recuperar-se dos danos induzidos por tal extrato, e de maneira mais rápida que a linhagem tumoral, sustentando o uso de EB em concentrações altas.

5.7.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE *Annona rugulosa* ASSOCIADO A VINCRISTINA FRENTE AO ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLONIAS (CLONOGENICO)

Os resultados obtidos com a realização do ensaio clonogênico e referentes a exposição de células Hela a associação VC (8,25 ng.mL⁻¹) + EB (450 ng.mL⁻¹) por 72 horas estão mostrados na FIGURA 23.

FIGURA 23 - EFEITO ANTICLONOGÊNICO DA VINCRISTINA (VC-8,25 NG.ML⁻¹), EXTRATO BRUTO (EB 300 E 450 NG.ML⁻¹) E DA ASSOCIAÇÃO VC (8,25 NG.ML⁻¹) + EB (450 NG.ML⁻¹).



FONTE: Dados do Autor (2018).

NOTA:(***) denota diferença estatística de $p < 0,001$

A associação VC + EB reduziu em torno de 82 e 64% o número de colônias, quando comparada ao efeito promovido por VC e EB, respectivamente. Os dados mostram novamente que a associação VC+EB foi capaz de sensibilizar as células

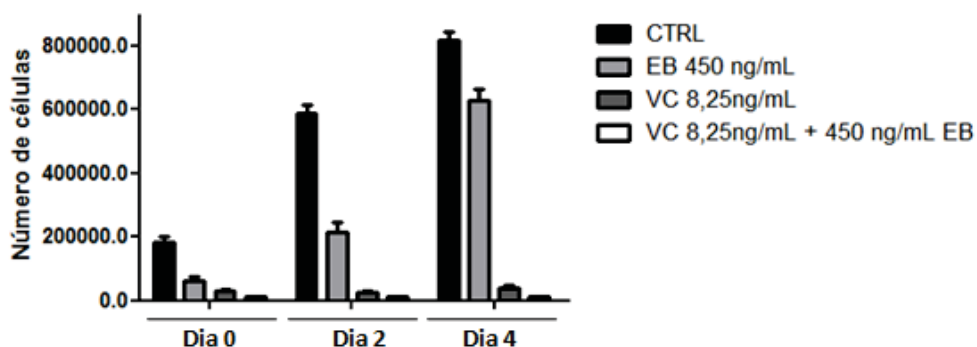
Hela a ação citotóxica/antiproliferativa da vincristina, reduzindo o número de clones formados após a exposição das células à mesma (FIGURA 23).

5.7.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO (EB) DE *Annona rugulosa* ASSOCIADO A VINCRISTINA FRENTE AO ENSAIO DE CONTAGEM CELULAR

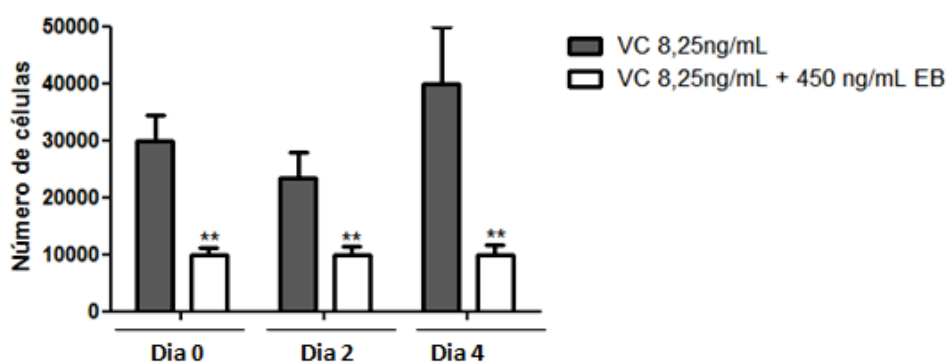
Com o intuito de confirmar se EB é capaz de potencializar a ação citotóxica/antiproliferativa da vincristina, realizou-se ainda, o ensaio de contagem celular, cujos resultados estão mostrados na FIGURA 24.

FIGURA 24 - EFEITO DA VINCRISTINA (VC-8,25 NG.ML⁻¹), EXTRATO BRUTO (EB 450 NG.ML⁻¹) E DA ASSOCIAÇÃO VC (8,25 NG.ML⁻¹) + EB (450 NG.ML⁻¹) SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS DAS LINHAGENS HELA NOS DIAS 0, 2 E 4 APÓS A RETIRADA DO TRATAMENTO

A



B



FONTE: Dados do Autor (2018).

NOTA:(**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL) (A) ou a vincristina (VC) (B)

A FIGURA 24 A mostra novamente o efeito transiente de EB, onde o mesmo reduziu significativamente o número de células em relação ao controle imediatamente

após 72 h (dia 0) de tratamento, observando-se recuperação celular a injúria induzida, no 4º dia após retirada do extrato.

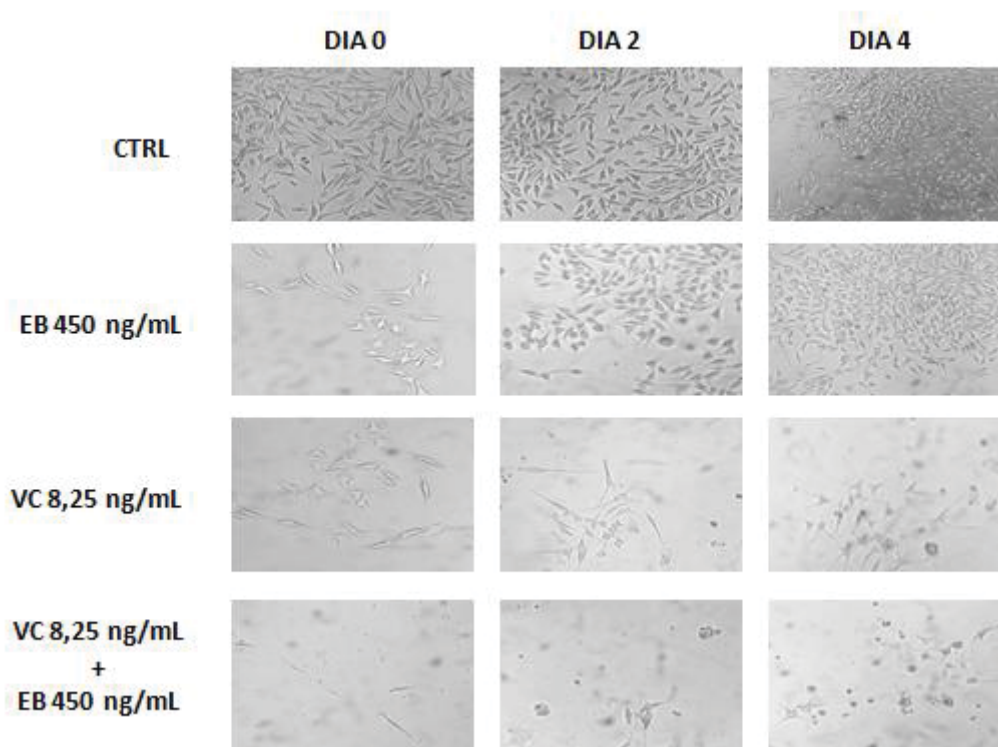
O tratamento com VC também foi capaz de promover uma diminuição significativa do número de células em relação ao CTRL após 72 de exposição a mesma. Entretanto, o efeito de VC foi persistente, ou seja, perdurou 2 e 4 dias após a retirada do tratamento, uma vez que observou-se manutenção da redução do número de células em relação ao controle, após a retirada do tratamento (FIGURA 24 A).

Ainda, pode-se observar que, após 72 h de tratamento, a associação VC+EB reduziu de maneira mais efetiva (95%) o número de células em relação ao controle, quando comparado ao efeito promovido por EB (65%) e VC (84%), respectivamente. Além disso, foi demonstrado que o efeito exercido pela associação é persistente, uma vez que nos dias 0, 2 e 4, o número de células permanece o mesmo. Salienta-se que EB foi capaz de potencializar a ação da vincristina, visto que o tratamento com a associação foi capaz de reduzir em torno de 67, 57 e 75% o número de células nos dias 0, 2 e 4, respectivamente, em comparação ao tratamento vincristina administrada isoladamente. Por fim, foi mostrado que a associação VC+EB apresentou efeito mais pronunciado que o promovido por EB administrado isoladamente, diminuindo em torno de 84,95 e 98% o número de células nos dias 0, 2 e 4, respectivamente, em comparação ao tratamento com o extrato.

5.7.8 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DE CÉLULAS HELA FRENTE AO TRATAMENTO COM EXTRATO BRUTO (EB) DE *Annona rugulosa* ASSOCIADO A VINCRISTINA

Com o objetivo de avaliar se a associação VC+EB promoveu alterações na morfologia de células Hela, foram realizados registros fotográficos paralelamente ao ensaio de contagem, ou seja, 72 h após o tratamento (dia 0) com a associação, bem como 2 e 4 dias posteriormente da retirada da mesma. A FIGURA 25, mostra os registros fotográficos obtidos.

FIGURA 25 - EFEITO DA VINCRISTINA (VC-8,25 ng.mL⁻¹), EXTRATO BRUTO (EB 450 ng.mL⁻¹) E DA ASSOCIAÇÃO VC (8,25 ng.mL⁻¹) + EB (450 ng.mL⁻¹) SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS DAS LINHAGENS HELA.



FONTE: Dados do autor (2018).

A FIGURA 25, mostra que, novamente, os resultados obtidos no ensaio de contagem celular são refletidos na morfologia celular, ou seja, que o tratamento com EB foi transiente, apresentando recuperação celular 2 e 4 dias após a retirada do tratamento. Em relação a exposição das células a VC administrada isoladamente, foi observada ação persistente, que consistiu na redução do número de células e alteração da morfologia celular, onde as células perderam o aspecto fusiforme e passaram a apresentar prolongamentos citoplasmáticos pronunciados semelhante a dendritos neuronais, bem como adquiriram uma morfologia semelhante ao corpo celular de neurônios no 4º dia após a retirada do tratamento. Os registros fotográficos mostram também a presença de células arredondadas suspensas no meio de cultura, indicando a ocorrência de morte celular e descolagem das mesmas da placa.

A associação VC+EB também promoveu efeito persistente, sendo este mais efetivo quando comparado a ação de EB e VC administrados isoladamente, reduzindo significativamente o número de células e promovendo as alterações morfológicas anteriormente citadas de maneira mais pronunciada, elevando principalmente o número de células mortas e suspensas no meio de cultivo (FIGURA 25).

Como mencionado anteriormente, a vincristina é um fármaco utilizado no tratamento de diversas neoplasias, incluindo o câncer cervical. Neste, é mais empregada na polioquimioterapia neoadjuvante (GA et al., 2018; KATSUMATA et al., 2013; SARDEI et al., 1997) auxiliando na redução do volume tumoral e promoção de tratamento local (radioterapia ou cirurgia). Assim como a grande maioria dos fármacos antineoplásicos, o uso de vincristina pode induzir a ocorrência de resistência tumoral e de efeitos adversos que comprometem a qualidade de vida do paciente oncológico. Logo, achou-se pertinente verificar se o EB de *Annona rugulosa* seria capaz de potencializar a ação deste fármaco.

Neste sentido, todos os ensaios realizados e apresentados ao longo deste trabalho mostraram que EB potencializou de maneira proeminente a atividade citotóxica/antiproliferativa exercida pela vincristina, sugerindo que tal extrato trata-se de um promissor fármaco co-adjuvante a ser utilizado no tratamento de câncer cervical.

6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O método de extração utilizando o sistema extrator 2 composto por Etanol:H₂O (90:10, v/v) mostrou-se o mais eficaz para extração dos alcaloides presentes nas folhas de *A. rugulosa*.

O método analítico por UPLC-MS desenvolvido mostrou-se sensível, seletivo e rápido para a análise de quantificação dos 13 alcaloides, apresentando precisão e exatidão satisfatórias, detectando quantidades mínimas na faixa 0.5 ng.mL⁻¹ quando analisadas 1 g de planta seca em 25 mL de solvente. Além disso, a utilização do padrão de cafeína como padrão interno mostrou-se adequado para as análises de quantificação de alcaloides oxoaporfínicos, aporfínicos e benzilisoquinolínicos visto que as concentrações do mesmo apresentaram mínima variação durante as análises, além de obter com precisão e exatidão as concentrações dos alcaloides destas classes. Sendo assim, padrões de outras classes que não as encontradas na matriz, podem ser utilizados em análises quantitativas por UPLC-MS/MS.

A análise inicial durante as coletas nos mostra que existe uma diferença no aspecto dos exemplares, quantidade de folhas e qualidade das mesmas durante o ano, porém a análise estatística dos dados de quantificação dos alcaloides nos mostra que não existe diferença das quantidades destes metabólitos durante o decorrer do ano. Portanto, as coletas para isolamento e estudo destes alcaloides podem ser realizadas durante qualquer mês do ano, priorizando exemplares com maiores quantidades de folhas e melhor qualidade das mesmas apenas.

O Extrato Bruto mostrou significativa atividade antiproliferativa sobre células Hela, podendo este resultado estar associado a sinergia de ação entre os alcaloides e outros metabólitos presentes no extrato. Além disso, sugere-se que tal extrato pode ser utilizado como adjuvante no tratamento de câncer cervical, uma vez que o mesmo foi capaz de potencializar a ação citotóxica da vincristina.

Como perspectivas futuras do ponto de vista biológico deve-se verificar a atividade seletiva do extrato bruto, realizando-se ensaios em linhagens não tumorais humanas. Além disso, deve-se caracterizar melhor o efeito antiproliferativo exercido pelo extrato bruto, identificando as modificações causadas pelo mesmo no ciclo celular de células Hela, bem como identificar possíveis vias e proteínas envolvidas na mediação deste efeito.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, P.; LADDHA, K. ScienceDirect Development of validated high-performance thin layer chromatography for quantification of aristolochic acid in different species of the Aristolochiaceae family. **Journal of Food and Drug Analysis**, p. 6–10, 2016.

ALMEIDA, J. R. G. DA S. et al. Antinociceptive activity of ethanol extract from *Duguetia chrysoarpa* Maas (Annonaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 859210, 2012.

ALMEIDA, V. L. DE et al. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

AMINIMOGHADAMFAROUJ, N.; NEMATOLLAHI, A.; WIART, C. Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, n. 5, p. 465–476, 2011.

BAJPAI, V. et al. Analysis of phytochemical variations in dioecious *Tinospora cordifolia* stems using HPLC / QTOF MS / MS and UPLC / QqQ LIT -MS / MS. **Phytochemical Analysis**, v. 27, n. April 2015, p. 92–99, 2016.

BANERJEE, K. et al. Multiresidue determination of 375 organic contaminants including pesticides, polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in fruits and vegetables by gas chromatography – triple quadrupole mass spectrometry with introduction of semi-quantification. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 283–295, 2012.

BARRECA, D. et al. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2302–2310, 2011.

BOSCOLO, O. H.; DE SENNA VALLE, L. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, BRASIL. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 63, n. 2, p. 263–272, 2008.

BRANDÃO, H. N. et al. QUÍMICA E FARMACOLOGIA DE QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS DERIVADOS DE PLANTAS. **Quimica Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRASIL. **GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS MÉTODOS ANALÍTICOS D.O.U.** - Diário Oficial da União, 2003.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº166, de 24 de Julho de 2017.** [s.l.: s.n.].

BRITO, H. O. et al. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.

89, n. 3, p. 180–184, 2008.

BRUGINSKI, E. R. D. **IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES E ACETOGENINAS DIRETAMENTE EM TECIDOS DE FOLHAS E SEMENTES DE *Annona rugulosa* (Annonaceae) POR DESI-MSI.** [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2016.

CABRAL, C.; PITA, J. R. **Alcaloides: Relevância na farmácia e no medicamento** Coimbra, 2015.

CAMPOS, F. R. et al. Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sericea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 10, p. 804–806, 2008.

CASTRO-MORENO, M. et al. Influence of seasonal variation on the phenology and liriodenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). **Journal of Plant Research**, v. 126, n. 4, p. 529–537, 2013.

CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5–40, 2012.

CHEN, C. Y. et al. Four alkaloids from *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 7, p. 753–757, 2001.

CHEN, C. Y. et al. (-)-Anonaine induces apoptosis through Bax- and caspase-dependent pathways in human cervical cancer (HeLa) cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2694–2702, 2008.

COSTA, E. V. et al. Trypanocidal Activity of Oxoaporphine and Pyrimidine- β -Carboline Alkaloids from the Branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9714–9720, 2011.

COSTA, E. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural product research**, v. 27, n. 11, p. 1002–6, 2013.

DA SILVA, D. B. et al. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809–1812, 2007.

DA SILVA, F. M. A. et al. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Annona guatterioides* por ESI-IT-MS. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 944–947, 2012.

DE OMENA, M. C. et al. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2549–2556, 2007.

DE SOUSA, O. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. **International journal**

of molecular sciences, v. 11, n. 5, p. 2067–78, 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.

DIAMOND, A.; DESGAGNE-PENIX, I. Metabolic engineering for the production of plant isoquinoline alkaloids. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1319–1328, 2015.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 60–71, 2007.

EGYDIO, A. P. M.; SANTOS, D. Y. A. C. Underutilized Annona Species from the Brazilian Cerrado and Amazon Rainforest: A Study on Fatty Acids Profile and Yield of Seed Oils. v. 65, n. Econoicy Botany, p. 329–333, 2011.

FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. **Modern Alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology**. [s.l: s.n.].

FELIPE, K. B. **ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA E ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE Casearia sylvestris E DE FENILAMINONAFTOQUINONAS ASSOCIADAS OU NÃO AO ASCORBATO DE SÓDIO**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

Flora do Brasil de 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 31 maio. 2017.

FORMAGIO, A. S. N. et al. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308–315, 2015.

FORZZA, R. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. [s.l: s.n.], v. 2

FRASER, P. D. et al. Metabolite profiling of plant carotenoids using the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **The Plant Journal**, p. 552–564, 2007.

FREIRE, L. H. M. **AÇÃO DE EXTRATOS NATURAIS SOBRE O CÂNCER**. [s.l: s.n.].

FROMMANN, K. et al. Vincristine resistance in relapsed neuroblastoma can be efficiently overcome by Smac mimetic LCL161 treatment. **Journal of Pediatric Surgery**, 2018.

GA, D. et al. Is neo - adjuvant chemotherapy a better option for management of cervical câncer patients of rural India ? p. 10–13, 2018.

GAUTAM, M.; RAMANATHAN, M. Saponins of *Tribulus terrestris* attenuated neuropathic pain induced with vincristine through central and peripheral mechanism. **Inflammopharmacology**, n. 123456789, 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GRINEVICIUS, V. M. A. DE S. **ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE *Piper nigrum* Linnaeus cultivar Bragantina (PIPERACEAE)**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

HABLI, Z. et al. Emerging Cytotoxic Alkaloids in the Battle against Câncer : Overview of Molecular Mechanisms. **Molecules**, v. 22, p. 1–22, 2017.

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

HOLANDA, C. M. DE C. X. et al. Effect of Paclitaxel (Taxol ®) on the Biodistribution of Sodium Pertechnetate (Na 99m TcO 4) in Female Wistar Rats. **BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY**, v. 51, n. December, p. 191–196, 2008.

HU, Y. et al. Comprehensive chemical analysis of Venenum Bufonis by using liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 210–220, 2011.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

INCA. **Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial**, p. 25, 2007.

ISAH, T. Anticâncer Alkaloids from Trees: Development into Drugs. **Pharmacognosy Review**, n. July, 2016.

JARMUSCH, A. K.; COOKS, R. G. Emerging capabilities of mass spectrometry for natural products. **Natural product reports**, v. 31, n. 6, p. 730–8, 2014.

JORGE, T. F.; MATA, A. T.; ANTÓNIO, C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics Subject Areas : Author for correspondence : **Philosophical Transactions A**, 2016.

JOSÉ, A. R. S. et al. Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo.

Revista Brasileira de Fruticultura, v. 36, n. spe1, p. 86–93, 2014.

KATSUMATA, N. et al. Phase III randomised controlled trial of neoadjuvant chemotherapy plus radical surgery vs radical surgery alone for stages IB2 , IIA2 , and IIB cervical câncer: a Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG 0102). **British Journal of Câncer**, v. 108, n. 10, p. 1957–1963, 2013.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 225–242, 2014.

KUMAR, P. et al. Antiproliferative effect of isolated isoquinoline alkaloid from *Mucuna pruriens* seeds in hepatic carcinoma cells. **Natural Product Research**, v. 30, n. 4, p. 460–463, 2016.

KUTCHAN, T. M. Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. **The Plant Cell**, v. 7, n. July, p. 1059–1070, 1995.

L, L. et al. Preclinical evaluation of the effects on the gastrointestinal tract of the antineoplastic drug vincristine repeatedly administered to rats. **Wiley**, n. March, p. 1–16, 2018.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, 1980.

LI, H. T. et al. The pharmacological activities of (-)-anonaine. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8257–8263, 2013.

LI, Z. et al. Derivative multiple reaction monitoring and single herb calibration approach for multiple components quantification of traditional Chinese medicine analogous formulae. **Journal of Chromatography A**, v. 1376, p. 126–142, 2015.

LIN, Z. et al. Ultra-performance LC separation and quadrupole time-of-flight MS identification of major alkaloids in *plumula nelumbinis*. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 6, p. 485–494, 2014.

LOOS, G.; SCHEPDAEL, A. VAN; CABOOTER, D. Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis. **Philosophical Transactions A**, 2016.

LOPES, J. D. E. C.; MELLO-SILVA, R. DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DAS ANNONACEAE DO BRASIL 1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 125–131, 2014.

LÚCIO, A. S. S. C. et al. **Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities**. [s.l: s.n.]. v. 74

MA, Y. L. et al. Carbazole alkaloids from *Clausena hainanensis* with their potential antiproliferative activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 76, p. 359–364, 2018.

MAGNUSSON, O. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, 2. ed. [s.l: s.n.].

MARINHO, A. F. **CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO APLICADO AO ESTUDO DE SAZONALIDADE E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ALCALOIDES DE *Cissampelos sympodialis***. [s.l: s.n.].

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. Annona muricata leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF-κB. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2014.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. Annona muricata (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625–15658, 2015.

MOHAMAD, M. et al. Cytotoxic effect of Annona muricata Linn leaves extract on Capan-1 cells. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 5, p. 045–048, 2015.

MOHAN, K.; JEYACHANDRAN, R. Alkaloids as anticancer agents. **Annals of Phytomedicine**, v. 1, n. 1, p. 46–53, 2012.

NICULAU, E. S. et al. Análise Quantitativa de Produtos Naturais em Plantas por CL- EM. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 204–230, 2016.

NORDIN, N. et al. Liriodenine , an aporphine alkaloid from Enico - of human ovarian cancer cells through induction of apoptosis via the mitochondrial signaling pathway and blocking cell cycle progression. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 1437–1448, 2015.

OROZCO-CASTILLO, J. A. et al. Aporphine alkaloid contents increase with moderate nitrogen supply in *Annona diversifolia* Saff. (Annonaceae) seedlings during diurnal periods. **Natural Product Research**, v. 30, n. 19, p. 2209–2214, 2016.

PORTAL ACTIONSTAT. Equipe Estatcamp (2014). Software Action. Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/>>. Acesso em: 10 março. 2018.

RABELO, D. DE M. et al. ISOQUINOLINE ALKALOIDS AND INVESTIGATION OF THE ANTIBACTERIAL AND ANTIPLASMODIAL ACTIVITIES OF *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1453–1458, 2014.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A . S T . -H IL . **Ann. Naturhist. Mus. Wien**, v. 108 B, n. Fries 1959, p. 191–206, 2007.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

RINALDI, M. V. N. et al. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 1, p. 77–83, 2017.

ROBERTS, M. F.; WINK, M. (EDS.). **Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications**. New York: [s.n.].

ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 814–821, 2010.

SANTOS, A. F. **ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL DE FRAÇÃO DE ALCALOIDES TOTAIS ISOLADA DE *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC., APOCYNACEAE E DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SOFTWARE DE MENSURAÇÃO DE ÁREA E CONTAGEM DE NÚMERO DE COLÔNIAS**. [s.l: s.n.].

SANTOS, M. DE F. C. et al. Aporphine alkaloids from the stem bark of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 60, p. 106–109, 2015.

SARDI, J. E. et al. Long-Term Follow-up of the First Randomized Trial Using Neoadjuvant Chemotherapy in Stage Ib Squamous Carcinoma of the Cervix : The Final Results. v. 69, n. 67, p. 61–69, 1997.

SCHENK, A. et al. UPLC TOF MS for sensitive quantification of naturally occurring pyrrolizidine alkaloids in *Petasites hybridus* extract (Ze 339). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 997, p. 23–29, 2015.

SCHLÄGER, S.; DRÄGER, B. Exploiting plant alkaloids. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 155–164, 2016.

SCHLIE-GUZMAN, M. A.; GARCÍA-CARRANCA, A.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. In Vitro and In Vivo Antiproliferative Activity of Laherradurin and Cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, v. 1133, n. January, p. 1128–1133, 2009.

SHATI, A. A.; ELSAID, F. G. Hepatotoxic effect of subacute vincristine administration activates necrosis and intrinsic apoptosis in rats : protective roles of broccoli and Indian mustard. **Archives Of Physiology And Biochemistry**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2018.

SINGH, A. et al. Quantitative determination of isoquinoline alkaloids and chlorogenic acid in *Berberis* species using ultra high performance liquid chromatography with hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 12, 2015.

SOMKID, K. et al. **Cytotoxicity Testing of Graviola (*Annona muricata* Linn .) Leaf Extracts In vitro**, 2015. Disponível em: <www.annualconference.ku.ac.th/cd53/06_020_P67.pdf>

SURESH, H. M. et al. In vitro antiproliferative activity of *Annona reticulata* roots on human cancer cell lines. **Pharmacognosy Research**, v. 3, n. 1, p. 13, 2011.

SYED, S. B. et al. Targeting P-glycoprotein : Investigation of piperine analogs for overcoming drug resistance in câncer. **Scientific Reports**, n. February, p. 1–18, 2017.

TANG, J. et al. Simultaneous Determination of Six Steroidal Alkaloids of *Veratrum dahuricum* by HPLC – ELSD and HPLC – MS n. **Chromatographia**, v. 67, n. 1/2, p. 15–21, 2008.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

VEGA, M. R. G. et al. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1554–1559, 2007.

VENDRAMIN, M. E. et al. Chemical constituents from the leaves of *Annona rugulosa* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 49, n. September 2009, p. 152–155, 2013.

VIERA, G. H. F. et al. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo**, v. 52, n. 3, p. 129–132, 2010.

VILA-NOVA, N. S. et al. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonaceae species cultivated in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 567–571, 2011.

WANG, L. et al. Global detection and semi-quantification of *Fritillaria* alkaloids in *Fritillariae Ussuriensis* Bulbus by a non-target multiple reaction monitoring approach. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 2, p. 287–295, 2016.

WANG; MINGXUN. **Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking**. Disponível em: <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>>. Acesso em: 17 maio. 2017.

WU, Y. C. et al. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 2, p. 497–500, 1993.