

Atividade antigenotóxica da polpa da graviola (*annona muricata*), avaliada por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*

Tayllon dos Anjos Garcia

Graduando em Farmácia pelo Centro Universitário de Patos de Minas – MG

Júlio César Nepomuceno

Professor Associado do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – MG / Professor Titular do Centro Universitário de Patos de Minas – MG.

Resumo: A *Annona muricata* é uma árvore popularmente conhecida no Brasil como graviola. Seus frutos contêm acetogenina, um composto com possíveis atividades antigenotóxicas. Neste sentido foi realizado o teste SMART em *Drosophila melanogaster* para avaliar o possível efeito antigenotóxico do extrato do fruto da graviola. As larvas provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) foram tratadas com as seguintes concentrações do extrato: puro; 1:1 e 1:2, isoladamente e associadas à doxorubicina (DXR). Os resultados desta análise demonstraram que o fruto não apresentou efeito genotóxico, observando-se ainda uma redução significativa de manchas quando associado à DXR, sugerindo uma possível ação antigenotóxica.

Palavras-chave: Genotoxicidade, doxorubicina, SMART.

Abstract: *Annona muricata* is a tree popularly known in Brazil as graviola. Their fruit contains acetogenins, a compound with possible antigenotoxic properties. In this study we performed the SMART test in *Drosophila melanogaster* to evaluate the antigenotoxic effect of the extract of the fruit of graviola. Larvae from the standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses were treated with the following concentrations of the extract: pure, 1:1 and 1:2, alone and associated with doxorubicin (DXR). The results of this analysis demonstrated that the fruit showed not present genotoxic effects, observed also a significant reduction of spots when associated with DXR, suggesting a possible action antigenotoxic.

Keywords: Genotoxicity, doxorubicin, SMART.

1. Introdução

A *Annona muricata*, popularmente conhecida como graviola, é uma árvore de pequeno porte pertencente à família *Annonaceae* (AZEVEDO, 2004). A gravioleira, planta de grande importância nos mercados frutícolas das Américas Central e do Sul, é cultivada principalmente no Norte e Nordeste Brasileiro. Seus frutos são amplamente utilizados na fabricação de sucos, sorvetes, compotas, geléias e doces (SACRAMENTO *et al.*, 2003). Seus principais constituintes químicos são as acetogeninas, quinolonas e isoquinolonas (ROMAN, 1998).

A planta é utilizada em quase sua totalidade como tradicional remédio em muitos países (RAINTREE NUTRITION, 2007). Suas propriedades antiviral (PADMA *et al.*, 1998), antiparasitária, adstringente, antireumático (SANTOS; SANT'ANA, 2001) e antileishmania (JARAMILLO *et al.*, 2000; LIAW *et al.*, 2002) são atribuídas às cascas, folhas e raízes do vegetal, entretanto existem poucos relatos sobre os efeitos maléficos da graviola no ser humano, apesar de estudos demonstrarem eficácia no controle de células tumorais. Seu fruto apresenta uma classe de fitoquímicos denominados acetogeninas anonáceas (GLEYE *et al.*, 1999 *apud* AVANZI; ALEIXO [s.d.]), e, segundo pesquisas realizadas, a citotoxicidade da acetogenina é mediada pela diminuição dos níveis de ATP através da inibição do complexo enzimático I (NADH desidrogenase) da cadeia transportadora de elétrons (DEGLI *et al.*, 1994 *apud* YUAN, 2003). As acetogeninas, também inibem as ubiquinonas, que são expressas constitutivamente nas membranas celulares das células cancerosas, mas expressa apenas transitoriamente em células normais (ALALI *et al.*, 1999 *apud* YUAN, 2003).

Tendo em vista que grande parte da população utiliza recursos naturais para seus cuidados primários em relação à saúde, estudos envolvendo plantas medicinais são válidos como medida de segurança e controle para o uso popular.

Neste sentido nota-se que existem substâncias que modificam genes específicos e outras variantes genéticas que contribuem para o desenvolvimento de mutações, tornando os testes genéticos úteis no rastreamento de agentes com potencial genotóxico. Assim, surge a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que visam à prevenção de alterações no material genético, utilizando para isto, métodos confiáveis e capazes de detectar e medir esse dano, como o teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART) que é comumente utilizado nessa área para a realização de testes de genotoxicidade *in vivo*, utilizando para isto o organismo teste, *Drosophila melanogaster*. Este inseto de fácil manipulação e manutenção em laboratório fornece um grande número de indivíduos por progênie além de apresentar considerável fração de genes homólogos aos do homem.

Muitos destes compostos já foram testados quanto à sua toxicidade, entretanto existem poucos relatos científicos sobre os efeitos da polpa da graviola no organismo, nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico e/ou antigenotóxico da polpa da graviola (*Annona muricata*), e também, avaliar a toxicidade, por meio do SMART, em células somáticas de *D. melanogaster*.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção do extrato do fruto da graviola (*Annona muricata*)

O extrato utilizado no experimento foi obtido comercialmente através da polpa da graviola (*Annona muricata*) já industrializada (Frutpres - polpa de graviola, lote n° 02085, registrado no MAPA sob n° MG0911300010-0). As larvas de *D. melanogaster* foram tratadas com o extrato nas seguintes concentrações: puro, 1:1 (1 parte de polpa e outra parte de água) e 1:2 (1 parte de polpa e 2 partes de água), isoladamente e associados à doxorubicina.

2.2. Agente Químico – Doxorubicina

O cloridrato de doxorubicina (Doxolem® - Eurofarma Laboratórios LTDA) é um pó liofilizado composto por metilparabeno, lactose e doxorubicina (DXR). É um quimioterápico usado restritamente por hospitais e laboratórios com emprego específico em neoplasias malignas. A DXR é eficaz no tratamento de leucemias agudas e linfomas malignos, bem como em tumores sólidos como, por exemplo, no câncer de mama (CHABNER *et al.*, 2006).

Acredita-se que a quebra do DNA por este quimioterápico seja mediada por sua intercalação ao DNA e a ligação à topoisomerase II. Esta droga reage com a enzima citocromo P450 redutase e forma intermediários de radicais semiquinonas, os quais reagem com oxigênio para produzir radicais de ânion superóxido que podem gerar peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila que atacam o DNA e oxidam suas bases (CHABNER *et al.*, 2006). Acredita-se que estas reações estejam envolvidas no seu mecanismo de citotoxicidade contra uma variedade de tumores (BRUNSTEIN; SILVA, 2006).

Estudos demonstraram, que a DXR induz mutações e recombinações somáticas em células de asas de *D. melanogaster* (ARAÚJO, 2008; COSTA e NEPOMUCENO, 2006). Por isto, neste trabalho a DXR foi utilizada como controle positivo, tendo em vista, sua comprovada ação genotóxica.

2.3. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática – SMART

Para a realização do experimento foram utilizadas três linhagens de *D. melanogaster*; *mwh*, *flr* e *ORR*. As moscas da linhagem *mwh* possuem o gene marcador no cromossomo 3 numa posição distal, caracterizado por expressar três ou mais pêlos em cada célula. A linhagem é mantida em homozigose por ser esta uma mutação viável. Os indivíduos *flare*³ possuem o gene *flr*³ numa posição proximal, também no cromossomo 3, e o pêlo malformado é caracterizado por se assemelhar a uma chama. O gene marcador *flr*³ é letal em homozigose (GRAF *et al.*, 1984), no entanto, foi desenvolvido um cromossomo homólogo balanceador *TM3, Bds* (*Third Multiple 3, Beaded-serrate*) que mantém a heterozigose da linhagem *flr*³.

A linhagem *Oregon R; flare³* (*ORR*) apesar de apresentar o marcador *flr³*, se difere da linhagem *flare³* por apresentar os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem *Oregon R* resistente ao DDT, além de possuir alta atividade de enzimas citocromo P450.

Para a obtenção dos descendentes necessários ao teste foram realizados dois cruzamentos: o cruzamento padrão (ST- Standard Cross) utilizando fêmeas virgens *flr³/TM3* cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF *et al.*, 1989) e o cruzamento de alta bioativação (HB- High Bioactivation) cruzando fêmeas virgens *ORR* com machos *mwh/mwh* (GRAF; VAN SCHAİK, 1992).

Destes cruzamentos nascem dois tipos de descendentes, os trans heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente, baseados no marcador *TM3/Bd^s*. O fenótipo dos descendentes MH desenvolve asa normal, com borda lisa, enquanto que os descendentes BH apresentam asas mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada, denominadas "serrate". Os descendentes MH (*mwh+/+flr³*) apresentam os cromossomos estruturalmente normais, enquanto que os descendentes BH (*mwh+/+TM3/Bd^s*) apresentam um cromossomo com um balanceador gênico com múltiplas inversões (*TM3/Bd^s*). Os indivíduos MH podem expressar pelos mutantes nas asas originados de alterações mutagênicas e recombinogênicas ocorridas no locus gênico *mwh* e *flr³*. Já os descendentes BH possuem um cromossomo balanceador *TM3/Bd^s* que inviabiliza o aparecimento de células com recombinação, ocorrendo apenas eventos mutagênicos (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995).

A oviposição ocorre 48 horas após o início dos cruzamentos, então, as larvas foram coletadas por filtração com um funil de metal e uma malha fina sob água corrente e transferidas para frascos contendo 1,5g de purê de batata (meio alternativo), e as concentrações da polpa da graviola testada: puro, 1:1 e 1:2. As larvas foram tratadas também com 0,125mg/mL de DXR (usado como controle positivo) e com água osmose reversa (usado como controle negativo). Após se alimentarem do meio e completarem a metamorfose, os adultos emergentes foram coletados e preservados em etanol 70%. Em seguida, as asas foram destacadas do corpo e colocadas aos pares sobre lâminas e fixadas com solução de Faure, onde prosseguiram para análise microscópica.

A análise das manchas mutantes foi feita em microscópio óptico de luz com aumento de 400X onde se observou todas as células das 7 regiões (A, B, C', C, D, D' e E) de cada asa, classificando-as em manchas simples, quando expressam apenas um dos marcadores (*mwh* ou *flr³*), ou manchas gêmeas, quando expressam os dois marcadores (*mwh* e *flr³*) na mesma mancha (GRAF *et al.*, 1984). Quanto ao tamanho as manchas foram classificadas em pequenas, quando apresentavam 1 ou 2 pêlos mutantes ou grandes, quando expressavam mais de 2 pêlos mutantes.

Após a análise das asas, os dados foram analisados estatisticamente seguindo a metodologia descrita por Frei & Würigler (1988), onde se utiliza o teste do qui-quadrado para proporções, baseando-se na hipótese de que na série tratada, a frequência de manchas não pode ser maior do que a frequência de mutação do controle apropriado e que a frequência de mutação induzida na série tratada não pode ser menor do que a maior frequência de mutação espontânea observada no controle.

3. Resultados e discussão

As Tabelas 1 e 2 mostram as frequências de manchas mutantes observadas nos indivíduos trans-heterozigotos (MH) de cada concentração, provenientes do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta bioativação (HB).

Foram analisados 50 indivíduos de cada concentração totalizando 800 indivíduos ou 1600 asas. As siglas MSP, MSG, MG, TM apresentadas em ambas às tabelas significam respectivamente manchas simples pequenas, manchas simples grandes, manchas grandes e total de manchas.

Tanto os resultados da Tabela 1 quanto da Tabela 2 demonstram que o extrato de graviola, em todas as concentrações, não apresentou ação genotóxica, uma vez que não induziu o aumento na frequência de manchas em relação ao controle negativo. Estes dados foram observados tanto no cruzamento padrão quanto no cruzamento de alta bioativação, o qual possui um alto nível de citocromo P450. Assim, se o extrato utilizado contivesse alguma substância capaz de, após a metabolização, causar algum dano às células, essa alta taxa de P450 seria capaz de convertê-los em seus metabólitos tóxicos que possivelmente causariam algum dano. Entretanto isto não foi observado, sugerindo que além de não apresentar atividade genotóxica, o extrato utilizado não possui pró-mutágenos sensíveis ao teste SMART.

A análise dos descendentes MH do cruzamento ST nos permite avaliar se ocorreu ou não a expressão de pêlos mutantes nas asas originados de mutações ou recombinações ocorridas no locus gênico *mwh* e *flr³*(GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995). Os resultados encontrados nos descendentes MH são suficientes para comprovar que os extratos, nas concentrações testadas, não foram capazes de provocar alterações nestes *loci* gênicos, ou seja, não induziram mutação nem recombinação.

Costa e Nepomuceno (2006) demonstraram que a DXR induz mutações e recombinações em células somáticas de *D. melanogaster* detectadas pelo teste SMART. Neste trabalho a DXR foi utilizada como controle positivo e quando submetido à análise notou-se uma alta taxa de pêlos mutantes nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento padrão (TM=194) e do cruzamento de alta bioativação (TM=280) corroborando com os resultados dos pesquisadores citados.

Tabela 1 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes diluições do extrato do fruto da graviola e associados com DXR (0,125mg/mL).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
<i>mwh/flr³</i>						
Contr. Neg. (Água)	50	(25)	0,0 (00)	0,0 (01)	0,5 (2)	24
Extrato 1:1	50	0,38 (19) -	6 (03) i	4 (02) I	8 (24) -	24
Extrato 1:2	50	0,54 (27) -	8 (04) i	2 (01) I	4 (32) -	32
Extrato puro	50	0,40 (20) -	0 (00) i	4 (02) I	4 (22) -	22
DXR (0,125 mg/mL)	50	(79) +	1,5 (79) +	0,9 (48) +	4,1 (206) +	194
Extrato 1:1 + DXR	50	0,66 (33) +	8 (14) +	4 (17) +	8 (64) +	60
Extrato 1:2 + DXR	50	1,70 (85) -	8 (79) -	4 (42) -	2 (206) -	195
Extrato puro + DXR	50	0,56 (28) +	0 (10) +	0 (05) +	6 (43) +	41

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr3* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Os dados apresentados na Tabela 1 remetem a análise dos descendentes MH do cruzamento padrão. Foi observado que quando associados à DXR, o extrato do fruto da graviola nas concentrações puro e 1:1 provocaram uma redução estatisticamente significativa em todas as categorias de manchas, provavelmente por se tratar de um extrato mais concentrado e com grandes quantidades de alguns constituintes como o que acreditamos ser a acetogenina. Estes componentes podem ter interferido na ação da

doxorrubicina por mecanismos ainda desconhecidos, embora alguns autores tenham descrito os possíveis modos de ação dessa substância. Porém quando a DXR foi associada ao extrato na concentração 1:2 não foi verificada uma redução na frequência de manchas, talvez por pouca quantidade de ativos, que neste caso, foi insuficiente para reduzir a frequência de manchas como foi observado nas concentrações puro e 1:1.

Muitas espécies foram avaliadas quanto à mutagenicidade, apresentando resultados negativos como os descritos por Zhang *et al.* (2004) que avaliaram “aparas de bambu” (*Bambusa tuldoides*) usadas para reduzir ou curar dores de estômago, vômitos e diarreias, e resultados de Ozaki *et al.* (2002) que comprovaram que “frutos de gardênia” (*Gardenia jasminoides*) usados como corantes não são prejudiciais ao DNA. No presente experimento ficou evidente que não houve um aumento na frequência de manchas mutantes em relação ao controle negativo, concluindo que a graviola não apresenta um potencial risco ao DNA, podendo sugerir uma atividade antimutagênica e/ou antirrecombinogênica.

Por outro lado muitos produtos naturais podem apresentar efeitos nocivos como é o caso do extrato hidroalcoólico da planta conhecida popularmente como “louro-de-cheiro” (*Ocotea duckei vattimo*) que apresentou atividade mutagênica quando submetido a alguns testes de mutagenicidade (MARQUES *et al.*, 2003).

É bem documentado que mutações gênicas atuam em etapas do processo de carcinogênese e apenas para referir, a acetogenina anonácea inibe o complexo enzimático I (NADH desidrogenase) da cadeia transportadora de elétrons e também as ubiquinonas que estão expressas constitutivamente nas membranas de células cancerosas, deste modo reduzem os níveis de ATP e conseqüentemente morte da célula (DEGLI *et al.*, 1994 *apud* YUAN, 2003).

As acetogeninas, segundo Degli *et al.* (1994) *apud* Yuan (2003), inibem o complexo I, e como consequência, tem-se uma depleção de ATP causada pela falta de gradiente eletroquímico, uma vez que os íons hidrogênio não são bombeados para o espaço intermembrana devido a inibição do complexo I, NADH desidrogenase, tal fato pode explicar pelo qual meio as acetogeninas encontradas nas anonáceas causam uma citotoxicidade. Em contrapartida inibem também as ubiquinonas que estão expressas constitutivamente nas células cancerígenas e apenas de forma transitória nas demais células, e, por um mecanismo semelhante ao citado acima, impede a transferência de elétrons de um complexo para o outro, deixando-os “ocupados” e os inviabilizando de receber novas moléculas e conseqüentemente não ocorre o bombeamento de íons hidrogênio, que não gera o gradiente eletroquímico, não ocorrendo a síntese de ATP. Tais mecanismos sugerem certa seletividade para células tumorais e uma fonte promissora para novas drogas.

A Tabela 2 mostra a frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH do cruzamento de alta bioativação. Neste caso, quando associados à DXR, o extrato do fruto da graviola, em todas as concentrações, apresentou uma redução estatisticamente significativa em todas as categorias de manchas.

Tabela 2 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes diluições do extrato do fruto da graviola e associados com DXR (0,125mg/mL).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
<i>mwh/flr³</i>						
Contr. Neg. (Água)	50	1,40 (70)	0,14 (07)	0,02 (01)	1,56 (78)	78
Extrato 1:1	50	1,32 (66) -	0,12 (06) i	0,02 (01) i	1,46 (73) -	68
Extrato 1:2	50	1,46 (73) -	0,08 (04) -	0,02 (01) i	1,56 (78) -	78
Extrato puro	50	1,30 (65) -	0,10 (05) i	0,00 (00) i	1,40 (70) -	69
DXR (0,125 mg/mL)	50	1,80 (90) -	2,78 (139) +	1,40 (70) +	5,98 (299) +	280
Extrato 1:1 + DXR	50	1,50 (75) -	0,28 (14) +	0,08 (04) +	1,86 (93) +	92
Extrato 1:2 + DXR	50	1,82 (91) -	0,84 (42) +	0,54 (27) +	3,20 (160) +	157
Extrato puro + DXR	50	1,30 (65) f+	0,14 (07) +	0,04 (02) +	1,48 (74) +	74

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr3* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Nota-se, na Tabela 2, que o número total de manchas aumentou à medida que a concentração de graviola foi diminuindo. A alta taxa de metabolização associada ao extrato do fruto da graviola provocou uma redução de manchas nos testes onde se tem uma maior concentração do extrato da graviola, sugerindo que no extrato existe algum constituinte químico capaz de reduzir mutações induzidas pela DXR.

No que diz respeito à mutagenicidade da graviola, poucos estudos foram publicados, entretanto pesquisas têm sido realizadas, sobretudo sobre um de seus metabólitos secundários, as acetogeninas.

Aguirre (2008) descreveu os efeitos genotóxicos produzidos por uma fração de acetogenina isolada de *Annona cherimólia*, uma anonácea da família da graviola. Os

referidos autores demonstraram um aumento de micronúcleos em eritrócitos policromáticos induzidos pela fração da acetogenina, além de determinar sua citotoxicidade em fibroblastos de ratos e em ensaios “*in vitro*” de células derivadas de câncer de cólon.

O extrato etanólico de sementes de araticum (*Annona crassiflora*) também foi estudado e, segundo Santos *et al.* (1996) ele apresentou citotoxicidade “*in vitro*” para células provenientes de carcinoma de pulmão e melanoma. Similarmente, Vilar *et al.* (2008), em estudos conduzidos pelo teste de micronúcleos em camundongos, demonstraram que o araticum, por conter, também, níveis significativos de acetogeninas, possui um potencial citotóxico, calculado pelos autores pela razão entre eritrócitos policromáticos e monocromáticos.

Outros estudos realizados por Chiu *et al.* (2003), vão mais além, eles descrevem que a diminuição dos níveis de AMPc e GMPc podem, também, desempenhar um importante papel na via de apoptose induzida por acetogeninas, assim como inibição do complexo enzimático I da cadeia transportadora de elétrons, já descrito anteriormente por Degli *et al.* (1994) *apud* Yuan (2003).

4. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que, nas condições experimentais delineadas nesta pesquisa, a DXR induz mutação e recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e que o extrato da polpa da graviola além de não apresentar atividade genotóxica, apresenta uma possível atividade antimutagênica e/ou antirrecombinogênica.

Referências

AGUIRRE, K. K. G. Genotoxic and Cytotoxic Effects Produced by Acetogenins btained from *Annona cherimolia*. *Biol. Pharm. Bull.* 31(12) 2346-2349. vol. 31, n. 12, 2008.

ARAÚJO, B. C. Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*) contra a ação genotóxica da doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaste*. Universidade Federal de Uberlândia: Instituto de Genética e Bioquímica. Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia. MG. 2008.

AVANZI, C. J. A.; ALEIXO, A. M. Identificação e Caracterização dos Compostos dos Extratos Vegetais das Folhas da Graviola (*Annona Muricata*) e dos Vegetais da Casca do Pau D'arco. Disponível em: UNIMEP <<http://www.unimep.br/phpg/mostracademica/anais/4mostra/pdfs/292.pdf>> Acesso em: 8 fev. 2010.

AZEVEDO, R. Anonáceas vão à Bangkok, in: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Novembro, 2004. . Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias>>. Acesso em: 6 jan. 2010.

BRUNSTEIN, C. G.; SILVA, H. N. S. Fármacos Antineoplásicos, in: FUNCHS, F. D.; WANNMA-CHER, L.; FERREIRA, M. B. *Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica Funcional*. 3 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2006, cap. 42, p. 502-531.

CHABNER, B. A. *et al.* Quimioterapia das Doenças Neoplásicas, in: GILMAN, A. G. *et al.* *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11 ed. Rio de Janeiro. McGraw-Hill Interamericana do Brasil. 2006, cap. 51, p. 1185-1264.

CHIU, H.F. *et al.* Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. *Biochemical Pharmacology*. 65. 319±327. 2003

COSTA, W.F.; NEPOMUCENO, J.C. 2006. Protective Effects of a Mixture of Antioxidant Vitamins and Mineral on the Genotoxicity of Doxorubicin in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): 18-24.

FREI, H.; WURGLER, F. E. Statistical methods to decide whater mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.* 203,1988. p. 297-308.

GRAF, U. *et al.* Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Res.* V. 222, p. 359 – 373, 1989.

GRAF, U. *et al.* Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis*. v. 6, p. 153-188, 1984.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* v. 271, p. 59-67, 1992.

GUZMÁN-RINCON, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor, in: BUTTERWORTH, F. M.; CORKUN, L. D.; GUZMÁN-RINCON, J. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. New York: Edit by F. M. Butterworth *et al.*, *Phenunm Press*, 1995, p. 169-181.

JARAMILLO, M.C.; ARANGO, G.J.; GONZALEZ, M.C.; ROBLEDO, S.M.; VELEZ, I.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia* 2000;71:183-6.

LIAW, C.C.; CHANG, F.R.; LIN, C.Y.; CHOU, C.J.; CHIU, H.F.; WU, M.J. *et al.* New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *J Nat.Prod.* 2002; 65:470-5.

MARQUES, R.C.P. *et al.* Evaluation of the mutagenic potential of yangabin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutat Res.* 536(1-2):117-20, 2003.

OZAKI, A. *et al.* Genotoxicity of gardenia yellow and its components. *Food Chem Toxicol.*

40:1603–10, 2002.

PADMA P.; PRAMOD, N.P.; THYAGARAJAN, S.P.; KHOSA, R.L. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. *J. Ethnopharmacol.* 1998; 61:81-3.

RAINTREE NUTRITION. Tropical Plant Database. *Raintree Nutrition, Inc.*, Carson City, NV 89701. 2007. Disponível em: <www.rain-tree.com/graviola.htm>. Acesso em: 6 jan. 2010.

ROMAN, G. Tropical myeloneuropathies revisited. *Cur. Opin. Neurol.* 1998;11:539-44.

SACRAMENTO, S. C. *et al.* Caracterização Física e Química de Frutos de Três Tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.) *Rev. Bras. Frutic.*, São Paulo. 2003. v. 25, n. 2, p. 329-331.

SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A.E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phyto-medicine.* 2001; 8: 115-20.

SANTOS, P. L. *et al.* Araticunlin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora*. *Phytochemistry*, vol. 42, no. 3, p. 705-707, 1996.

VILAR, J.B. *et al.* Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.*, 68(1): 141-147, 2008.

YUAN, S. S. F. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. *Elsevier Science Inc.*, 2003.

ZHANG, Y. *et al.* Safety evaluation of a triterpenoid-rich extract from bamboo havings. *Food Chem Toxicol.* 42:1867–75, 2004.