

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

CARLA DANIELE PINHEIRO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO ANTICANCERÍGENA DE UM FLAVONÓIDE RARO ISOLADO DAS
RAÍZES DE *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann EM LINHAGEM DE
CÉLULAS DE PRÓSTATA.**

São Luís

2019

CARLA DANIELE PINHEIRO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO ANTICANCERÍGENA DE UM FLAVONÓIDE RARO ISOLADO DAS
RAÍZES DE *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann EM LINHAGEM DE
CÉLULAS DE PRÓSTATA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia da
Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – Campus
Bacanga, como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Quintino da Rocha

São Luís

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Pinheiro Rodrigues, Carla Daniele.

AValiação ANTICANCERÍGENA DE UM FLAVONÓIDE RARO ISOLADO
DAS RAÍZES DE *Fridericia platyphylla* Cham. L. G. Lohmann
EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE PRÓSTATA / Carla Daniele

Pinheiro Rodrigues. - 2019.

39 p.

Orientador(a): Prof. Dra. Claudia Quintino da Rocha.
Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Brachydina F. 2. Câncer. 3. Flavonoide dimérico.
I. Quintino da Rocha, Prof. Dra. Claudia. II. Título.

CARLA DANIELE PINHEIRO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO ANTICANCERÍGENA DE UM FLAVONÓIDE RARO ISOLADO DAS
RAÍZES DE *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann EM LINHAGEM DE
CÉLULAS DE PRÓSTATA.**

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Me. Luís Mário da Silva Silveira - UFMA (Membro 1- Examinador Interno Titular)

Dr. Roberto Sigfrido Gallegos Olea – UFMA (Membro 2 -Examinador Interno Titular)

Dra. Cláudia Quintino da Rocha (UFMA - Orientadora)

São Luís

2019

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, guia, socorro presente na hora da angústia, a meu pai Valber, minha mãe Luiza e a minha irmã Diana.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que me deu força e coragem para vencer todos os obstáculos e dificuldades enfrentadas durante o curso, que me socorreu espiritualmente, dando-me serenidade e forças para continuar.

Agradeço minha orientadora, Prof^a. Dra. Cláudia Quintino da Rocha, pela confiança e dedicação, por toda liberdade no desenvolvimento deste estudo e por ter acreditado em meu potencial me conduzindo para esta realização. Sem você eu não estaria aqui. Faltam palavras para dizer o que você representa na minha vida acadêmica.

Aos meus Pais, Valber e Luiza, que sempre foram minha base forte nesta caminhada, o meu muito obrigado por tudo àquilo que me instruíram e por todos os princípios que me foram passados. Agradeço a Deus por vocês serem à base da minha sustentação. Amo vocês.

À minha irmã Diana e as minhas primas Isa, Isanéia, Ruth e Lúcia por todo incentivo durante essa jornada.

Aos amigos do Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos (LEAF): Jessyane (meu apoio em todos os momentos), Marcos, Lurdes, Lenivaldo, Felipe, Rafaela, Luna, Aglaete, Yan, Flávio, José, Icaro e Aldilene pela companhia, risadas e colaboração nesse trabalho.

Agradeço a professora Lúcia Daniele e Adriana Sá pelas palavras de incentivo, mesmo distantes torciam por mim. Obrigada por existirem e fazerem a minha vida mais feliz.

À Dr. Manuel pelo exemplo de competência e inteligência, por todo apoio e ajuda durante o curso, sem ele sei que jamais conseguiria concretizar o meu sonho.

À Dra. Luzia pelas sábias palavras nas horas que mais precisei, sempre me apoiando e mostrando que eu seria capaz de realizar com mérito esse trabalho.

À minha amiga Eurismar Fernandes, muito mais que amiga, um anjo em minha vida que sempre acreditou no meu potencial até mesmo quando eu ficava desacreditada, jamais esquecerei.

Aos amigos e colegas do laboratório INLAB, que dentre tantas conversas sempre me incentivaram a nunca desistir.

Aos amigos Clediel, Kelma, Keyla, Eliane, Adagilza, Kaliane, Rosiane, Patrícia, Márcia e Frank por todo apoio durante a minha trajetória.

Às amigas que a graduação me deu Caroline, Hilka e Alana por todo o carinho, atenção e amizade em todos os momentos que compartilhamos. Amizade daquelas que agente guarda no coração.

Às minhas tias Elisete, Dirrosa e Irene que estiveram sempre ao meu lado me apoiando em todos os momentos.

Ao meu anjo amigo Thiago (*in memorian*), sempre acreditou em mim e me falava pra eu nunca desistir mesmo diante de todas as tribulações que podiam está no caminho.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”. Josué 1:9

RESUMO

O câncer é uma doença com alta taxa de mortalidade. Os produtos naturais são uma fonte rica de substâncias com propriedades anticancerígenas capazes de interceder na proliferação celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e metástase. Apesar do avanço no desenvolvimento de terapias antineoplásicas, os quimioterápicos derivados de plantas continuam sendo a base do tratamento para a maioria dos tipos de câncer. Entre as substâncias naturais, os flavonóides são um grupo de metabólitos secundários de plantas com considerável interesse científico e terapêutico. Nos últimos anos, especial atenção foi dada aos flavonóides diméricos ou biflavonoides, que são o resultado da ligação de duas unidades de flavona, flavanona, flavanonol, flavanol, auronas ou mesmo suas misturas. Por causa de suas atividades promissoras, essas substâncias podem representar um grande potencial para o desenvolvimento de drogas contra muitas doenças, incluindo o câncer. Portanto, a atividade antiproliferativa de brachydina F, um raro flavonoide dimérico isolado das raízes de *Fridericia platyphylla*, foi inicialmente avaliada em um painel de cinco linhagens de células tumorais humanas: U-251-glioma, MCF7-mama, 786-0-rim, NCI-H460-pulmão e PC-3-próstata. Como resultado, brachydina F reduziu o crescimento celular de todas as linhagens tumorais avaliadas, sendo as células prostáticas PC-3 uma das mais sensíveis ao tratamento, inibiu a migração e replicação de células PC-3, induzindo-as ao processo de morte por apoptose. Os resultados obtidos sugerem que brachydina F é uma substância promissora a ser mais explorada por seus efeitos antitumorais. Este é o primeiro trabalho que relata as propriedades antiproliferativas desse flavonoide dimérico, isolado pela primeira vez em planta brasileira por nosso grupo de pesquisa.

Palavras-chave: brachydina F, câncer, flavonoide dimérico.

ABSTRACT

Cancer is a disease with a high mortality rate. Natural products are a rich source of substances with anticancer properties capable of interfering in cell proliferation, differentiation, apoptosis, angiogenesis and metastasis. Despite advances in the development of antineoplastic therapies, plant-derived chemotherapeutics remain the basis of treatment for most types of cancer. Among natural substances, flavonoids are a group of secondary plant metabolites with considerable scientific and therapeutic interest. In recent years, special attention has been paid to dimeric or biflavonoid flavonoids, which are the result of the binding of two units of flavone, flavanone, flavanonol, flavanol, aurones or even mixtures thereof. Because of their promising activities, these substances may pose great potential for drug development against many diseases, including cancer. Therefore, the antiproliferative activity of brachydin F, a rare dimeric flavonoid isolated from the roots of *Fridericia platyphylla*, was initially evaluated in a panel of five human tumor cell lines: U-251-glioma, MCF7-breast, 786-0- NCI-H460-lung and PC-3-prostate. As a result, brachydin F reduced cell growth of all tumor lines evaluated, PC-3 prostate cells being one of the most sensitive to treatment, inhibiting the migration and replication of PC-3 cells, inducing them to the cell death process by apoptosis. The results obtained suggest that brachydin F is a promising substance to be further explored for its antitumor effects. This is the first work that reports the antiproliferative properties of this dimeric flavonoid, isolated for the first time in a Brazilian plant by our research group.

Key words: brachydina F, cancer, dimeric flavonoid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da substância brachydina F isolada da fração acetato das raízes de <i>Fridericia platyphylla</i>	16
Figura 2 - Substâncias isoladas de plantas do cerrado com potencial biofarmacológico.....	18
Figura 3- <i>Fridericia platyphylla</i> (1) com detalhe do caule (2) e raiz (3).	19
Figura 4 - Cromatograma de separação por CLAE-UV/Vis dos constituintes químicos presentes no extrato EtOH 70% das raízes, fase DCM, fase acetato e a fração contendo a brachydina F isolada, de <i>F. platyphylla</i>	27
Figura 5- Espectro de massa de baixa resolução no modo positivo da brachydina F [(M+H+Na) ⁺]: 913.05].	287
Figura 6 - Espectro de massa de alta resolução no modo negativo da brachydina F [(M-H) ⁻]: 889.2559]......	28
Figura 7- Proposta de fragmentação da brachydina F no modo negativo.	28
Figura 8- Espectro de RMN ¹ H da brachydina F em CD ₃ OD.....	31
Figura 9- Atividade antiproliferativa da brachydina F para o ensaio realizado em cultura de célula tumoral humana, relacionando a porcentagem de crescimento versus concentração, após 48 horas de incubação.	32
Figura 10: A-D - Fotomicrografias de células PC-3 às 0h (A e C) e após 48h de tratamento com DMSO (B) e 11 µM de brachydina F (D). E - Porcentagem de fechamento da ranhura na linhagem PC-3 ao longo do período de tratamento (24h e 48h) com DMSO e 11 µM de brachydina F. ** p <0,01 (ANOVA, teste de Tukey). F-G - Fotografias de colônias de PC-3 tratadas com DMSO (F) e 11 µM brachydina F (G) após 21 dias. H – Número de colônias de PC-3 formadas após 21 dias de tratamento com DMSO e 11 µM brachydina F *** p <0,001 (teste T).....	32
Figura 11: Gráficos de dados de A-B - Anexina V-PE / 7AAD obtidos para tratamento com DMSO (A) e 11 µM de brachydina F (B). C - Aumento de células marcadas com anexina com consequente declínio de células viáveis promovidas pela substância brachydina F * p <0,05 (ANOVA, Bonferroni).....	33
Figura 12: Estrutura básica das chalconas.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado da estrutura brachydina F no espectro de RMN.	30
Tabela 2- Linhagens células utilizada para ensaio <i>in vitro</i>	32
Tabela 3- Resultado da concentração mínima de brachydina F necessária para inibir 50% do crescimento celular (GI ₅₀).	32

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Os produtos naturais e sua importância na medicina moderna	17
2.2	Cerrado e suas potencialidades na química de produtos naturais bioativos.....	18
2.3	Família Bignoniaceae e gênero <i>Fridericia</i>	19
3.	OBJETIVOS.....	21
3.1	Objetivo geral	21
3.2	Objetivos específicos.....	21
4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	22
4.1	Procedimentos Fitoquímicos	22
4.1.1	Coleta e preparo do extrato.....	22
4.1.2	Partição Líquido/Líquido.....	22
4.1.3	Fracionamento da fase acetato.....	22
4.1.4	Análise das frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV/vis) ..	23
4.1.5	Caracterização química por Espectrometria de Massas (ESI/MS).....	23
4.1.6	Caracterização por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H.	23
4.2	Avaliação do potencial anticancerígeno de brachydina F	24
4.2.1	Linhas para os testes da avaliação anticancerígena	24
4.2.2	Congelamento e descongelamento de células	24
4.3	Ensaio <i>in vitro</i>	24
4.3.1	Avaliação de atividade antiproliferativa.....	24
4.3.2	Ensaio de migração celular (cicatrização de feridas)	25
4.3.3	Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico).....	26
4.3.4	Quantificação de células em estágios de apoptose	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

5.1	Identificação da substância isolada da fase acetato do extrato EtOH 70% das raízes de <i>Fridericia platyphylla</i>	27
5.2	Atividade da brachydina F em ensaios <i>in vitro</i>	31
5.2.1	Brachydina F apresenta atividade antiproliferativa pelo método colorimétrico MTT.	31
5.2.2	Brachydina F previne a migração e invasão celular na linhagem celular PC-3.	33
5.2.3	Brachydina F induziu morte celular na linhagem celular PC-3.....	34
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
	REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo em um processo denominado metástase. O câncer está entre as principais causas de morte no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, para o ano de 2030, são esperados 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população (INCA, 2018).

O câncer de próstata é a segunda neoplasia mais comum no mundo entre os homens, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Algumas pesquisas mostram a íntima relação entre a incidência deste câncer e hábitos alimentares, trazendo a nutrição como um possível fator preventivo. Estudos epidemiológicos evidenciam maior incidência do cancro da próstata em homens com alimentação baseada em alto consumo de gordura animal e baixo consumo de frutas, verduras, grãos, cereais integrais e vegetais ricos em carotenoides (FITZMAURICE et al., 2013).

O quimioterápico mais utilizado na clínica para o tratamento do câncer de próstata é o docetaxel, que possui extensos efeitos colaterais, como neutropenia, trombocitopenia, reações cutâneas, toxicidade hepática. Outros três quimioterápicos também utilizados na clínica são a mitoxantrona e estramustina, que apresentam efeitos colaterais como indução de leucemia e formação de coágulos sanguíneos, respectivamente (PETRYLAK et al., 2004); e o enzalutamide, que prolonga a sobrevida global de pacientes com câncer de próstata metastático, porém apresenta efeitos adversos como fadiga e hipertensão (HUSSAIN et al., 2018 /BEER et al., 2014). Já a radioterapia possui um risco de recorrência em torno de 30-60% (REIS, 2018). Desta forma, tem sido intensa a busca por novos agentes antineoplásicos para o tratamento do câncer de próstata que sejam mais potentes e apresentem menos efeitos colaterais. Neste contexto, os produtos naturais têm sido amplamente utilizados para o tratamento de várias doenças, inclusive o câncer (RAJESH et al., 2015).

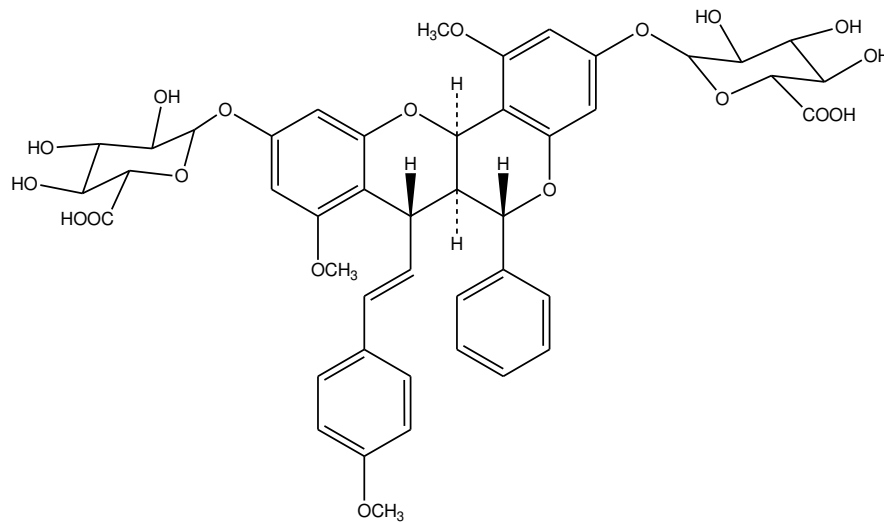
Dentre os compostos naturais destacam-se os flavonoides, um grupo amplo de metabólitos secundários de plantas polifenólicas (FANG et al., 2010). Estudos desenvolvidos nos últimos anos tem mostrado que os flavonoides são capazes de inibir a proliferação celular, o crescimento tumoral e a carcinogênese. Tem sido amplamente reportado que os flavonoides

interferem na iniciação, promoção e progressão do câncer, por modularem diferentes enzimas e receptores responsáveis pela proliferação celular, diferenciação, apoptose, inflamação, angiogênese, metástase e reversão da resistência a múltiplas drogas. (XIAO et al., 2014).

Recentemente, artigos publicados pelo nosso grupo mostraram que a investigação fitoquímica do extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla* (sinonímia *Arrabidaea brachypoda*) levou ao isolamento de vários constituintes: dois derivados feniletanóides glicosilados, dez flavonoides diméricos agliconas e glicosilados, dentre eles a substância brachydina F (figura 1), descritos pela primeira vez em uma espécie da flora brasileira.

Os relatórios científicos que mencionam esta espécie rica em substâncias raras permanecem insuficientes e requerem investigação adicional. As substâncias isoladas desta espécie distinguiram-se de todas as outras porque se enquadram num grupo raro de flavonóides diméricos, tornando o estudo das propriedades anticancerígenas da brachydina F ainda mais interessante e favorável, bem como sem precedentes.

Figura 1- Estrutura química da substância brachydina F isolada da fração acetato das raízes de *Fridericia platyphylla*.



Fonte: Autor (2019).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Os produtos naturais e sua importância na medicina moderna

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse no aproveitamento de fontes naturais, principalmente no que se refere às plantas para o uso farmacêutico, sendo que, na última década houve um significativo crescimento no uso de medicamentos fitoterápicos (BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2010).

A importância dos produtos naturais é particularmente evidente nas áreas de câncer e doenças infecciosas, onde 60% e 75% das drogas, respectivamente, são de origem natural (NEWMAN et al., 2003).

A utilização de produtos naturais de plantas e seus constituintes químicos, a fim de descobrir e desenvolver medicamentos anticancerígenos ainda está viva e mais de 50% das drogas em ensaios clínicos para a atividade anticâncer foram isoladas a partir de fontes naturais ou estão relacionados a eles (Newman e Cragg, 2016). De entre os produtos naturais, compostos derivados de plantas têm sido uma importante fonte de vários agentes anticâncer clinicamente úteis (CRAGG et al., 2005).

O câncer continua a ocorrer entre as populações de países de todo o mundo. De acordo com recentes números globais, houve mais de oito milhões de mortes por câncer em 2012, das quais cerca de 65% ocorrem em países em desenvolvimento. Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão, mama, intestino e próstata. No Brasil, no biênio 2018-2019 teve a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano, com tendência do surgimento de 68.220 novos casos de próstata. O cálculo global corrigido para o sub-registro, segundo Mathers et al., aponta a ocorrência de 640.000 casos novos de câncer. Essa estimativa reflete o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto entre os mais incidentes, sendo o câncer de próstata e mama feminina os mais frequentes. Esses valores correspondem a um risco estimado de 66,12 casos novos a cada 100 mil homens.

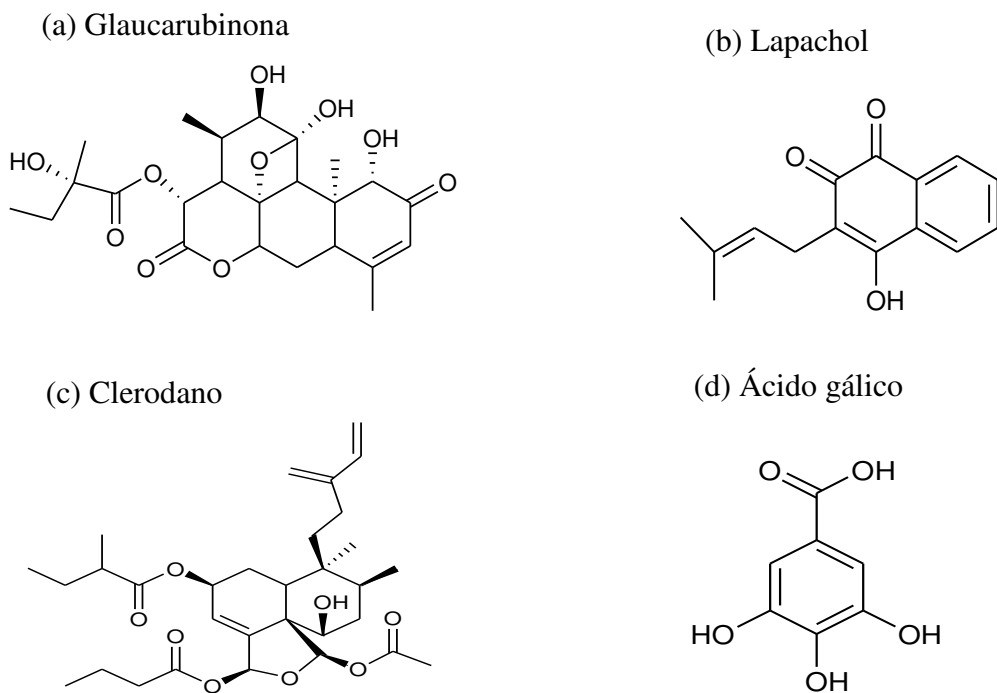
Os produtos naturais isolados e seus análogos têm sido usados na medicina moderna por muitas décadas como agentes quimioterápicos, aproximadamente 50% das moléculas aprovadas para quimioterapia são de origem natural (REN, 2019). As plantas, especialmente aquelas do cerrado, são potencial fonte de moléculas líderes para esses tratamentos (TIUMAN et al., 2011; SAHA et al., 2011).

2.2 Cerrado e suas potencialidades na química de produtos naturais bioativos

O cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas. Existe uma grande diversidade de habitats, que determinam uma notável alternância de espécies entre diferentes fitofisionomias. O cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional. A sua área contínua incide sobre os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas (BRASIL, 2018).

A riqueza dos metabólitos no bioma cerrado tem sido reportada na literatura, em diversos relatos de atividade em modelos biológicos, a figura 2 mostra as substâncias isoladas em espécies nativas do Cerrado. O extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor* levou ao isolamento da glaucarubinona fig. 2 (a), substância bastante ativa sobre as células de câncer, apresentando resultados inéditos sobre as células HL-60 (leucemia), SF-295 (glioblastoma) e HCT-8 (cólon) (MESQUITA, 2009).

Figura 2 - Substâncias isoladas de plantas do cerrado com potencial biofarmacológico.



Fonte: Mesquita, 2009; Rodrigues et al 2005; Espindola et al 2004; Sá et al 2018; Lião et al 2008; Cunha et al 2012.

Essas substâncias apresentam alto impacto em várias áreas, como agropecuária, indústria farmacêutica e cosmética. Embora com uma rica diversidade vegetal, o cerrado ainda é pouco explorado e estudado. O interesse da comunidade científica é ainda maior diante do cenário de desmatamento e da perda de biodiversidade do bioma. Dentre várias espécies com potencial químico e biológico daremos destaque a *Fridericia platyphylla*.

Fridericia platyphylla (figura 3) é um arbusto nativo do cerrado brasileiro, possui entre 1,0 e 2,0m de altura, abundantemente ramificado, com folhas simples e flores róseo-roxas em inflorescências terminais (ALCERITO et al., 2002; GARCIA, 2008).

Figura 3- *Fridericia platyphylla* (1) com detalhe do caule (2) e raiz (3).



Fonte: Autor (2019).

2.3 Família Bignoniaceae e gênero *Fridericia*

A família Bignoniaceae é composta por 120 gêneros e 800 espécies (NOGUEIRA, 2015) de plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras (PAULETTI, 2004). Plantas desta família se situam em diversos habitats do território brasileiro, desde a Mata Atlântica até o Cerrado, sendo, amplamente encontrada no país. Além de ser utilizada em diversos ramos, sendo o principal deles na construção civil e carpintaria. (PAULETTI, 2004). As plantas mais exploradas no Brasil são as do gênero *Fridericia*.

O gênero *Fridericia*, também pertencente à família Bignoniaceae, é frequentemente encontrado na América tropical, do México à Argentina (LIMA et al., 2003), e é o maior

gênero da tribo Bignonieae com aproximadamente 100 espécies. Sua taxonomia é complexa, pois muitas características diagnosticadas neste gênero são compartilhadas com espécies de outros gêneros. O gênero mais próximo morfológicamente é o *Cuspidaria*, o qual se diferencia de *Fridericia* pelos lacínios do cálice mais alongados (GARCIA, 2008).

Na medicina popular, ervas do gênero *Fridericia* são utilizadas para diversos fins terapêuticos como adstringentes, tratamentos de inflamações, além de possuir propriedades antimicrobianas e antitumorais (ROCHA, 2014). Apesar de ser muito utilizada, há poucos estudos que relatam suas particularidades químicas, sendo isto, fundamental para a caracterização de uma espécie.

Estudos realizados por ROCHA e colaboradores (2011) demonstraram que os extratos das raízes da *Fridericia platyphylla* possuem atividade analgésica efetiva e uma pronunciada atividade anti-inflamatória em modelos animais *in vivo*. Em 2015, ROCHA confirmou a ação anti-inflamatória do extrato da raiz e evidenciou a presença triterpenos na espécie. No ano seguinte ROCHA (2016) apresentou os efeitos gastroprotetores do extrato da raiz da *Fridericia platyphylla* através de evidências da citoproteção.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade anticâncer do flavonoide dimérico brachydina F, isolado da espécie vegetal *Fridericia platyphylla* L na linhagem PC-3 (próstata).

3.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato hidroetanólico 70% das raízes de *Fridericia platyphylla* L;
- Isolar em escala preparativa a substância brachydina F;
- Avaliar o potencial *in vitro* do flavonoide dimérico brachydina F na linhagem tumoral PC-3 pelo método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5- Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT), ensaio de migração celular (cicatrização de feridas), ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico) e quantificação de células em estágios de apoptose.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Procedimentos Fitoquímicos

4.1.1 Coleta e preparo do extrato

As raízes de *Fridericia platyphylla* foram coletadas em abril de 2018 na Fazenda Sant'Ana da Serra em João Pinheiro, Minas Gerais, Brasil. A planta foi identificada no Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto pela botânica Dra. Maria Cristina Teixeira Braga Messias. Um voucher (n ° 17.935) foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Ouro Preto em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A autorização para coleta e estudos científicos foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A451DE4.

As raízes (1000g) foram secas a 50 °C em estufa por 72 h e trituradas em moinho de facas. O pó obtido foi extraído com etanol/água (7:3) por meio de percolação exaustiva. Após a extração, o líquido extrator foi evaporado sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 50 °C. O extrato foi transferido para frascos de vidros e, posteriormente, liofilizado para completa remoção do solvente, produzindo 200,0 g de extrato hidroetanólico.

4.1.2 Partição Líquido/Líquido

O extrato hidroetanólico 70% foi dissolvido em água/metanol (7:3) e particionado com acetato de etila, em seguida as fases aquosa e acetato de etila foram concentradas em evaporador rotativo em temperatura inferior a 50 °C e liofilizadas para remoção completa dos solventes, obteve-se um rendimento de aproximadamente 35% (70g) para fase aquosa e 65% (130g) para a fração acetato com base na massa seca.

4.1.3 Fracionamento da fase acetato

A fase acetato (5g) foi fracionada em uma coluna de vidro, preenchida com um adsorvente, sílica gel 60 (0,063- 0,200 mm). O empacotamento da coluna foi realizado com hexano e acetato de etila e (4:6, v/v) e em seguida ocorreu a aplicação via seca da amostra no topo da coluna. Um gradiente de polaridade crescente de solventes foi usado como fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. No total foram obtidas 515 frações que em seguidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada e agrupadas de acordo com a semelhança do perfil.

4.1.4 Análise das frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV/vis)

O grau de pureza das substâncias foi analisado por CLAE-UV/vis, modelo Shimadzu (Shimadzu Corp. Quioto, Japão), constituído por um módulo de bombas binário, detector UV-VIS (SPA-10A) com coluna Luna 5 μ m C18 100 A (150 μ m x 4,6 μ m). Os solventes de eluição A (Água e Ácido acético a 1%) e B (Metanol). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 10% a 70 % de B em 70 min a um fluxo de 1mL/min. O volume de injeção da amostra foi de 20 μ L. Os dados foram coletados e processados utilizando o software LC Solution.

4.1.5 Caracterização química por Espectrometria de Massas (ESI/MS)

Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados em LCQ Equipamento de Frota (Thermo Scientific) equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo (FIA). A matriz estudada foi analisada por ionização por eletrospray (ESI), a fragmentação em múltiplos estágios (MS^2 , MS^3 e MS^n) foi realizada em uma interface de prisão de íon (IT). O modo negativo e positivo foi selecionado para a geração e análise dos espectros de massa para primeira ordem (MS) e para os demais experimentos em múltiplos estágios nas seguintes condições: tensão capilar, 25 V; Voltagem spray, 5 kV; e temperatura capilar, 275 °C. Um gás de arraste (N_2) com um fluxo de 8 unidades arbitrárias (A.U.), e o gás de colisão foi o hélio (He). A aquisição da faixa foi m/z 100-1000. O software Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finnigan, Waltham, MA) foi usado para adquirir e processar os dados.

4.1.6 Caracterização por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de 1H .

Os dados espectroscópicos de RMN foram registados num espectrômetro Varian Inova 500 MHz (Varian, Palo Alto, CA, EUA). Os deslocamentos químicos são referidos em partes por milhão (δ) usando o sinal residual do tetrametilsilano (TMS), CD_3OD sinais (δ_H 3.34) como padrões internos para RMN de 1H e as constantes de acoplamento (J) são relatados em Hz.

4.2 Avaliação do potencial anticancerígeno de brachydina F

4.2.1 Linhagens para os testes da avaliação anticancerígena

As linhagens tumorais humanas comerciais foram adquiridas do American Type Culture Collection – ATCC (U251 - glioblastoma, MCF-7 - mama, 786-0 – rim, NCI-H460 - pulmão e PC-3 – próstata) e a não tumoral (HaCat – queratinócito). Os testes foram realizados em parceria com a Profa. Dra. Giovanna Barbarini Longato do Laboratório de Pesquisa em Biologia Celular e Molecular de Tumores e Compostos Bioativos – Universidade São Francisco – Bragança Paulista/ SP.

4.2.2 Congelamento e descongelamento de células

As células foram cultivadas em frascos de 75 cm² (Kasvi) e o volume final de suspensão celular foi congelado em criotubos (Kasvi) mantidos no nitrogênio de 1x10⁶ cels/mL. O descongelamento das células foi realizado sempre que houve a necessidade de renovação ou obtenção de células em passagem adequada para os experimentos. Para tanto, os criotubos contendo as células foram descongelados à temperatura ambiente, seu conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL (Kasvi) e o volume deste completado para 10 mL com meio de cultura RPMI-1640 (Lonza) contendo 5% de soro fetal bovino (FBS (Nutricel)) e 1% penicilina-estreptomicina (PS (Nutricell)), para lavagem do DMSO (Fisher Scientific) utilizado no congelamento. A suspensão foi então transferida para frascos de manutenção de 25 cm² (Corning) e incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

4.3 Ensaios *in vitro*

4.3.1 Avaliação de atividade antiproliferativa

Para este ensaio, foi utilizado o método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5- Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT (Sigma)) descrito por MOSMANN (1983) que consiste em avaliar indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. A suspensão celular foi preparada em meio RPMI-1640 contendo 5% de FBS e 1% de PS e ajustada em densidade de inoculação de 5000 células/poço. Foram inoculados 100 µL de suspensão celular em placas de 96 compartimentos, incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Foi também preparada uma placa controle (placa T0), que continha todas as linhagens celulares utilizadas no experimento. Após 24 horas, a amostra foi adicionada nas concentrações de 1,6; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, (100 µL/compartimento) em triplicata e, a seguir, incubadas por 48 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico

doxorubicina (Eurofarma), nas concentrações de 0,16; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5 e 10 µg/mL (100 µL/compartimento), em triplicata. As células inoculadas na placa controle T0 foram coradas com MTT para determinação da quantidade de células presentes no momento de adição das amostras, sendo este o valor basal 0. Após 48 horas de tratamento, as células tratadas foram então coradas com MTT, sendo então descontado o valor basal 0.

Os dados de absorvância foram analisados e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra. Através do software Origin® (OriginLab), foi feita a regressão linear das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento e foram calculados os valores de GI₅₀ (50% de inibição do crescimento), que refere-se à concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento celular (utilizado para amostras citostáticas). Esse parâmetro é utilizado para comparar a potência da amostra e evidenciar a seletividade da mesma. Por meio deste ensaio foi determinada a linhagem celular PC-3 (próstata) para continuação dos estudos de atividade anticâncer.

4.3.2 Ensaio de migração celular (cicatrização de feridas)

O ensaio de cicatrização de feridas é amplamente utilizado para o estudo das características da migração celular, assim como para a validação de moléculas, que podem interferir no processo migratório. Para sua execução as células da linhagem PC-3 foram semeadas em placas de 6 compartimentos (COSTAR®) na densidade entre 5×10^5 e 1×10^6 e, ao atingirem 100% de confluência (cerca de 24 horas), foram feitas duas ranhuras em paralelo dentro de cada poço. A seguir, quatro regiões selecionadas foram fotografadas em um microscópio contendo uma câmera acoplada e as amostras foram adicionadas. Novas imagens, sempre das mesmas regiões, foram adquiridas ao longo de 24 e 48 horas após tratamento com DMSO (1%) e brachydina F (em concentração GI₅₀). Além disso, a distância entre as duas margens das ranhuras foram medidas. Os resultados estão sendo expressos como a média das porcentagens de fechamento desta ranhura com auxílio do Image J, utilizando a fórmula: $(A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}) / (A_{\text{inicial}}) \times 100 = \% \text{ de cicatrização da ferida}$, sendo A, a medida da área entre as bordas (YUE et. al., 2010).

4.3.3 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)

Para avaliar a capacidade dos compostos em inibir a replicação da linhagem PC-3, foi realizado o ensaio de formação de colônia, conforme descrito por RAFEHI et., al. (2011). Para isto, 5000 células da linhagem PC-3 foram semeadas em meio ágar em placas de 6 compartimentos, de forma a impedir a aderência destas células ao poço. A cada três dias foram realizados o tratamento com DMSO (1%) e brachydina F (em concentração GI_{50}), diluídas em meio de cultura sem soro. Após 21 dias em cultura, as colônias foram fixadas com formaldeído 0,005% (Êxodo Científica) e coradas com cristal violeta (Nuclear). Os poços foram fotografados e as imagens foram analisadas no software Image J, para quantificação das colônias.

4.3.4 Quantificação de células em estágios de apoptose

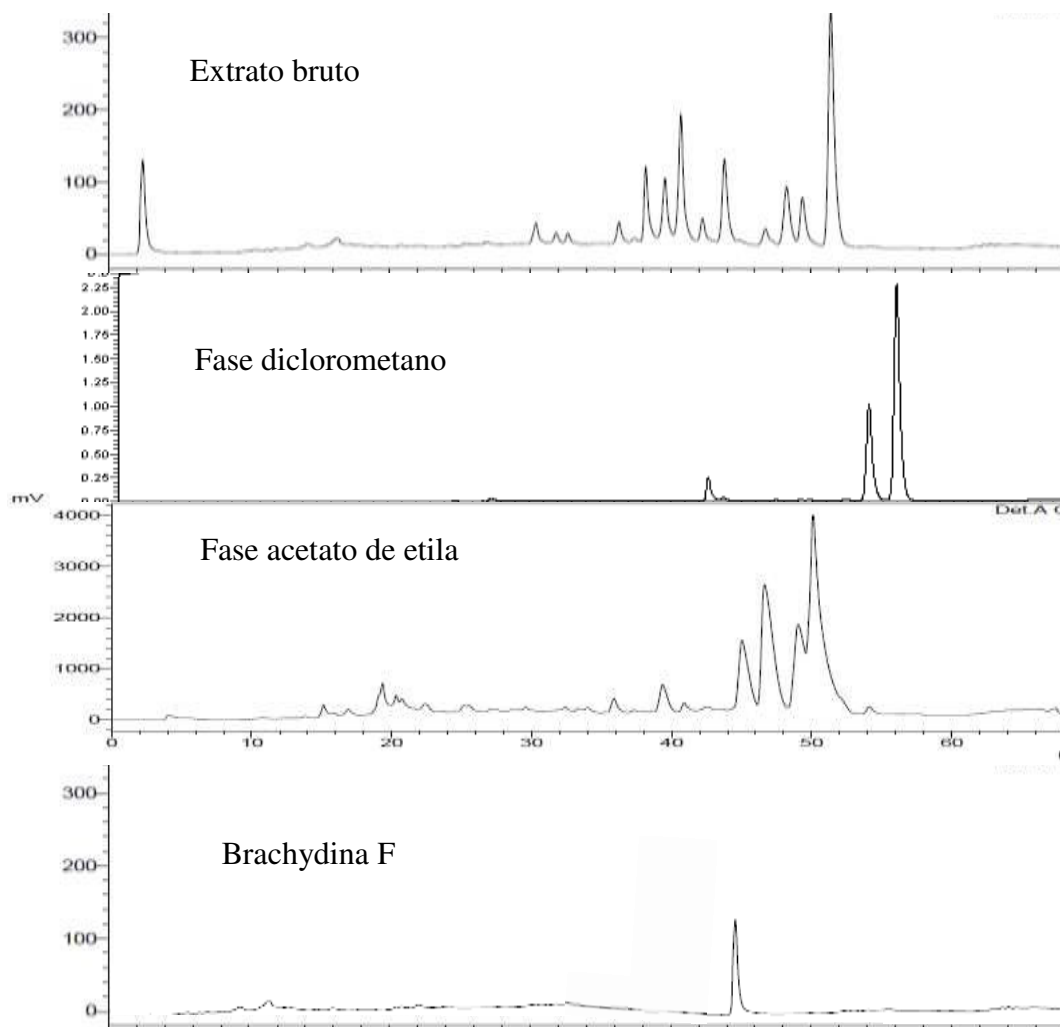
Este teste baseia-se na marcação dupla por anexina V e 7-amino-actinomicina D (7-AAD). A anexina V é uma proteína ligante de fosfolípido com elevada afinidade por fosfatidilserina que se localiza na face interna da membrana plasmática de células viáveis. Na fase inicial do processo apoptótico, as moléculas de fosfatidilserina são translocadas para a face externa e ficam disponíveis para a ligação com anexina V, marcando, portanto as células em apoptose. O 7-AAD liga-se ao DNA da célula e atua como um indicador de integridade estrutural de membrana já que não é capaz de marcar células viáveis e em apoptose inicial. As células da linhagem PC-3 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação entre 1×10^5 e 1×10^6 cel/mL em meio RPMI + 5% de SFB e 1% de PS, mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido. Após 24 horas do tratamento com DMSO e brachydina F (em concentração GI_{50}), foram transferidos 100 μ L de amostra a uma placa de 96 compartimentos com fundo em 'U' (round bottom) e adicionados 100 μ L de Guava Nexin Reagent (Merck/Millipore), durante 20 minutos no escuro e então a placa foi analisada em citômetro de fluxo GuavaEasyCyte 5HT Benchtop Flow Cytometer, Millipore®, Billerica, MA, EUA.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação da substância isolada da fase acetato do extrato EtOH 70% das raízes de *Fridericia platyphylla*

Para a obtenção das informações sobre a composição química da fase acetato e melhor identificação dos constituintes da *Fridericia platyphylla*, uma análise por CLAE-UV/Vis foi realizada. O perfil cromatográfico (Figura 4) apresenta a substância brachydina F, cujos espectros no UV corresponde a um flavonoide dimérico incomum.

Figura 4 - Cromatograma de separação por CLAE-UV/Vis dos constituintes químicos presentes no extrato EtOH 70% das raízes, fase DCM, fase acetato e a fração contendo a brachydina F isolada, de *F. platyphylla*.

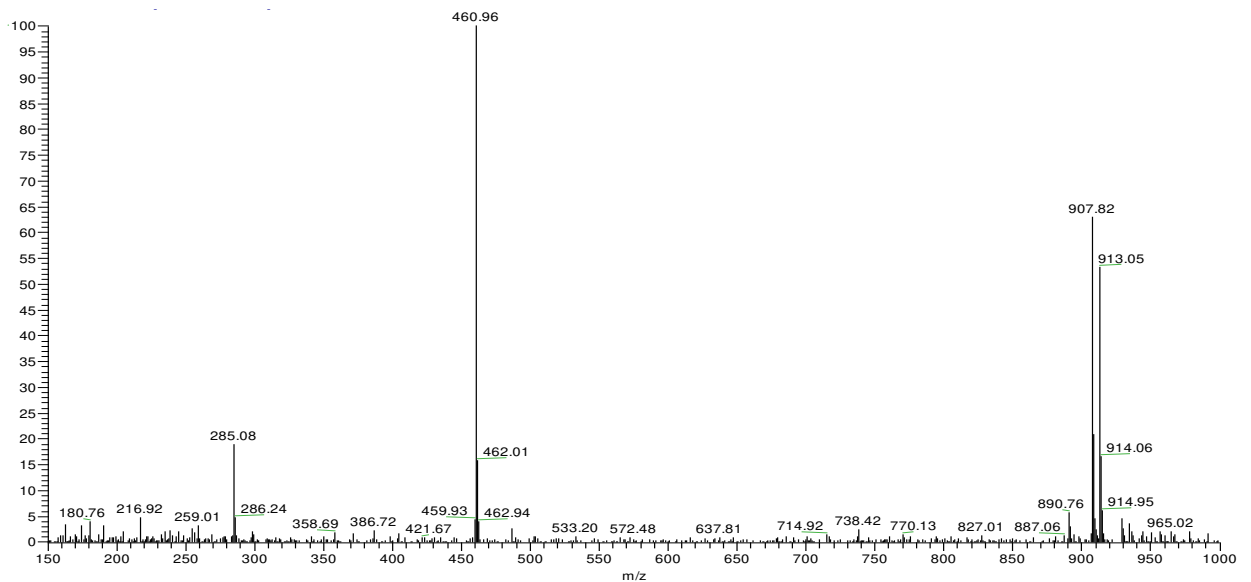


Fonte: Autor (2019)

De acordo com o perfil cromatográfico da fração contendo brachydina F, pode-se inferir que a substância foi isolada. O espectro na região do ultravioleta revelou a presença de uma substância fenólica característico dos flavonoides dimericos (Rocha et al.,2014).

Os espectros de massa de baixa e alta resolução (figura 5 e 6 respectivamente) revelaram um íon molecular $[M+H]^+$ de razão massa carga igual a 913,05 e $[M-H]^-$ de 889,2586 Da, respectivamente. Esses dados estão de acordo com a fórmula molecular $C_{45}H_{45}O_{19}$, confirmando a estrutura de brachydina F, cujo mecanismo de fragmentação está representado na figura 6.

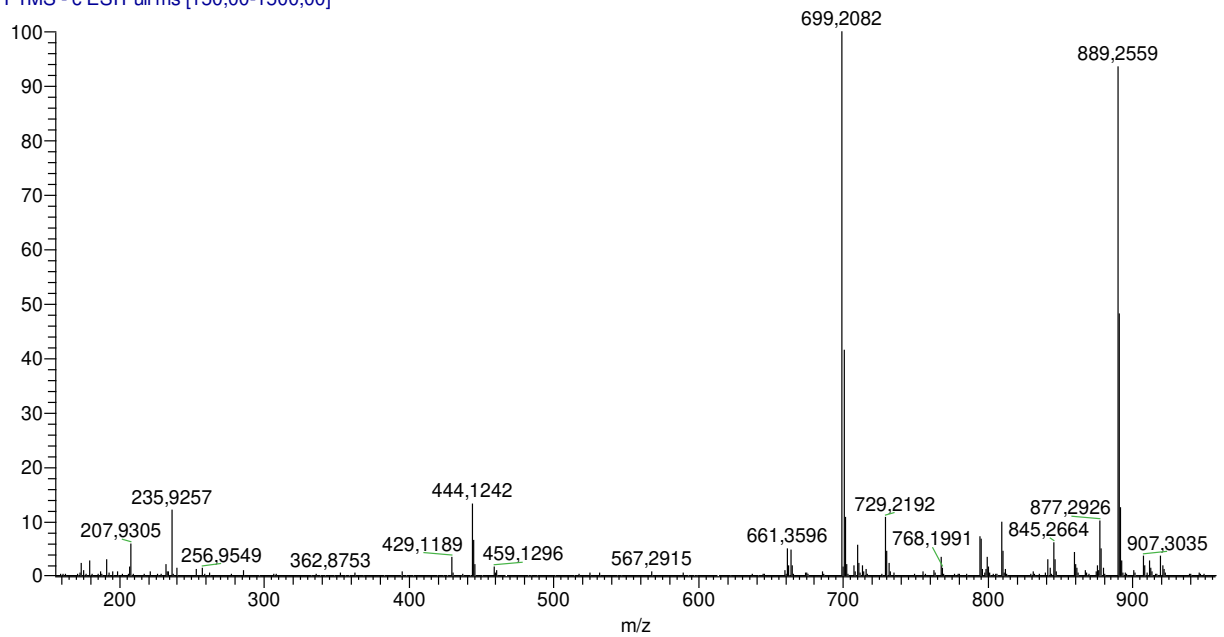
Figura 5- Espectro de massa de baixa resolução no modo positivo da brachydina F $[(M+H+ Na)^+; 913.05]$.



Fonte: Autor (2019)

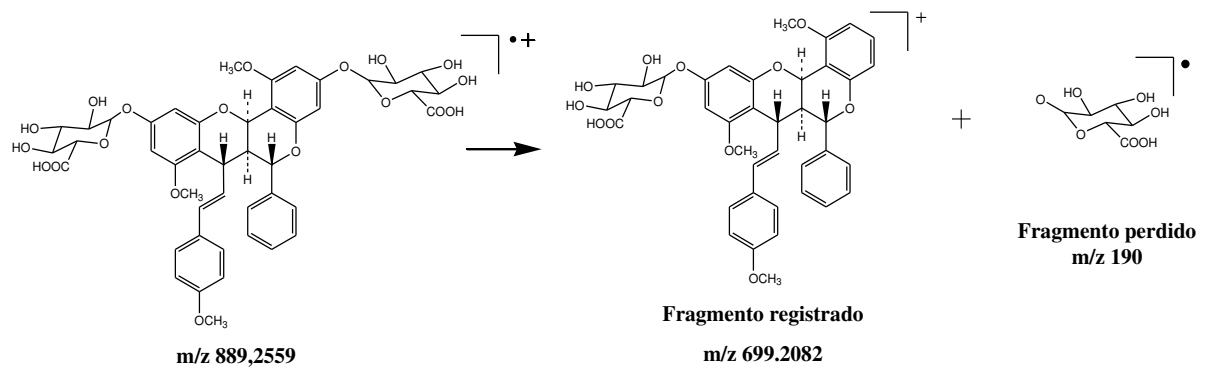
Figura 6 - Espectro de massa de alta resolução no modo negativo da brachydina F [(M-H)⁻ : 889.2559].

140922_PMA_CDR_Rab2014_profile_neg #3122-3190 RT: 13,72-14,02 AV: 69 NL: 2,23E7
T: FTMS - c ESI Full ms [150,00-1500,00]



Fonte: Autor (2019)

Figura 7- Proposta de fragmentação da brachydina F no modo negativo.



Fonte: Autor (2019)

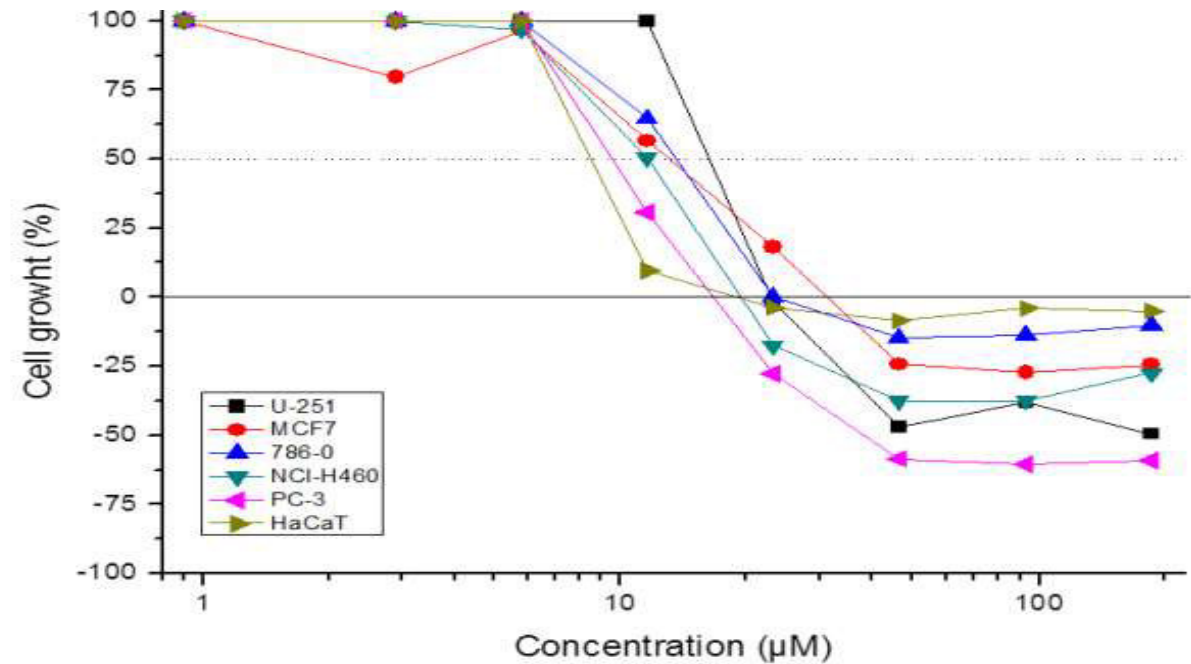
Para confirmar a estrutura o espectro de RMN de ¹H (tabela 1) da substância revelou dados espectrais semelhantes àqueles encontrados para brachydina B publicados por Rocha et al 2014, com exceção de sinais a mais correspondentes aos prótons anoméricos a δH 4,94 (1H, d, J = 6,0 Hz, 3-GlcA-H-1') e 4,98 (1H, d, J = 7,0 Hz, 10-GlcA-H-1). Com base nesses resultados, a substância foi identificada como um flavonoide dimérico diglucuronato (brachydina F), corroborando com os dados propostos por espectrometria de massas e aqueles publicados por Rocha et al, 2017.

Tabela 1- Resultado da estrutura brachydina F no espectro de RMN ¹H.

Posição	brachydina B δ_H (J em Hz)	brachydina F δ_H (J em Hz)
2	6.08 <i>d</i> (2.1)	6.40 <i>d</i> (2.1)
3	-	-
4	5.94 <i>d</i> (2.1)	6.26 <i>d</i> (2.1)
6	4.77 <i>d</i> (11.3)	4.77 <i>d</i> (11.3)
6 ^a	2.19 <i>dt</i> (11.3, 1.9)	2.26 <i>dd</i> (11.3, 2.4)
7	3.17 <i>d</i> (5.6)	3.23 <i>d</i> (5.5)
9	6.05 <i>d</i> (2.1)	6.36 <i>d</i> (2.1)
11	5.98 <i>d</i> (2.1)	6.29 <i>d</i> (2.1)
12 ^a	5.27 <i>d</i> (2.3)	5.32 <i>d</i> (2.4)
2', 6'	7.23 <i>d</i> (7.0)	7.24 <i>m</i>
3', 5'	7.38 <i>m</i>	7.39 <i>m</i>
4'	7.38 <i>m</i>	7.39 <i>m</i>
A	5.99 <i>dd</i> (15.8, 5.6)	6.02 <i>dd</i> (15.8, 5.5)
B	5.83 <i>dd</i> (15.8, 1.6)	5.83 <i>d</i> (15.8)
2'', 6''	7.11 <i>d</i> (8.8)	7.15 <i>d</i> (8.8)
3'', 5''	6.75 <i>d</i> (8.8)	6.77 <i>d</i> (8.8)
OMe-1	3.79 <i>s</i>	3.84 <i>s</i>
OMe-8	3.62 <i>s</i>	3.66 <i>s</i>
OMe-4''	3.73 <i>s</i>	3.74 <i>s</i>
3-GlcA-H-1'	-	4.94 <i>d</i> (6.0)
2', 3'	-	3.53 <i>m</i>
4'	-	3.59 <i>m</i>
5'	-	3.89 <i>d</i> (9.5)
10-GlcA-H-1'	-	4.98 <i>d</i> (7.0)
2', 3'	-	3.52 <i>m</i>
4'	-	3.62 <i>m</i>
5'	-	3.95 <i>d</i> (9.6)

Tabela 2- Linhagens células utilizada para ensaio *in vitro*.

SIGLA	TIPO HISTOLÓGICO
U251	Glioblastoma
MCF7	Adenocarcinoma de mama
786-0	Adenocarcinoma de rim
NCI-H460	Carcinoma de pulmão - tipo não pequenas células
PC-3	Adenocarcinoma de próstata
HACAT	Queratinócito (não tumoral)

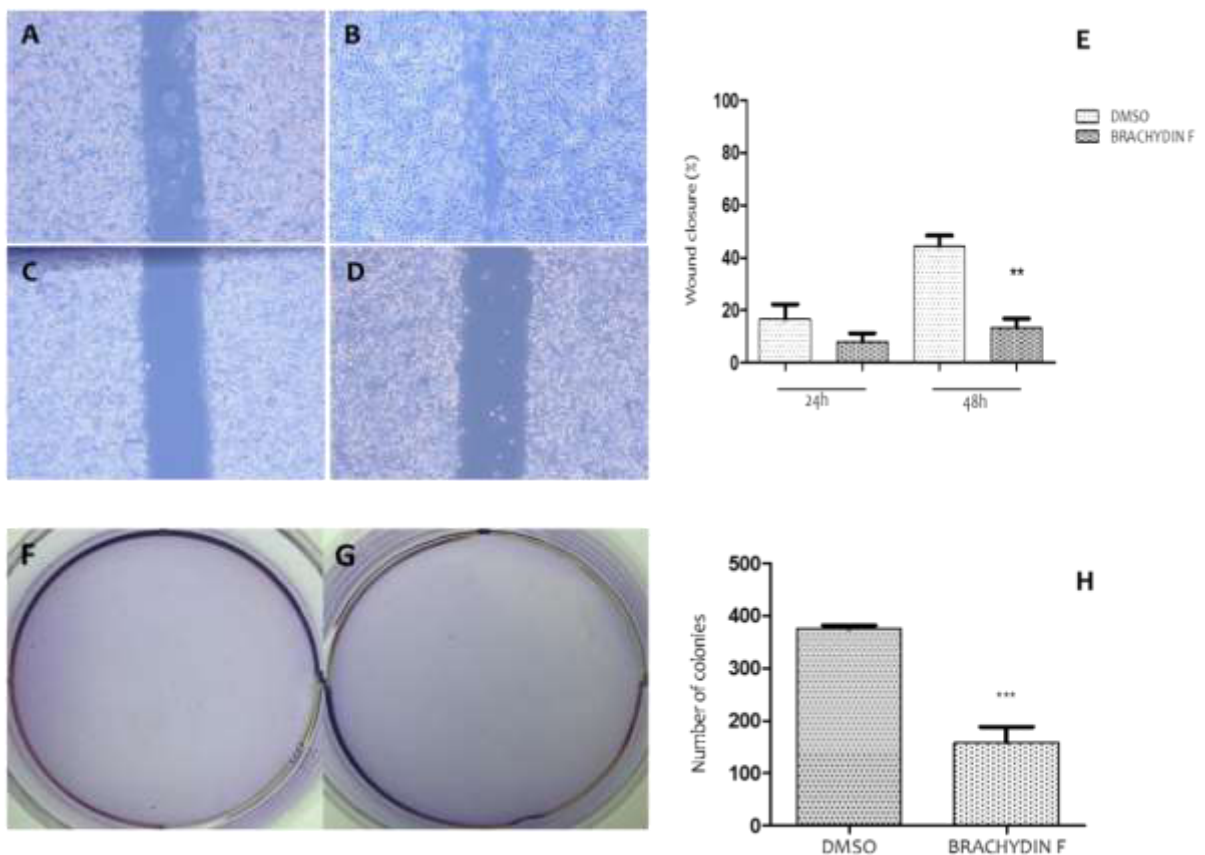
Figura 9- Atividade antiproliferativa da brachydina F para o ensaio realizado em cultura de célula tumoral humana, relacionando a porcentagem de crescimento versus concentração, após 48 horas de incubação.**Tabela 3-** Resultado da concentração mínima de brachydina F necessária para inibir 50% do crescimento celular (GI_{50}).

	U251	MCF7	786-0	NCI-H460	PC-3	HACAT
Brachydina F	14,9±3,3	12,8±1,8	12,6±1,3	10,4±1,6	10,7± 0,3	8,7± 1,4
Cloridrato de Doxorrubicina	9,1± 3,1	1,2± 0,1	0,6± 0,0	2,8± 0,1	6,6± 1,1	2,3± 1,8

5.2.2 Brachydina F previne a migração e invasão celular na linhagem celular PC-3.

Como podemos observar na figura 10A-9D há uma diferença significativa entre os tratamentos. A brachydina F (figura 10 C e 10 D) preveniu a migração celular mantendo a ranhura, enquanto as células tratadas com DMSO (figura 10A e 10B), repovoando o local. Apenas 13,2% da ranhura foi fechada após 48 horas de exposição a célula PC-3 com a substância brachydina F. O controle de DMSO induziu fechamento de $70,3 \pm 8,4\%$ no tempo avaliado (figura 10E). Os dados do ensaio de formação de colônia mostraram que a brachydina F (figura 10G) foi capaz de reduzir o número de colônias de células PC-3 em mais de 77% quando comparado ao controle DMSO (figura 10F). Na Figura 10H, afirma-se claramente que o número de colônias formadas após o tratamento com o controle de DMSO foi maior do que o número de colônias formadas após tratamento com brachydina F.

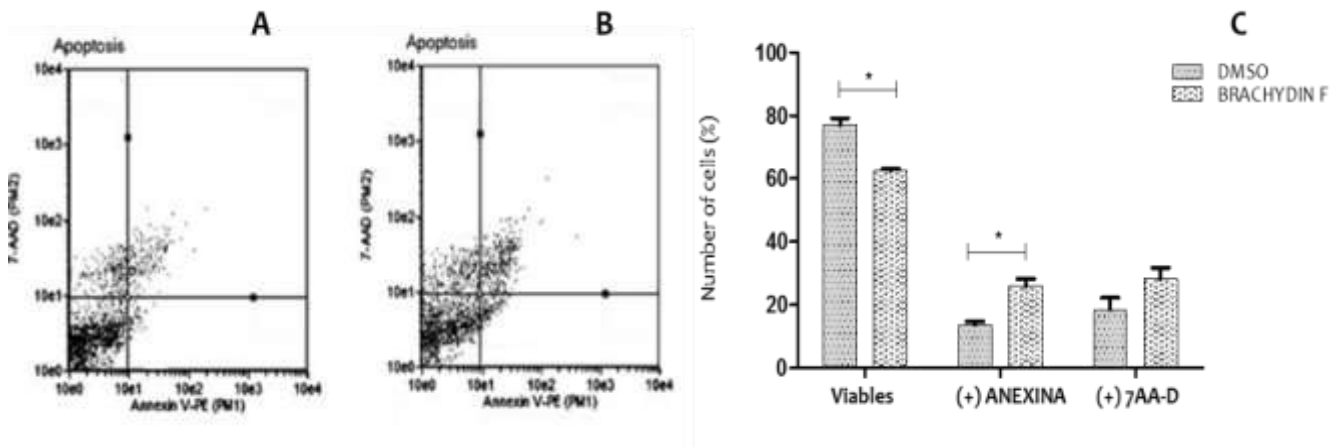
Figura 10: A-D - Fotomicrografias de células PC-3 às 0h (A e C) e após 48h de tratamento com DMSO (B) e 11 μ M de brachydina F (D). E - Porcentagem de fechamento da ranhura na linhagem PC-3 ao longo do período de tratamento (24h e 48h) com DMSO e 11 μ M de brachydin F. ** p <0,01 (ANOVA, teste de Tukey). F-G - Fotografias de colônias de PC-3 tratadas com DMSO (F) e 11 μ M brachydina F (G) após 21 dias. H - Número de colônias de PC-3 formadas após 21 dias de tratamento com DMSO e 11 μ M brachydina F *** p <0,001 (teste T).



5.2.3 Brachydina F induziu morte celular na linhagem celular PC-3

Os dados da anexina V-PE / 7AAD (figura 11) revelam que a brachydina F levou a um aumento de células marcadas com anexina (de $13,6\% \pm 1,2$ a $25,9\% \pm 2,4\%$) com consequente declínio em células viáveis (de $75,1 \pm 0,1$ a $62,5\% \pm 0,6$). Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação da substância brachydina F deve estar envolvido com a morte celular por apoptose na linhagem de próstata PC-3.

Figura 11: Gráficos de dados de A-B - Anexina V-PE / 7AAD obtidos para tratamento com DMSO (A) e 11 μ M de brachydin F (B). C - Aumento de células marcadas com anexina com consequente declínio de células viáveis promovidas pela substância brachydin F * $p < 0,05$ (ANOVA, Bonferroni).



Os produtos naturais de plantas representam uma fonte muito rica para a descoberta e desenvolvimento de drogas anticancerígenas (Bishayee e Sethi, 2016). As plantas estão disponíveis em abundância e oferecem as grandes possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico. A literatura mostra que os flavonóides são capazes de inibir a proliferação, migração e invasão de células de diferentes tumores.

Dados sobre a atividade antiproliferativa de flavonóides biflavonóides têm sido recentemente relatados na literatura, no entanto ainda é muito limitado dado sobre essa classe química. Amin et al., (2018) mostraram que os biflavonoides isolados do bulbo da espécie *A. Ascalonicum* tem atividade anticancerígena e antibacteriana, uma vez que inibe proliferação de uma forma de dose dependente.

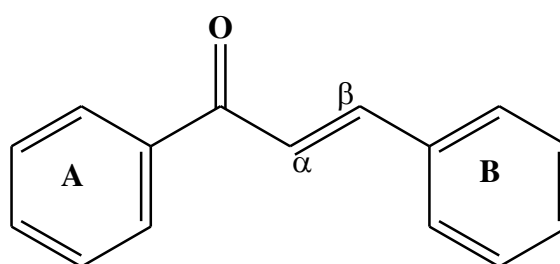
O flavonóide dimérico brachydina F estudado pelo nosso grupo mostrou potente atividade antiproliferativa para a linhagem tumoral de próstata. Considerando a escassez de opções de tratamento para o câncer de próstata, essa linhagem reforça a necessidade de continuar os

estudos acerca do seu mecanismo de ação, tendo em vista a relevante propriedade anticancerígena.

Os resultados obtidos mostraram que a substância brachydina F inibe a migração e replicação de células tumorais da próstata, induzindo-as ao processo de morte celular apoptótica. Este é o primeiro trabalho que relata as propriedades antiproliferativas do flavonóide dimérico brachydina F, isolado pela primeira vez em planta brasileira por nosso grupo de pesquisa. Em razão da escassez de relatos de atividade biológica envolvendo esse tipo de esqueleto estrutural, foi realizado um levantamento na literatura sobre a classe das chalconas que são precursoras dos flavonóides diméricos encontrados em *Fridericia platyphylla*. Esse levantamento foi realizado na tentativa de compreender o potencial anticancer apresentado por brachydina F.

As chalconas são compostos precursores da via de biossíntese dos flavonóides. O termo chalcona é utilizado para caracterizar uma família de compostos que possuem como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupamento hidroxila, com dois anéis aromáticos, unido a α , β insaturados (figura 12). (LAWRENCE, 2006)

Figura 12: Estrutura básica das chalconas.



Fonte: Autor (2019).

As chalconas têm por característica a pigmentação amarela e ocorrem em todas as partes das plantas, incluindo frutos, flores, folhas, raízes e caules. Dentre os flavonóides, as chalconas têm sido relatadas como compostos atraentes com propriedades quimioprotetoras e antitumorais. Encontram-se na literatura diversas referências da atividade citotóxica de chalconas (Go et al., 2005) em vários tipos de células de tumores sólidos, como de melanoma (Nam et al., 2003; Pati et al., 2005; Navarini et al., 2006), de câncer de cólon (Nam et al., 2003; Bhat et al., 2005; Cabrera et al., 2007; Liu e Go, 2007), de mama (Xia et al., 2000;

Nakamura et al., 2002; Potter e Butler, 2003; Won et al., 2005; Modzelewska et al., 2006; Cabrera et al., 2007; Liu e Go, 2007), de pulmão (Xia et al., 2000; Nakamura et al., 2002; Bhat et al., 2005; Tatsuzaki et al., 2006; Srinivasan et al., 2009), de ovário (Xia et al., 2000; Nakamura et al., 2002; Bhat et al., 2005), de próstata (Bhat et al., 2005), de fígado (Bhat et al., 2005), de estômago (Nakamura et al., 2002), de rim (Cabrera et al., 2007) e do sistema nervoso central (Xia et al., 2000; Bhat et al., 2005). São encontrados também estudos que apontam chalconas como potentes agentes antiangiogênicos, inibindo a formação de novos capilares sanguíneos que irrigam os tumores (Robinson et al., 2005; Mojziz et al., 2008), e como antiproliferativas, por inibição da tubulina (Lawrence e MacGown, 2005; Kim et al., 2006). Outras pesquisas também referenciam a atividade de chalconas como promotoras de apoptose de células tumorais aderidas, por despolarização da membrana mitocondrial (Jung et al., 2006) e por interferência nas vias de sinalização apoptóticas, como ativação de caspases (HENMI, et al., 2009).

Mediante os dados expostos e a insuficiência de relatórios científicos que mencionam a espécie estudada e a fim de propor discussões de relação estrutura-atividade da brachydina F em células tumorais, tomamos como base inicial a presença de chalconas, uma vez que a brachydina F possui esse tipo de estrutura no seu esqueleto base, e no efeito do substituinte de um de seus anéis aromáticos, pois estudos relatam baixos valores de IC₅₀ de chalconas e biflavonoides quando estes apresentam em sua estrutura grupos OH com substituintes, logo a atividade antiproliferativa da brachydina F pode está relacionada com a presença dos grupos hidroxilas presentes dos ácidos glucurônicos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O flavonoide dimérico brachydina F, isolado das raízes de *Fridericia platyphylla* demonstrou atividade antiproliferativa, pró-apoptótica, inibição da migração e replicação celular na linhagem tumoral prostática humana. Os resultados aqui apresentados para a substância, são inéditos e reforçam a necessidade de investigações adicionais sobre o seu mecanismo de ação, tendo em vista a relevante propriedade antiproliferativa evidenciada.

Essa pesquisa é de grande relevância para o campo científico nacional, uma vez que representa um incentivo para a exploração e valorização do Cerrado brasileiro, de forma que o produto intelectual aqui gerado poderá proporcionar um produto biotecnológico.

REFERÊNCIAS

- ALCERITO, T. et al. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda* : flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, 30: 7, 677-683, 2002.
- AMIN, M.. et al. Antibacterial and anticancer activity of a bioflavonoid fractionated from *Allium Ascalonicum*. 2018.
- BARBOSA, W.L.R. et al. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: Phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18.2008.
- BHAT, B. A. et al. N. Synthesis and biological evaluation of chalcones and their derived pyrazoles as potential cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15, 3177-3180, 2005.
- BISHAYEE, A., SETHI, G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. **Semin. Cancer Biol.** 40_41, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.08.006>. 2016.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 11 nov 2018.
- BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010. 416 p.
- CRAGG, G. M; NEWMAN, D. J. 2005. **Plantas como fonte de agentes anti-cancro**. *J Ethnopharmacol* 100: 72-79.
- CUNHA, N. L.; UCHÔA, C. J. M.; CINTRA, L. S. In Vitro Schistosomicidal Activity of Some Brazilian Cerrado Species and Their Isolated Compounds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.
- ESPINDOLA, L. S. et. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *Planta Medica*. 70: 1093– 1095. 2004.
- FANG, S.C. et al. Anticancer effects of flavonoid derivatives isolated from *Millettia reticulata* Benth in SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(2): 814-820, 2010.
- FITZMAURICE, C. et al. The Global Burden of Cancer. **JAMA Oncol**, 1(4):505 27, 2013.
- GARCIA, F. Estudo fitoquímico da fração acetato do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau – Bignoniaceae e atividades antioxidante e inibitória da enzima mieloperoxidase das substâncias isoladas. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Química na Área de Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- GARCIA, F. Estudo fitoquímico da fração AcOEt do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau – Bignoniaceae e atividades antioxidante e inibitória da enzima mieloperoxidase das substâncias isoladas. Dissertação (Mestrado em Química na Área de Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

HENMI, K. et al. Methoxy- and fluorochalcone derivatives arrest cell cycle progression and induce apoptosis in human melanoma cell A375. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 32(6), 1109-1113, 2009.

HUSSAIN, M. et al. Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. **N Engl J Med**, 378: 2465-2474, 2018.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 06/03/2019.

JUNG, J. I. et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by despolarizing mitochondrial.

KIM, D. Y. et al. Design and biological evaluation of novel tubulin inhibitors as antimitotic.

LAWRENCE, N.J.; PATTERSON, R.P.; OOI, L.L.; DARREN, C.; DUCKI, S. Effects of α -substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, 2006.

LIÃO, L. M.; SILVA, G. A.; MONTEIRO, M. R.; ALBURQUERQUE, S. Trypanocidal Activity of Quinonemethide Triterpenoids from *Cheiloclinium cognatum* (Hippocrateaceae). *Z. Naturforsch.* 63 c, 207-210, 2008.

LIMA, C.S.A. et al. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n.1, 2003.

LIMA, J. Q. et al. Atividade anticancer in vitro em células tumorais humanas do composto 6,7- dihidroxi- 5',4'- dimetoxiflavilium(carajurina), isolado a partir da espécie *Arrabidaea chica*. 2010.

LIU, X.; GO, M. L. Antiproliferative activity of chalcones with basic functionalities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 7021-7034, 2007.
membranes in prostate cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 17, 689-696, 2006.

MESQUITA, M. L. **Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica**. Tese-Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, 2009.

MODZELEWSKA, A. et al. R. Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14, 3491-3495, 2006.

MOJZIZ, J. et al. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. **Pharmacological Research**, 57, 259-265, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. 1983.

NAKAMURA, C. et al. Synthesis and biological activities of fluorinated chalcone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 10, 699-706, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2016.

NOGUEIRA, C. H. Avaliação da mutagenicidade e da estrogenicidade dos extratos etanólicos padronizados, frações e substâncias isoladas de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau. 2015.

PAULETTI, P. M. et al. **Constituintes químicos de Arrabidaea samyoides (Bignoniaceae): uma contribuição para a pesquisa de bioprospecção da flora paulista.** 2004. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Araraquara. Instituto de Química.

PETRYLAK, D.P.; TANGEN, C.M.; HUSSAIN, M.H. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. **N Engl J Med**, 351:1513–20, 2004.

POTTER, G. A.; BUTLER, P. C. 3,4-methylenedioxy-substituted chalcones as therapeutic agents. UK *WO 03/028713*, 2003.

RAFEHI, H. et al. Clonogenic Assay: adherent cells. **J Vist Exp**, 13(49), 2011.

RAJESH, E; SANKARI, L.S.; MALATHI, L; KRUPAA, J.R. Naturally occurring products in cancer therapy. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, 7(1): 181-183, 2015.

REIS L.O.; NGUYEN P.L. Prostate Cancer – Local Treatment after Radiorecurrence: Surgery - Back to the future?. **Int. braz j urol.** 44(3), 2018.

ROBINSON, T. P. et al. Synthesis and biological evaluation of aromatic enones related to curcumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 13, 4007-4013, 2005.

ROCHA, C, Q. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 396-401, 2011.

ROCHA, C. Q. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau roots. **Journal of Ethnopharmacology**, 2., 2014.

ROCHA, C. Q. et al. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. **Phytochemistry**, v. 135, p. 93-105, 2016.

ROCHA, C. Q. et al. Oleanane-type triterpenoid: an anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Impresso), v. 25, p. 228-232, 2015.

RODRIGUES, A. M. S.; de PAULA, J. E.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of *Cybistax antisiphilitica* against larvae. **Fitoterapia**. 76: 755–757. 2005.

SÁ, S. et al. Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 28: 3, 303-311, 2018.

SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**. 11: 1668–1679. 2011.

TIUMAN, T.S.; SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**. 15: e525–e532. 2011.

XIA, Y.et al. Antitumor agents. Part 202: novel 2'-amino chalcones: design, synthesis and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 10(8), 699-701, 2000.

XIAO, J; MUZASHVILID, T.S.; GEORGIEVE, M.I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. **Biotechnology Advances**, 32(6): 1145-1156, 2014.

Yue, P.Y.K.et al. A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. **J. Biomol. Screen**. 15, 427–433. <https://doi.org/10.1177/1087057110361772>. 2010