



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E
ANTI-INVASIVA DA BIFLORINA EM LINHAGENS DE
CÂNCER GÁSTRICO DO TIPO INTESTINAL**

ELIZANGELA RODRIGUES DA SILVA MOTA

BELÉM/PA

2019

ELIZANGELA RODRIGUES DA SILVA MOTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E
ANTI-INVASIVA DA BIFLORINA EM LINHAGENS DE
CÂNCER GÁSTRICO DO TIPO INTESTINAL**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de Título de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Danielle Queiroz Calcagno

BELÉM/PA

2019

Elizangela Rodrigues da Silva Mota

Avaliação da atividade citotóxica e anti-invasiva da biflorina em linhagens de câncer gástrico do tipo intestinal.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Danielle Queiroz Calcagno – Orientadora
Núcleo de Pesquisas em Oncologia/UFGA

Prof^a. Dr^a. Karen Renata Matos Oliveira – Membro Interno
Instituto de Ciências Biológicas/UFGA

Prof^o. Dr^o. Rommel Mario Rodriguez Burbano – Membro Externo
Instituto de Ciências Biológicas/UFGA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R696a Rodrigues da Silva Mota, Elizangela
Avaliação da atividade citotóxica e anti-invasiva da biflorina em linhagens de câncer gástrico do tipo intestinal / Elizangela Rodrigues da Silva Mota. — 2019.
61 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Danielle Queiroz Calcagno Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Câncer gástrico. 2. Citotoxicidade. 3. Invasão celular.
4. Capraria biflora. 5. Naftoquinonas. I. Título.

CDD 616.994

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mãe Auda e à
minha filha Cecília, razões do meu viver.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal do Pará pela genuína e irrefutável oportunidade de qualificação profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, em especial aos professores que contribuíram positivamente para a minha formação.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Danielle Calcagno pelos ensinamentos e incentivo que foram essenciais para a concretização deste estudo. Sobretudo, pela paciência, compreensão e apoio nas minhas versões gestante e mãe discente. Minha eterna gratidão!

Aos meus amigos de laboratório que viabilizaram a realização dos ensaios, principalmente, Carlos dos Santos, Jéssica Silva, Ronald Mourão, Stefanie Sousa, Suzy Pacheco e Thayanne Pinheiro. Sem vocês eu não teria conseguido!

Ao Prof. Dr^o. Rosivaldo Borges pela solicitude e excelentes contribuições com as análises *in silico*.

À Prof^a. Dr^a. Marne Vasconcellos por ter cedido gentilmente a biflorina.

Aos membros da banca examinadora, pela revisão do texto e sugestões pertinentes.

Aos meus queridos pais e irmãos, pelo amor incondicional, por terem acreditado em mim, vibrado a cada conquista e dado forças para tornar este sonho real.

Ao meu melhor amigo e esposo Élisson Mota, por aceitar as minhas escolhas, compreender a minha ausência, compartilhar lágrimas e sorrisos.

À minha amada filha Cecília Mota, que me fez ver o mundo de uma forma diferente e acreditar que tudo é possível. Quem deu um sentido especial à minha existência e tem me proporcionado alegrias imensuráveis.

Às minhas queridas nutricionistas e companheiras de profissão, Adriane Pureza, Elenilma Barros, Eliane Souza, Érika Vasconcellos e Laís Pinon, pela disponibilidade dispensada, quer seja nas trocas de horários de trabalho ou simplesmente emprestando o ombro amigo.

Enfim, agradeço a todos que fazem parte da minha vida e que são coadjuvantes desta história.

RESUMO

Os produtos naturais são fontes de metabólitos secundários com ampla aplicabilidade farmacológica, incluindo anticâncer. A biflorina, uma orto-naftoquinona prenilada que foi isolada das raízes da planta *Capraria biflora* L., tem se destacado como potente protótipo a fármaco antitumoral. Entretanto, apesar do potencial promissor, sua capacidade antineoplásica é incipientemente aplicada para o câncer gástrico, um dos tipos de câncer mais incidentes, agressivos e letais, nos âmbitos nacional e global. Neste contexto, este trabalho objetivou analisar a relação estrutura-toxicidade da biflorina pelo mecanismo redox *in silico*, bem como o potencial citotóxico e anti-invasivo *in vitro*, utilizando como modelo linhagens de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, metastática (AGP01) e isolada do tumor primário (ACP03). As análises *in silico* demonstraram que a biflorina possui característica diferenciada de reatividade, podendo atuar como doadora ou aceptora de elétrons em reações nucleofílicas e eletrofílicas, respectivamente. Além disso, quando comparada a outras naftoquinonas naturais como a β -lapachona e ao lapachol, apresentou melhores propriedades redox e condições de reatividade, porém, com menor efeito tóxico devido a sua capacidade de formar intermediários mais estáveis. A simplificação molecular da biflorina também permitiu inferir que o grupo funcional orto-naftoquinona provavelmente é o mais relacionado à toxicidade das naftoquinonas. Adicionalmente, a biflorina apresentou atividade citotóxica em concentrações consideravelmente baixas para ambas as linhagens, contudo, a citotoxicidade foi mais pronunciada para a AGP01 (CI₅₀ 3,1 μ M) quando comparada a ACP03 (CI₅₀ 4,5 μ M) em 48h de tratamento. Em relação à atividade antimetastática, a biflorina reduziu a capacidade de invasão celular somente da linhagem AGP01 ($p < 0,0001$). Os resultados obtidos indicam que a biflorina possui atividade citotóxica para ambas as linhagens de câncer gástrico AGP01 e ACP03, bem como anti-invasiva especificamente para as células metastáticas AGP01. Além disso, foi possível esclarecer a provável citotoxicidade seletiva da biflorina baseada em sua reatividade estrutural.

Palavras-chave: AGP01, ACP03, *Capraria biflora*, naftoquinona, invasão celular, citotoxicidade, reatividade.

ABSTRACT

Natural products are sources of secondary metabolites with wide pharmacological applicability, including anticancer. Biflorin, a prenylated ortho-naphthoquinone that has been isolated from the roots of the *Capraria biflora* L. plant, has stood out as a potent prototype antitumor drug. However, despite promising potential, its antineoplastic capacity is incipiently applied to gastric cancer, one of the most incidente, aggressive and lethal cancers, nationally and globally. In this context, this study aimed to analyze the structure-toxicity relationship of biflorin by the redox in silico mechanism, as well as the in vitro cytotoxic and anti-invasive potential, using as a model strains of intestinal-type gastric adenocarcinoma metastatic (AGP01) and isolated from primary tumor (ACP03). In silico analysis showed that biflorin has a differentiated reactivity characteristic and can act as electron donor or acceptor in nucleophilic and electrophilic reactions, respectively. Moreover, when compared to other natural naphthoquinones such as β -lapachone and lapachol, it presented better redox properties and reactivity conditions, but with less toxic effect due to their ability to form more stable intermediates. The molecular simplification of biflorin also allowed to infer that the ortho-naphthoquinone functional group is probably the most related to naphthoquinones toxicity. Additionally, biflorin showed cytotoxic activity at considerably low concentrations for both strains, however, cytotoxicity was more pronounced for AGP01 (IC_{50} 3.1 μ M) compared to ACP03 (IC_{50} 4.5 μ M) at 48h treatment. Regarding antimetastatic activity, biflorin reduced the cell invasion capacity of the AGP01 strain only ($p < 0.0001$). The results indicate that biflorin has cytotoxic activity for both gastric cancer strains AGP01 and ACP03, as well as anti-invasive specifically for metastatic cells AGP01. In addition, it was possible to clarify the probable selective cytotoxicity of biflorin based on its structural reactivity.

Keywords: AGP01, ACP03, *Capraria biflora*, naphthoquinone, cell invasion, cytotoxicity, reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição de casos novos e mortes para os dez tipos de câncer mais comuns em 2018, para ambos os sexos.....	14
Figura 2 – Características típicas do câncer adquiridas durante a progressão das células normais para as tumorais.....	17
Figura 3 – Principais eventos biológicos celulares envolvidos na cascata de invasão-metástase	18
Figura 4 – Etiologia do câncer gástrico	22
Figura 5 – Alterações moleculares genéticas e epigenéticas no câncer gástrico.....	23
Figura 6 – <i>Capraria biflora</i> L. e a estrutura química da biflorina	26
Figura 7 – Fluxograma dos ensaios.....	35
Figura 8 – Estruturas químicas da biflorina, β -lapachona e lapachol.....	36
Figura 9 – Compostos simplificados da biflorina.....	37
Figura 10 – Linhagens celulares utilizadas para avaliar a atividade anticâncer da biflorina.....	38
Figura 11 – Princípio da técnica do ensaio de viabilidade celular por <i>AlamarBlue</i>	39
Figura 12 – Representação esquemática do ensaio de invasão celular em câmara de <i>Boyden</i>	41
Figura 13 – Estruturas químicas otimizadas da biflorina, β -lapachona e lapachol.....	43
Figura 14 – Mapas de potencial eletrostático molecular (MEPs) da biflorina, β -lapachona e lapachol	44
Figura 15 – HOMO e LUMO para a biflorina, β -lapachona e lapachol	46
Figura 16 – Densidades de <i>spin</i> para as formas cátion e ânion radicais livres para a biflorina, β -lapachona e lapachol.....	47
Figura 17 – Atividade citotóxica da biflorina para as linhagens AGP01 e ACP03 em ambos os tempo de tratamento (48 e 72h).....	50
Figura 18. Capacidade invasiva das linhagens celulares AGP01 e ACP03 após 48h de tratamento com a biflorina, comparadas aos seus controles negativos.....	52
Figura 18. Inibição da invasão celular das linhagens AGP01 e ACP03 em 48h de tratamento com a biflorina.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil e Região Norte, estimados para 2019 por sexo.....	20
Tabela 2 – Atividade anticâncer da biflorina em linhagens celulares de câncer humano.....	27
Tabela 3 – Parâmetros teóricos calculados para a biflorina e lapachonas.....	44
Tabela 5 – Parâmetros teóricos calculados para os derivados simplificados da biflorina.....	48
Tabela 6 – Atividade citotóxica da biflorina nas linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico, APC03 e AGP01.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Afinidade eletrônica
AKT-1	Oncogene viral 1 de timoma homólogo a murino
AR	Receptor de Andrógeno
ATM	Ataxia-telangiectasia-mutado
BCL-2	Célula B de leucemia/linfoma
CaM	Calmodulina
CDK	Ciclina dependente de quinase
CG	Câncer gástrico
CI₅₀	Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular
CoA	Coenzima A
DFT	Teoria do funcional da densidade
DM3	Semi-empírico
DMEM	Meio de cultura Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT	DNA metiltransferases
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADD	Proteína de domínio de morte associado ao Fas
FDA	Proteína de choque térmico
FOXO	<i>Forkhead box</i>
FT	Fator de transcrição
GAP^{L-H}	Diferença entre os orbitais moleculares ocupados de maior e menor energia
GATA	Proteína de ligação GATA
HER	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano
HIF	Fator induzido por hipóxia
HOMO	Orbital molecular ocupado de maior energia
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
HSP	Proteína de choque térmico
IGFBP-3	Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 3

IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energia
MB	Membrana basal
MEC	Matriz extracelular
MELK	Quinase embrionária materna de leucina-zíper
MEPs	Mapas do potencial eletrostático molecular
MGMT	O ⁶ -metil-guanina-DNA-metil-transferase
MM+	Mecânica molecular
MYC	Oncogene de mielocitomatose
ncRNAs	RNAs não codificantes
PBS	Tampão fosfato salino
PI	Potencial de ionização
RAD	ATPase envolvida no reparo de DNA
SBF	Soro bovino fetal
TEM	Transição epitélio mesenquimal
TYMS	Timidilato sintetase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Câncer	16
2.1.1. <i>Considerações gerais</i>	16
2.1.2. <i>Câncer gástrico: epidemiologia, classificação, fatores de risco e terapêutica</i> .	19
2.1.3. <i>Linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico: ACP03 e AGP01</i>	24
2.2. Atividade anticâncer da biflorina (<i>Capraria biflora</i> L.)	25
2.3. Análises <i>in silico</i> dos parâmetros de reatividade de candidatos a fármacos	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Obtenção, extração e isolamento da biflorina	34
4.2. Fluxograma dos ensaios	34
4.3. Análise <i>in silico</i> da relação estrutura-toxicidade da biflorina pelo mecanismo redox	35
4.4. Linhagens celulares.....	38
4.5. Cultivo celular	38
4.6. Ensaio de citotoxicidade por <i>AlamarBlue</i>	39
4.7. Ensaio de invasão celular em câmara de <i>Boyden</i>	40
4.8. Análises estatísticas	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Análise <i>in silico</i> da relação estrutura-toxicidade da biflorina pelo mecanismo redox	43
5.1.1. <i>Análise comparativa entre a biflorina e lapachonas</i>	43
5.1.2. <i>Análise comparativa entre a biflorina e compostos simplificados</i>	48
5.2. Ensaio de citotoxicidade.....	49
5.3. Ensaio de invasão celular.....	52
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial inquestionável em virtude das elevadas taxas de incidência, prevalência e morbimortalidade (SHI *et al.*, 2019). Segundo as estimativas globais do câncer (GLOBOCAN) produzidas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), houve a projeção de ocorrência de 18,1 milhões de casos novos diagnosticados e 9,6 milhões de óbitos em 2018 (Figura 1) (FERLEY *et al.*, 2019; BRAY *et al.*, 2018).

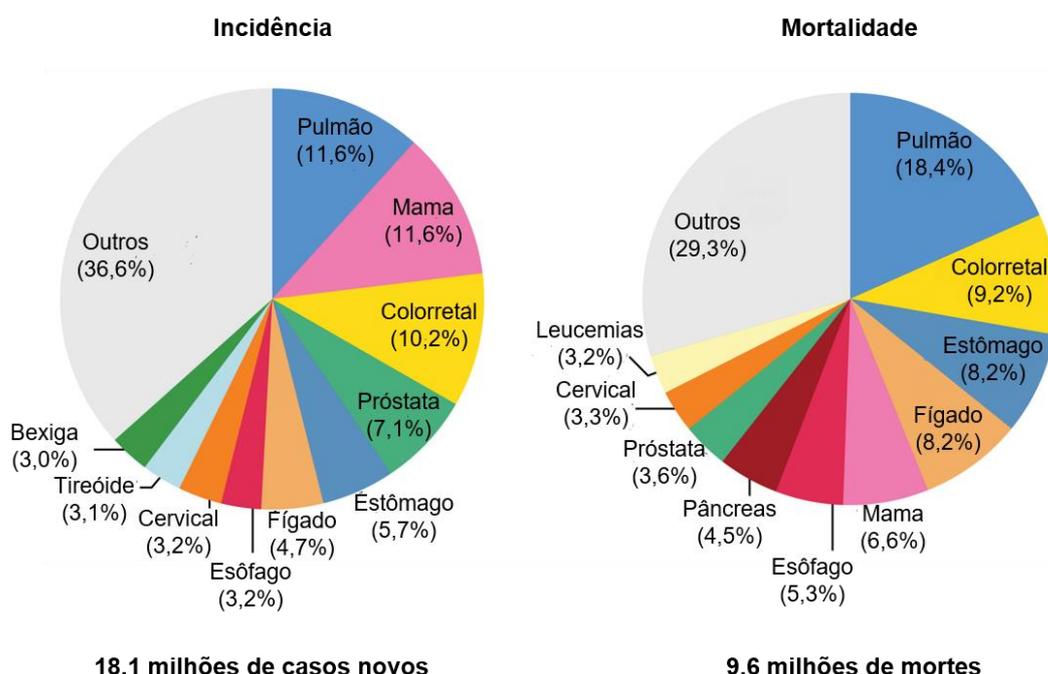


Figura 1. Distribuição de casos novos e mortes para os dez tipos de câncer mais comuns em 2018, para ambos os sexos. O câncer de pele não-melanoma foi incluído na categoria “outros”.

Fonte: Adaptado de Bray *et al.*, 2018.

No cenário atual e global, o câncer gástrico (CG) ocupa a quinta posição entre as neoplasias mais frequentemente diagnosticadas, além de ser responsável pela terceira principal causa de mortes associadas ao câncer, respondendo por 1 a cada 12 óbitos (FERLEY *et al.*, 2019; BRAY *et al.*, 2018; LIU; MELTZER, 2017; KATONA; RUSTGI, 2017). A ausência de sintomatologia específica, associada à dificuldade de efetuar a detecção precoce, favorecem o diagnóstico tardio e acarretam pior prognóstico (MCLEAN; EL-OMAR, 2014).

As metástases são as principais causas de óbitos por CG, além de exercerem significativa influência na resposta terapêutica (BARBOSA *et al.*, 2019). Ao passo que a ressecção cirúrgica associada à terapia adjuvante podem curar tumores primários, a doença metastática tem chances reduzidas em função de suas características sistêmicas, além da agressividade e resistência que as células tumorais circulantes adquirem aos agentes quimioterápicos. Dessa forma, a capacidade de bloquear ou reverter a cascata de invasão-metástase é essencial para subsidiar o tratamento eficaz (VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

Apesar dos avanços nas modalidades terapêuticas, houve poucas melhorias na sobrevida global dos pacientes com CG. Assim, existe a necessidade premente de desenvolver terapias alternativas utilizando fármacos que sejam mais efetivos e menos citotóxicos (WANG *et al.*, 2019; NAGINI, 2012).

Neste contexto, os produtos naturais particularmente de origem vegetal são fontes de metabólitos secundários com ampla aplicabilidade farmacológica, sobretudo anticâncer, com grande potencial a ser explorado. Estes compostos podem inibir a proliferação celular e modular a cascata de invasão-metástase tendo como alvo moléculas e vias de sinalização essenciais ao câncer. Além disso, otimizam a resposta imune, interferem no microambiente tumoral e reduzem a quimioresistência (HUANG *et al.*, 2016).

Com o intuito de identificar possíveis agentes quimioterápicos capazes de atuar como reguladores antiproliferativos e/ou antimetastáticos, diversos metabólitos secundários como as naftoquinonas têm sido amplamente investigados. Estes metabólitos são considerados eficazes, seguros, além de exibirem efeitos mais abrangentes, capazes de modular múltiplos alvos da carcinogênese (SHANKAR *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, a realização sistemática e dinâmica de estudos sobre as naftoquinonas naturais, bem como de seus derivados sintéticos, foi crescente e numerosas investigações científicas que abordam suas propriedades anticâncer estão sendo publicadas (JEZIOREK *et al.*, 2018).

A biflorina, em especial, é uma orto-naftoquinona prenilada que foi isolada das raízes da planta *Capraria biflora* L. e tem apresentando propriedades anticâncer relevantes com potencial promissor (RALPH *et al.*, 2016), porém, pouco explorado para o CG.

Considerando-se que a melhor compreensão da atividade anticâncer da biflorina fornecerá dados essenciais para sua possível aplicabilidade clínica, como uma estratégia alternativa e complementar ao tratamento do CG, o presente trabalho objetivou analisar a relação estrutura-toxicidade da biflorina pelo mecanismo redox *in silico*, bem como a atividade citotóxica e anti-invasiva da biflorina em linhagens de CG do tipo intestinal (AGP01 e ACP03).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Câncer

2.1.1. Considerações gerais

O câncer refere-se a um conjunto heterogêneo e complexo de mais de 100 doenças que possuem em comum alterações na expressão de múltiplos genes decorrentes de modificações genéticas e epigenéticas (SHI *et al.*, 2019). Estas alterações conferem às células cancerígenas características biológicas peculiares ao decorrer do processo de carcinogênese que acarretam a perda da homeostasia e garantem vantagens adaptativas em relação às células normais (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em um contexto mais abrangente, acredita-se que a iniciação e a progressão das neoplasias malignas estejam associadas à expressão gênica aberrante causada por mutações que ativam oncogenes e genes prometastáticos ou que silenciam genes supressores tumorais e genes de reparo do DNA. É amplamente aceito que uma certa proporção de mutações pode ser herdada, entretanto, a grande maioria é desencadeada pelo acúmulo de modificações geradas em resposta a fatores endógenos e exógenos, cuja exposição ocorre ao longo da vida (SHI *et al.*, 2019).

Apesar da heterogeneidade, há dez características típicas associadas aos mecanismos patogênicos verificadas em qualquer tipo de câncer e incluem: manutenção da sinalização proliferativa, evasão dos mecanismos supressores de crescimento, evasão do sistema imune, ativação da imortalidade replicativa, ativação da inflamação, ativação da invasão e metástase, indução da angiogênese, indução de mutações e instabilidade genômica, resistência à morte celular e a desregulação do metabolismo energético (**Figura 2**) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Estas

características convergem para a manutenção da proliferação celular exacerbada, da imortalidade e da capacidade de metastatizar (PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014).

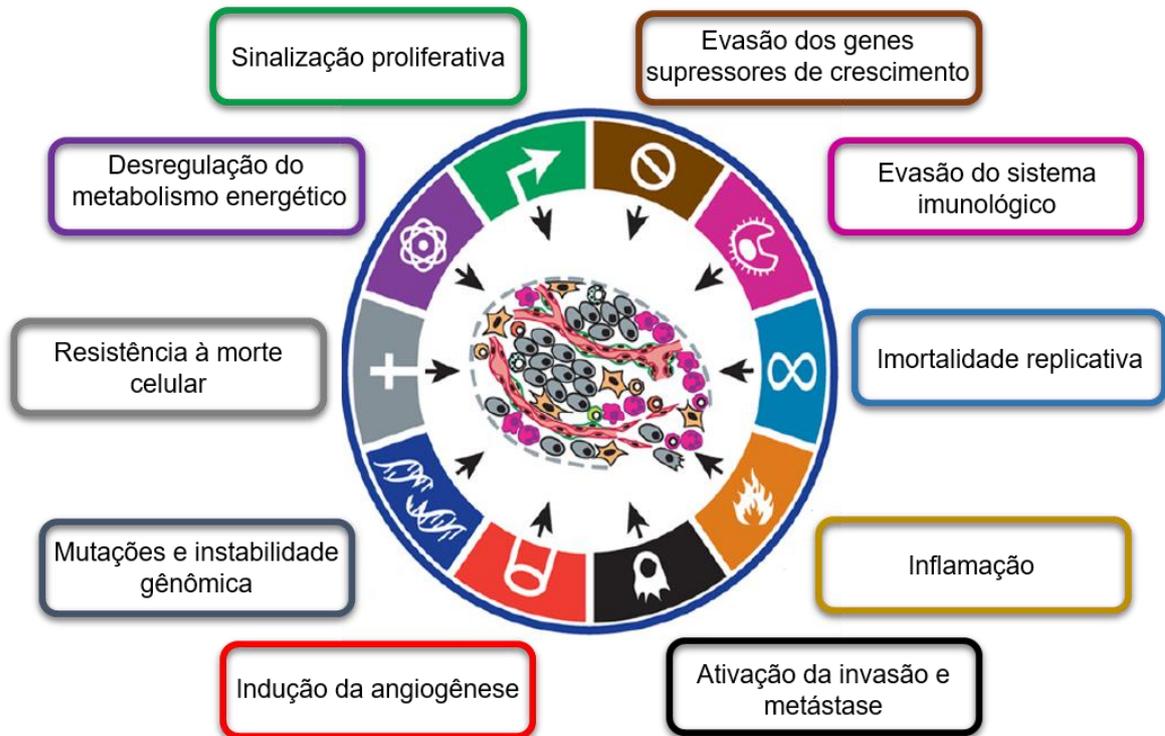


Figura 2. Características marcantes do câncer.

Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011.

A cascata de invasão-metástase resulta na disseminação de células cancerígenas para tecidos e órgãos distantes do local de origem do tumor primário e da subsequente adaptação a estes novos microambientes, gerando sítios secundários do tumor (**Figura 3**). É dependente da liberação de fatores angiogênicos e de metaloproteinases, bem como do recrutamento de vários componentes promovido pelas células tumorais. Estes eventos são orquestrados não somente pela aquisição de alterações genéticas e epigenéticas, mas também pela co-participação de células estromais normais que conferem às células cancerígenas o suporte necessário para alcançarem características indispensáveis à geração de metástases macroscópicas (VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

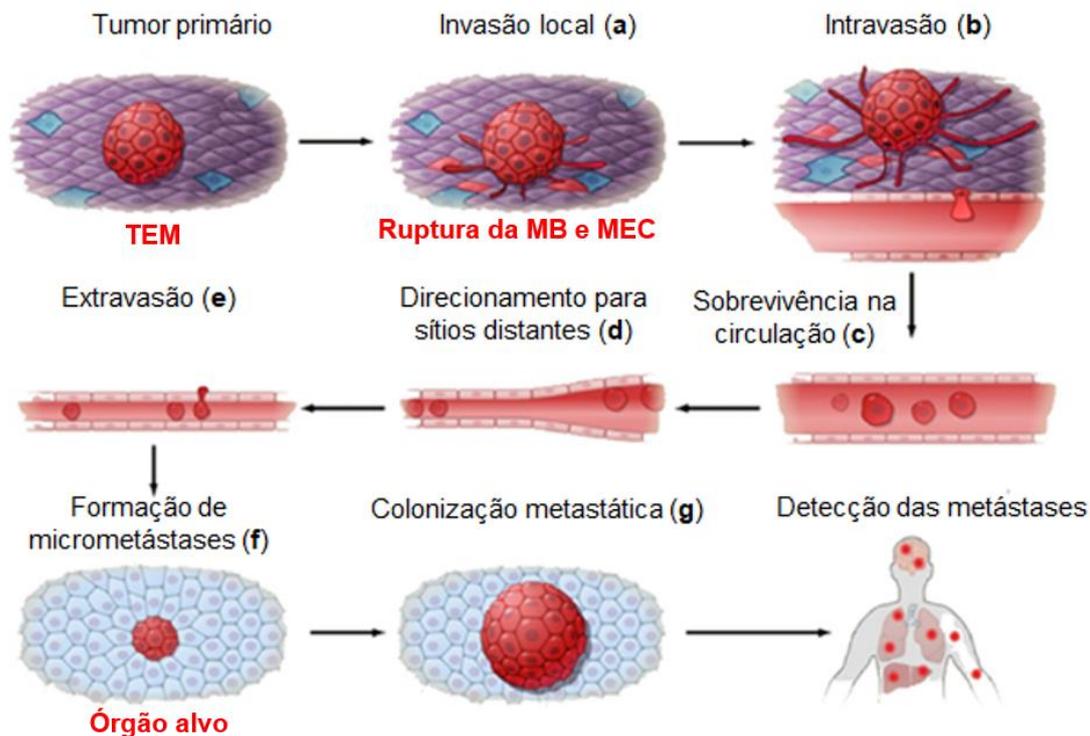


Figura 3. Principais eventos biológicos celulares envolvidos na cascata de invasão-metástase onde ocorre a TEM: a) Invasão local – ocorre a ruptura da MB, degradação da MEC e invasão do tecido de origem; b) Intravasão – já no estroma as células migram para os vasos sanguíneos e linfáticos; c) Sobrevivência na circulação – na circulação precisam driblar o sistema imune e superar o transporte pela corrente sanguínea; d) Direcionamento para sítios distantes – as células tumorais circulantes alcançam órgãos e tecidos distantes do tumor de origem; e) Extravasão – ocorre a saída das células tumorais circulantes dos vasos sanguíneos para o parênquima de tecidos distantes; f) Formação de micrometástases – as células tumorais precisam se adaptar e sobreviver em um novo microambiente g) Colonização metastática – as células tumorais retomam o processo de intensa proliferação para gerar metástases macroscópicas, tumores secundários, ao ponto de serem clinicamente detectáveis.

MB: membrana basal; MEC: matriz extra celular; TEM: transição epitélio mesenquimal.

Fonte: Adaptado de Valastyan; Weinberg, 2011.

A capacidade das células cancerígenas invadirem o estroma intersticial é a primeira etapa do processo de metástase, sendo determinante para a colonização de tecidos adjacentes ao tumor primário. Para tanto, precisam adquirir motilidade e realizar a transição epitélio mesenquimal. Tais características conferem a aquisição do fenótipo invasivo e do comportamento de maior agressividade do câncer (ZHU *et al.*, 2018). A invasividade é dependente do rompimento das barreiras da membrana

basal, a qual desempenha papéis cruciais na organização tecidual e separação dos compartimentos epitelial e estromal, bem como da degradação de proteínas da matriz extracelular por metaloproteinases secretadas no microambiente tumoral (VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Conseqüentemente, verifica-se a redução da expressão de marcadores epiteliais (proteínas de junções aderentes como a E-caderina, α - e β -catenina) e, em contrapartida, o aumento de marcadores mesenquimais (incluindo N-caderina e vimentina) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

É evidente que a progressão metastática, além de ser um processo de vasta complexidade, não é exclusivamente autônomo e independente, dificultando ainda mais o seu controle. Em função de seu elevado caráter agressivo e influenciador negativo da resposta terapêutica, estima-se que aproximadamente 90% da mortalidade por câncer seja atribuída às metástases (VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Logo, a descoberta de compostos capazes de interferir nas etapas da cascata de invasão-metástase, acarretando seu bloqueio, é essencial para garantir o melhor prognóstico do câncer e apresenta grande potencial de utilidade clínica.

2.1.2. Câncer gástrico: epidemiologia, classificação, fatores de risco e terapêutica

O CG é um dos mais incidentes e responde pela terceira principal causa de morte relacionada às neoplasias malignas no âmbito global. Estimativas recentes indicam 950.000 diagnósticos e 720.000 mortes anuais (KATONA; RUSTGI, 2017). Embora tenham ocorrido progressos consideráveis no diagnóstico e tratamento de pacientes com CG, a taxa de sobrevivência global em 5 anos é de aproximadamente 20% (NAGINI, 2012).

No Brasil, há projeção de ocorrência de 600.000 casos novos de câncer para o biênio 2018/2019, deste total, um quantitativo expressivo de 21.290 refletirá o CG. Considerando o *ranking* dos dez tipos mais incidentes entre homens e mulheres, o CG ocupa a quarta e a sexta posição, respectivamente, excetuando o câncer de pele não melanoma. A incidência de CG segmentada por região brasileira é ainda mais alarmante, especialmente para a Região Norte, uma vez esta neoplasia maligna passa a ser a segunda mais frequente nos homens, reduzindo duas posições neste *ranking*, e a quinta comumente diagnosticada nas mulheres (**Tabela 1**) (INCA, 2017).

Tabela 1. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil e Região Norte, estimados para 2019, por sexo*.

Brasil					Região Norte		
Homens	Ranking	Localização primária	Casos	%	Localização primária	Casos	%
	1º	Próstata	68.220	31,7	Próstata	2.700	28,8
	2º	Traqueia, brônquio e pulmão	18.740	8,7	Estômago	1.150	12,2
	3º	Cólon e reto	17.380	8,1	Traqueia, brônquio e pulmão	820	8,7
	4º	Estômago	13.540	6,3	Cólon e reto	450	4,8
	5º	Cavidade oral	11.200	5,2	Leucemias	390	4,2
	6º	Esôfago	8.240	3,8	Cavidade oral	330	3,5
	7º	Bexiga	6.690	3,1	Linfoma não Hodgkin	270	2,9
	8º	Laringe	6.390	3,0	Sistema nervoso central	270	2,9
	9º	Leucemias	5.940	2,8	Laringe	240	2,6
	10º	Sistema nervoso central	5.810	2,7	Esôfago	240	2,6
Mulheres	Ranking	Localização primária	Casos	%	Localização primária	Casos	%
	1º	Mama feminina	59.700	29,5	Colo do útero	2300	24,8
	2º	Cólon e reto	18.980	9,4	Mama	1730	18,6
	3º	Colo do útero	16.370	8,1	Cólon e reto	660	7,1
	4º	Traqueia, brônquio e pulmão	12.530	6,2	Traqueia, brônquio e pulmão	520	5,6
	5º	Glândula tireoide	8.040	4,0	Estômago	480	5,2
	6º	Estômago	7.750	3,8	Leucemias	310	3,3
	7º	Corpo do útero	6.600	3,3	Ovário	270	2,9
	8º	Ovário	6.150	3,0	Glândula tireoide	270	2,9
	9º	Sistema nervoso central	5.510	2,7	Sistema nervoso central	270	2,9
	10º	Leucemias	4.860	2,4	Corpo do útero	200	2,2

*Exceto câncer de pele não melanoma.

Fonte: Adaptado de INCA, 2017.

Grande parte dos CG (95%) é adenocarcinoma por ser de origem epitelial. Há outros tipos mais raros como epidermóides, adenoepidermóides e indiferenciados (NAGINI, 2012). O método de classificação histológica do CG mais o aceito no ocidente é a classificação de Laurèn. A partir deste critério é possível segmentar os adenocarcinomas gástricos em dois subtipos principais que incluem o intestinal e o difuso (KATONA; RUSTGI, 2017; NAGINI, 2012).

O CG do tipo intestinal bem diferenciado é o epidêmico e exibe melhor prognóstico. As células neoplásicas são coesivas e formam estruturas tubulares semelhantes a glândulas e geralmente ulceram. Já o tipo difuso pouco diferenciado apresenta infiltrado e espessamento da parede do estômago sem formar uma massa tumoral considerável (NAGINI, 2012).

A etiologia do CG é multifatorial e está associada à suscetibilidade genética, bem como a fatores ambientais. O histórico familiar e os componentes hereditários contribuem com menos de 3% deste risco, podendo ser citadas como as síndromes mais comuns o CG difuso hereditário e a polipose proximal do estômago (STEWART; WILD, 2014).

Majoritariamente, os tumores gástricos são esporádicos, sendo as alterações genéticas e epigenéticas adquiridas ao longo da vida. Aproximadamente 80% dos casos estão associados à infecção por *Helicobacter pylori*, particularmente as cepas mais virulentas positivas para cagA. Este agente é conhecido por desencadear uma cascata de eventos que promove a progressão sequencial do epitélio gástrico normal para a lesão neoplásica (NAGINI, 2012). Adicionalmente, estão incluídos outros fatores ambientais como os dietéticos associados ao consumo de alimentos ricos em sódio e nitratos, além do tabagismo, a obesidade e a ingestão excessiva de álcool (STEWART; WILD, 2014) (**Figura 4**).

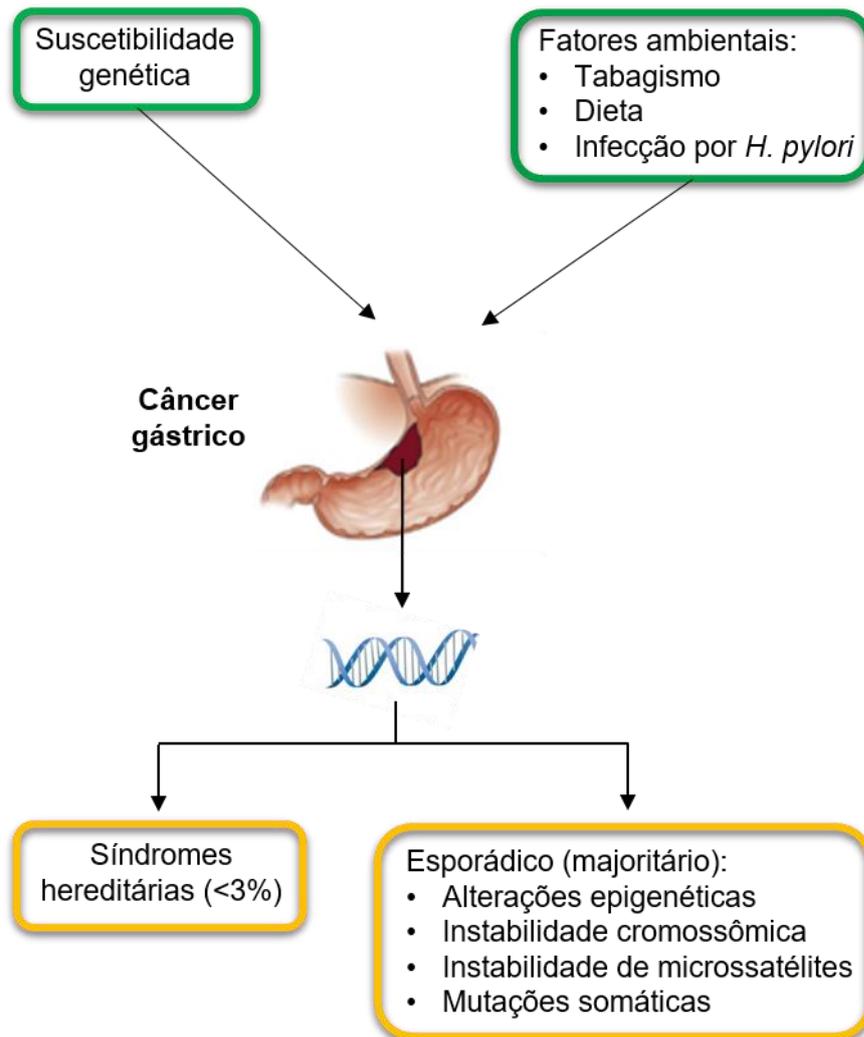


Figura 4. A etiologia do câncer gástrico envolve fatores ambientais e a suscetibilidade genética. Majoritariamente, as alterações genéticas são adquiridas e o componente hereditário contribui com menos de 3% do risco. A patogênese molecular é multifatorial e heterogênea, incluindo várias influências genéticas importantes como as alterações no perfil epigenético, instabilidade cromossômica, instabilidade de microssatélites e mutações gênicas somáticas.

Fonte: Adaptado de McLean; El-Omar, 2014.

A patogênese molecular do CG é determinada por um amplo espectro de influências gênicas importantes que incluem alterações no perfil epigenético, instabilidade cromossômica, instabilidade de microssatélites e mutações somáticas (LIU; MELTZER, 2017; MCLEAN; EL-OMAR, 2014). Em relação aos mecanismos epigenéticos relevantes no CG destacam-se a hipermetilação do DNA, a desregulação de RNAs não codificantes (ncRNAs) e as modificações das histonas, especialmente

causadas por acetilação e metilação (**Figura 5**) (SHI *et al.*, 2019; LIU; MELTZER, 2017).

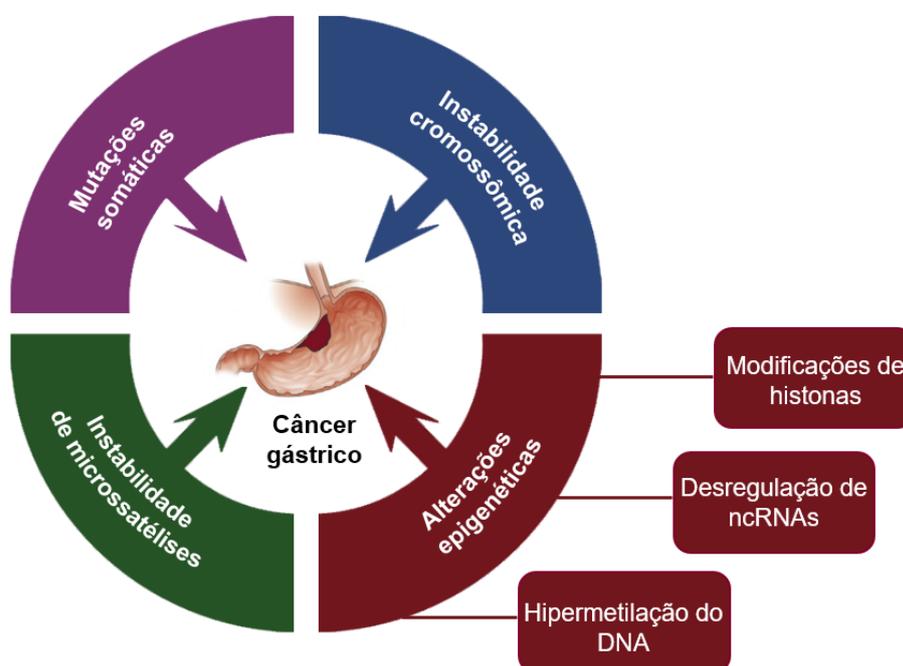


Figura 5. Alterações moleculares genéticas e epigenéticas no câncer gástrico.

ncRNAs: RNAs não codificantes.

Fonte: Adaptado de Liu; Meltzer, 2017.

A ausência de sintomatologia específica acarreta a frequente detecção em estágios já avançados da doença, limitando as opções terapêuticas. Consequentemente, o prognóstico é ruim em parte como resultado de recidiva local, invasão tumoral e metástase (MCLEAN; EL-OMAR, 2014). Além disso, a cirurgia e a quimioterapia possuem eficácia limitada no CG já avançado e há escassez de marcadores moleculares específicos para nortear o tratamento (NAGINI, 2012).

Apesar dos avanços consideráveis na terapêutica que ocorreram na última década, o principal tratamento para CG ainda permanece a cirurgia. Estratégias terapêuticas para o CG visando alvos moleculares ainda permanecem como um grande desafio a ser superado. Em relação ao emprego da terapia personalizada, já é utilizado o anticorpo trastuzumabe para tumores gástricos metastáticos que apresentam a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (KATONA; RUSTGI, 2017).

Assim, a exploração contínua dos possíveis compostos e mecanismos que influenciam a patogênese no CG, é indispensável para ampliar a compreensão dos

mecanismos subjacentes à sua biologia. Neste contexto elucidativo, os estudos *in silico* e *in vitro* utilizando diferentes linhagens celulares são essenciais.

2.1.3. Linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico: ACP03 e AGP01

O conhecimento dos mecanismos que acarretam as alterações em células neoplásicas *in vivo* é bastante limitado, assim, os estudos *in vitro* utilizando linhagens celulares tumorais são ferramentas alternativas e úteis para a elucidação destes mecanismos cancerígenos. Em relação ao CG, um modesto número de linhagens celulares foi estabelecido, majoritariamente em países asiáticos, refletindo de forma restrita a ampla diversidade dos fenótipos tumorais (LEAL *et al.*, 2009).

A linhagem celular de CG, ACP01, foi a pioneira a ser desenvolvida no Brasil em 2004, proveniente de células de adenocarcinoma gástrico de um indivíduo residente na Região Norte do país (LIMA *et al.*, 2004). Em 2009, o mesmo grupo de pesquisa também a partir de indivíduos da Região Norte, estabeleceu e caracterizou geneticamente outras três linhagens de adenocarcinoma gástrico: difuso (ACP02) e intestinal (ACP03 e AGP01) (LEAL *et al.*, 2009).

A ACP03 foi obtida da amostra tecidual do tumor primário removida da região do antro do estômago e estadiada como T4N1M0. Já a AGP01 é a linhagem metastática isolada da ascite carcinomatosa, cujo tumor localizava-se nas regiões do antro e corpo do estômago e foi estadiado como T3N2M1 (LEAL *et al.*, 2009).

Ambas as linhagens celulares apresentaram alterações genéticas semelhantes às verificadas nos tumores de origem, como a trissomia dos cromossomos 8 e 21, além da deleção do 17p. Em virtude dessas especificidades, são consideradas modelos representativos para o estudo da carcinogênese gástrica, particularmente, na população Norte do Brasil de onde foram estabelecidas. Logo, a ACP03 e a AGP01 podem ser empregadas para a melhor compreensão dos eventos subjacentes a este fenótipo característico de instabilidade cromossômica, bem como para a triagem de compostos candidatos a novos fármacos, como os metabólitos secundários (LEAL *et al.*, 2009).

Metabólitos secundários, incluindo a biflorina, são potenciais agentes anticancerígenos, cujos mecanismos de ação e possíveis aplicabilidades terapêuticas estão sendo melhor investigados.

2.2. Atividade anticâncer da biflorina (*Capraria biflora* L.)

Os produtos naturais, sobretudo os vegetais, são fontes de metabólitos ativos com ampla aplicabilidade farmacológica. Estima-se que 50% dos quimioterápicos atualmente utilizados sejam de origem natural ou de seus derivados sintéticos (NEWMAN; CRAGG, 2016).

As quinonas, por exemplo, representam uma importante classe de compostos biológicos que podem ser encontrados em alguns produtos naturais e bioquímicos endógenos (BORGES *et al.*, 2014). Estes compostos têm apresentado resultados promissores em estudos que avaliaram suas propriedades biológicas, tais como bacteriana, antifúngica, antiviral, antimalárica, tripanocida e, especialmente, antitumoral (RALPH *et al.*, 2016; WISINTAINER *et al.*, 2015; MONTENEGRO *et al.*, 2013a,b; VASCONCELLOS *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012; SALAS *et al.*, 2011; SILVA JÚNIOR, *et al.*, 2010; VASCONCELLOS *et al.*, 2005; MANN, 2002).

Naftoquinonas isoladas de raízes fasciculadas têm sido amplamente investigadas quanto a sua atividade anticâncer (JEZIOREK *et al.*, 2018). A biflorina é uma orto-naftoquinona prenilada isolada particularmente das raízes da *Capraria biflora* L. (**Figura 6**) (VASCONCELLOS *et al.*, 2005), porém, pode estar presente em outras plantas como a *Eremophila neglecta* encontrada no deserto australiano (NDI *et al.*, 2007). A *C. biflora* L. pertence à família Myoporaceae, sendo originária das Antilhas e da América do Sul e pode ser localizada em áreas temperadas ou tropicais (AQUINO *et al.* 2006). A ocorrência natural não é claramente determinada, uma vez que seu cultivo como planta medicinal é verificado em diversas regiões do Brasil e em outros países. Entretanto, há indicativos de sua distribuição geográfica em áreas abertas desde o México até o Brasil central. No Brasil há ocorrências confirmadas nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará e Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro) (SOUZA, 2015).

Biflorina tem apresentado propriedades anticâncer relevantes para tumores sólidos e hematológicos, incluindo o câncer gástrico do tipo difuso, cervical, cólon, colorretal, laringe, pulmão, mama, próstata, glioblastoma, melanoma e leucemias (**Tabela 2**), destacando-se como um promissor protótipo a fármaco antitumoral

(RALPH *et al.*, 2016; WISINTAINER *et al.*, 2015; MONTENEGRO *et al.*, 2013a,b; VASCONCELLOS *et al.*, 2011; VASCONCELLOS *et al.*, 2005).

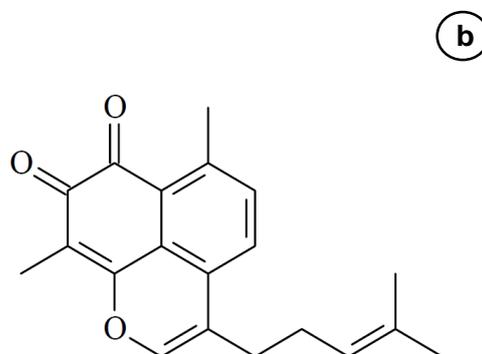


Figura 6. *Capraria biflora* L. (a) e a estrutura química da biflorina (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-pirano-7,8-diona) (b).

Fonte: Ralph *et al.*, 2014.

Tabela 2. Atividade anticâncer da biflorina em linhagens celulares de câncer humano.

Tipo de câncer	Linhagem celular	CI ₅₀ (µM)	Atividade anticâncer	Referências
Cervical	HeLa	95,00	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica • Indutor da apoptose 	WISINTAINER <i>et al.</i> (2015)
Cólon	HCT-8	2,85	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica • Antioxidante 	VASCONCELLOS <i>et al.</i> (2011)
Gástrico	ACP02	1,92	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica • Anticlonogênico • Inibidor da migração • Inibidor da atividade da telomerase • Inibidor da amplificação de <i>MYC</i> 	BARBOSA (2019)
	AGP01	3,44	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica 	
	PG100	6,35	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica 	
Glioblastoma	SF-295	2,04	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica 	VASCONCELLOS <i>et al.</i> (2011)
Laringe	Hep-2		<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica • Indutor da apoptose 	WISINTAINER <i>et al.</i> (2015)
Leucemia	CEM	3,31	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica 	VASCONCELLOS <i>et al.</i> (2005)
	HL-60	6,32	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante 	
	K562	7,88	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica 	
Mama	MCF-7	1,39	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica • Antioxidante 	VASCONCELLOS <i>et al.</i> (2005)
	MX	3,56		
	M14	4,79	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica 	
	MDA-MB-231	47,37		
	SK-Br3	ND	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica • Regulador negativo de EGFR 	
Melanoma	MDA-MB-435	ND	<ul style="list-style-type: none"> • Inibidor da invasão • Regulador negativo de N-caderina e <i>AKT-1</i> 	MONTENEGRO <i>et al.</i> (2013a)
	SK-Mel 103	1,83	<ul style="list-style-type: none"> • Citotóxica 	
	SK-Mel 19	1,96	<ul style="list-style-type: none"> • Indutor da apoptose • Bloqueador do ciclo celular 	
	SK-Mel 28	5,91	<ul style="list-style-type: none"> • Genotóxico • Regulador de <i>MELK</i>, <i>TYMS</i>, <i>MGMT</i> e <i>RAD</i> • Regulador de <i>DNMT1</i>, <i>MBDs1-4</i> e <i>MeCP2</i> • <i>Inibidor da metilação do DNA**</i> 	

Melanoma	UACC-257	5,41	• Citotóxica	VASCONCELLOS <i>et al.</i> (2011)
	UACC-62	7,58		
Pulmão	NCI H23	1,88	• Citotóxica	VASCONCELLOS <i>et al.</i> (2011)
	H266	2,79		
Próstata	PC-3	19,75	• Citotóxica	VASCONCELLOS <i>et al.</i> (2011)

AKT-1: oncogene viral 1 de timoma homólogo a murino; CI_{50} : concentração inibitória de 50% da viabilidade celular; *DNMT1*: DNA metiltransferase 1; EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico; *MBDs* e *MeCP2*: proteínas ligadoras de metil-CpGs; *MELK*: quinase embrionária materna de leucina-zíper; *MGMT*: O⁶-metil-guanina-DNA-metil-transferase; *MYC*: oncogene de mielocitomatose; *RAD*: ATPase envolvida no reparo de DNA; *TYMS*: timidilato sintetase.

ND: não determinado.

** Exceto SK-Mel 103.

Recentemente, foi avaliada a citotoxicidade, alterações morfológicas, tipo de morte celular e a capacidade genotóxica da biflorina em três modelos celulares de melanoma metastático (SK-Mel 19, 28 e 103). Para explorar as ações complementares deste composto durante a proliferação e as interações com DNA, foram verificadas ainda as modificações na expressão de genes relacionados à progressão do ciclo celular (*MELK*), replicação (*TYMS*) e reparação do DNA (*MGMT* e *RAD*). A biflorina foi capaz de reduzir a viabilidade celular de maneira concentração-dependente por meio das interações com o DNA, acarretando sua fragmentação. Além disso, houve bloqueio do ciclo celular, indução da apoptose e a regulação negativa dos genes citados. A modulação da expressão de *MELK* e *TYMS* reforçaram o papel da citotoxicidade mediada por p53. Adicionalmente, a redução da expressão de *MBMT* que está associada a inibição da resistência adquirida a drogas anticâncer, parece indicar um melhor efeito da biflorina em relação à quimioterapia tradicional (RALPH *et al.*, 2016).

Em linhagem de câncer de mama (SK-Br3) com alta expressão de *EGFR* (receptor do fator de crescimento epidérmico), a biflorina inibiu significativamente a proliferação celular mediada pela regulação negativa da expressão de *EGFR*, indicando possíveis benefícios de sua utilização em células tumorais que apresentam amplificação de *EGFR* (MONTENEGRO *et al.*, 2013b). Membros da família *EGFR* têm sido utilizados como alvos terapêuticos para o tratamento do câncer, uma vez que regulam processos celulares fundamentais (proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte), ainda influenciam a tumorigênese, metástase e resistência aos quimioterápicos (HARDY *et al.*, 2010).

A regulação positiva da atividade dos telômeros e das telomerasas induz à imortalidade e à capacidade replicativa ilimitada, sendo frequentemente verificada no câncer. Há fortes indicativos de que a biflorina pode bloquear a atividade das telomerasas e favorecer o encurtamento dos telômeros em células de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (ACP02), além de reduzir a amplificação de *MYC*, exercer papel anti-clonogênico (BARBOSA *et al.*, 2019).

A capacidade de neutralizar radicais livres também é uma propriedade da biflorina. Sua atividade antioxidante foi comprovada pela inibição da peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo em células normais de fibroblastos de mamíferos (V79), bem como pela redução do dano ao DNA e a mutação

desencadeados pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em ambas as células de leveduras *Saccharomices cerevisiae* e V79 (VASCONCELLOS *et al.*, 2010). Foi demonstrada também potente atividade antioxidante contra a auto-oxidação do ácido oleico, principal ácido graxo constituinte dos triglicerídeos (VASCONCELLOS *et al.*, 2005). Os radicais livres quando em desequilíbrio homeostático, em especial as EROs, além de induzir danos oxidativos a biomoléculas (DNA, RNA, lipídios e proteínas) ocasiona a desregulação de importantes vias de sinalização controladas pelas EROs, relacionadas à proliferação celular, diferenciação, adesão e apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Ressalta-se que a citotoxicidade induzida pela biflorina é seletiva, confirmada por achados que indicaram efeitos limitados sobre células normais quando comparadas às linhagens de câncer (BARBOSA *et al.*, 2019; WISINTAINER *et al.*, 2015; MONTENEGRO *et al.*, 2013a,b). Adicionalmente, dados complementares referente aos papéis genotóxicos e protetores da biflorina ratificaram que sua utilização é eficaz e segura (VASCONCELLOS *et al.*, 2016, 2010).

Baseado na premissa da interação entre a biflorina e o DNA, seus possíveis efeitos foram avaliados por métodos eletroquímicos, espectroscópicos e farmacológicos. A biflorina causou danos ao DNA, entretanto, não houve indução significativa de aberrações cromossômicas, reforçando que seu potencial é citotóxico, mas não clastogênico ou aneuploigênico. O entendimento destes mecanismos genotóxicos deve ser explorado uma vez que o DNA é um alvo importante para o planejamento de fármacos. Assim, é possível determinar a afinidade e seletividade dos compostos pelo DNA, além da segurança (VASCONCELLOS *et al.*, 2016). Do mesmo modo, o papel protetor e antimutagênico da biflorina, dependentes da concentração, foram demonstrados em linhagem celular V79, *Salmonella thiphymurium* e *S. cerevisiae*. Em baixas concentrações a biflorina apresentou ação antioxidante e protetora contra a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, entretanto, os efeitos foram opostos quando em concentrações muito elevadas (VASCONCELLOS *et al.*, 2010).

A biflorina também exerce atividade epigenética anticâncer, demonstrada em linhagens de melanoma (SK-Mel 19 e 28). A capacidade de inibir a metilação do DNA associou-se à regulação negativa de genes codificadores de proteínas envolvidas neste processo, incluindo as DNA metiltransferases (*DNMT1*, *DNMT3A*) e proteínas

ligadoras de grupos metil às ilhas CpGs (*MBD1, MBD2, MBD3, MBD4* e *MeCP2*) (RALPH, 2014).

Em relação à atividade antimetastática da biflorina, foi demonstrada sua atuação sobre o controle da invasão celular em melanoma (MDA-MB-435) (MONTENEGRO *et al.*, 2013a). Houve o bloqueio da invasividade a partir da regulação negativa da expressão de N-caderina, provavelmente pela sinalização da via AKT-1. Sabe-se que N-caderina é um dos fatores que podem induzir a motilidade de células tumorais, sendo marcador mesenquimal geralmente associado a invasão e metástase *in vitro*, cuja expressão é suficiente para desencadear o processo de transição epitélio mesenquimal (MONTENEGRO *et al.*, 2013a).

Até o momento, não há publicações na literatura científica referentes à atividade anti-invasiva da biflorina em linhagens de CG, bem como à análise *in silico* das propriedades estruturais deste composto associado às reações redox. Portanto, esta pesquisa é pioneira a abordar ambos os temas.

2.3. Análises *in silico* dos parâmetros de reatividade de candidatos a fármacos

A reatividade dos compostos que apresentam propriedades farmacológicas é um fator crítico que pode afetar a segurança, eficácia e possibilidades de utilização clínica. Dessa forma, além da avaliação metabólica associada à absorção, metabolismo, distribuição e excreção, também devem ser consideradas propriedades relacionadas à estabilidade química (BORGES *et al.*, 2018).

A toxicidade decorrente de efeitos citotóxicos e/ou genotóxicos, quando induzida por estes compostos, pode ocorrer por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio, com formação de intermediários radicalares do tipo cátion radical livre ou semiquinona. Quanto maior a instabilidade química, maior a reatividade e, por consequência, a toxicidade (BORGES *et al.*, 2014; WALLACE, 2003).

Limitações referentes ao conhecimento das propriedades teóricas de toxicidade dos compostos candidatos a fármacos podem induzir ao erro em relação à seleção daqueles mais promissores. Dessa forma, torna-se necessário implementar protocolos de triagens *in silico* para prever efeitos farmacologicamente indesejáveis (TSAIOUN; KATES, 2011).

A elucidação dos mecanismos de toxicidade baseada em parâmetros teóricos de reatividade estrutural a partir das reações de transferência de elétrons pelo

mecanismo redox é fundamental para compreender a influência dos grupos envolvidos na estrutura farmacofórica ou toxicofórica dos compostos e prever suas funcionalidades.

Nesta perspectiva, as análises *in silico* são relevantes para a seleção, além do planejamento e desenvolvimento de candidatos a fármacos, permitindo otimizar e potencializar o perfil farmacológico destas substâncias. Portanto, contribuem sobremaneira para o avanço da química medicinal (BARREIRO, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar a relação estrutura-toxicidade da biflorina pelo mecanismo redox *in silico*, bem como o potencial citotóxico e anti-invasivo em linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, metastática (AGP01) e isolada do tumor primário (ACP03).

3.2. Objetivos específicos

- Realizar análises da relação estrutura-toxicidade da biflorina pelo mecanismo redox *in silico*;
- Comparar a toxicidade estrutural da biflorina com seus derivados simplificados, além da β -lapachona e lapachol *in silico*;
- Avaliar a atividade citotóxica da biflorina nas linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico, AGP01 e ACP03;
- Avaliar a atividade anti-invasiva da biflorina nas linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico, AGP01 e ACP03.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção, extração e isolamento da biflorina

A substância objeto de estudo deste trabalho foi a biflorina, gentilmente cedida pela professora Telma Leda Gomes de Lemos da Universidade Federal do Ceará – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. A *Capraria biflora* L. foi coletada em Fortaleza (Ceará, Brasil) e identificada na Universidade Federal do Ceará. Um espécime de comprovante (número: 30848) foi armazenado no Herbário Prisco Bezerra, do Departamento de Biologia desta universidade.

A extração, isolamento e pureza da biflorina foram realizados conforme descrito por Fonseca *et al.* (2003). A extração foi feita das raízes da planta *Capraria biflora* L. utilizando o solvente éter de petróleo seguido da secagem a temperatura ambiente por 2 dias. O extrato obtido foi parcialmente evaporado à temperatura ambiente até formar um material sólido. Posteriormente, foi filtrado para obter um pó púrpura. O pó foi submetido à cromatografia em sílica gel usando uma mistura binária éter de petróleo- acetato de etila 9:1 (v/v). A pureza e a estrutura foram confirmadas por análise espectroscópica, incluindo Ressonância Magnética Nuclear de uma e duas dimensões, infravermelho, propriedades físicas, além de comparação com as informações da literatura.

A biflorina pura (308,1g/mol) foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenada a 20°C a uma concentração de 1,0 mM. As concentrações de DMSO não excederam 0,1% na cultura (FONSECA *et al.*, 2003).

4.2. Fluxograma dos ensaios

Foram realizados ensaios *in silico* e *in vitro* (**Figura 7**). Os ensaios *in silico* foram empregados para explorar a possível relação estrutura-toxicidade da biflorina pelo mecanismo redox. Além disso, foi realizada a comparação da reatividade com seus derivados estruturais simplificados, bem como outros dois compostos naturais, β -lapachona e o lapachol. Já os ensaios *in vitro* foram utilizados para determinar a citotoxicidade da biflorina nas linhagens selecionadas e determinar os valores das Cl_{50} . Posteriormente foi feito o ensaio de invasão utilizando a concentração mais citotóxica obtida para cada linhagem.

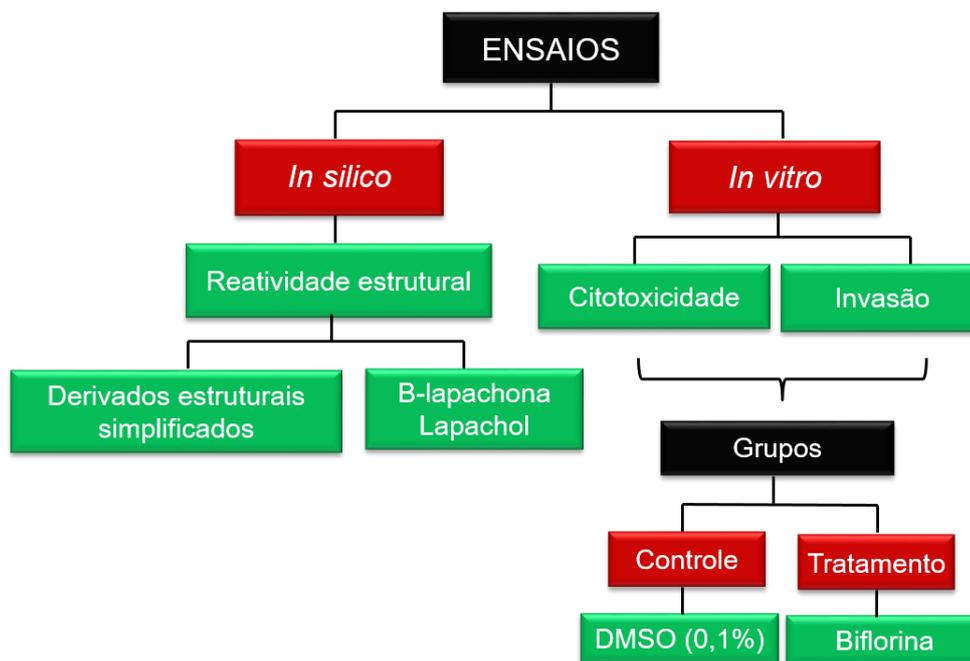


Figura 7. Fluxograma dos ensaios realizados neste estudo.

4.3. Análise *in silico* da relação estrutura-toxicidade da biflorina pelo mecanismo redox

A análise *in silico* da possível relação estrutura-toxicidade da biflorina foi utilizada para avaliar os parâmetros que influenciam as propriedades redox potencialmente envolvidas nos mecanismos citotóxicos ou citoprotetores.

Para tanto, a reatividade molecular da biflorina foi comparada à de outras duas naftoquinonas naturais, β -lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-nafto[1,2-b]piran-5,6-diona) e lapachol (4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil) naftaleno1,2-diona), isoladas de espécies da família Bignoniaceae, especificamente do gênero *Tabebuia* (Figura 8). As lapachonas foram selecionados com base em suas características químicas estruturais e por apresentarem potente atividade anticâncer, cientificamente comprovada (HUSSAIN; GREEN, 2017), além de serem utilizadas como controles em experimentos com a biflorina e outras quinonas (VASCONCELOS *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2012). Além disso, numerosas rotas sintéticas de relevância para a química medicinal estão sendo desenvolvidas para sintetizar compostos bioativos, baseados nestas moléculas (JUNIOR *et al.*, 2019).

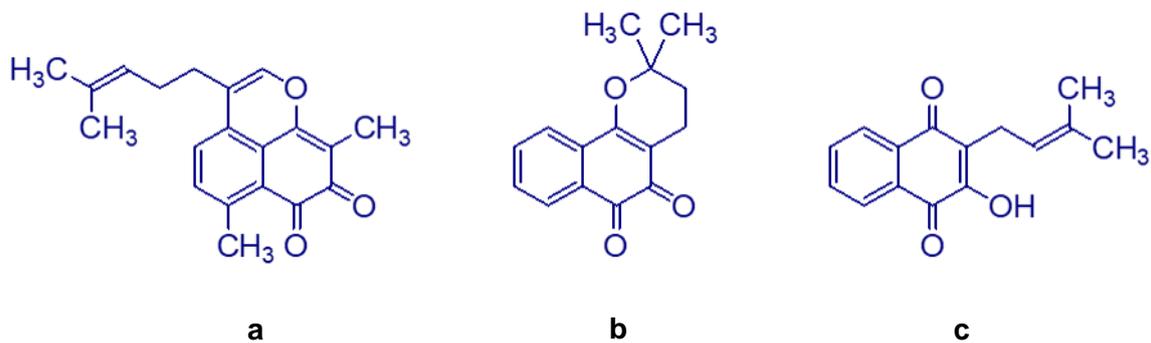


Figura 8. Estruturas químicas da biflorina (a) e dos compostos relacionados, β -lapachona (b) e lapachol (c).

Adicionalmente, foi realizada a simplificação molecular da biflorina visando explorar de maneira sistemática a contribuição de cada grupo envolvido na estrutura farmacofórica ou toxicofórica que poderia estar relacionado com o mecanismo de transferência de elétrons e, conseqüentemente, com a formação de intermediários reativos. Assim, realizou-se a retirada de cada grupo funcional iniciada pelo isohexeno (1), seguida pelas metilas (2-4) e o anel pirano (5) até a obtenção do composto mais simples, *orto*-naftoquinona (6) (**Figura 9**).

Inicialmente, as estruturas foram otimizadas usando os métodos de mecânica molecular (MM+) e semi-empírico (PM3). Em seguida, foram reotimizadas usando a teoria do funcional da densidade (DFT) a partir do funcional B3LYP e do conjunto de base 6-31+G(d,p). As estruturas otimizadas de menor energia foram confirmadas como mínimos reais pelo cálculo da frequência, isento da frequência imaginária.

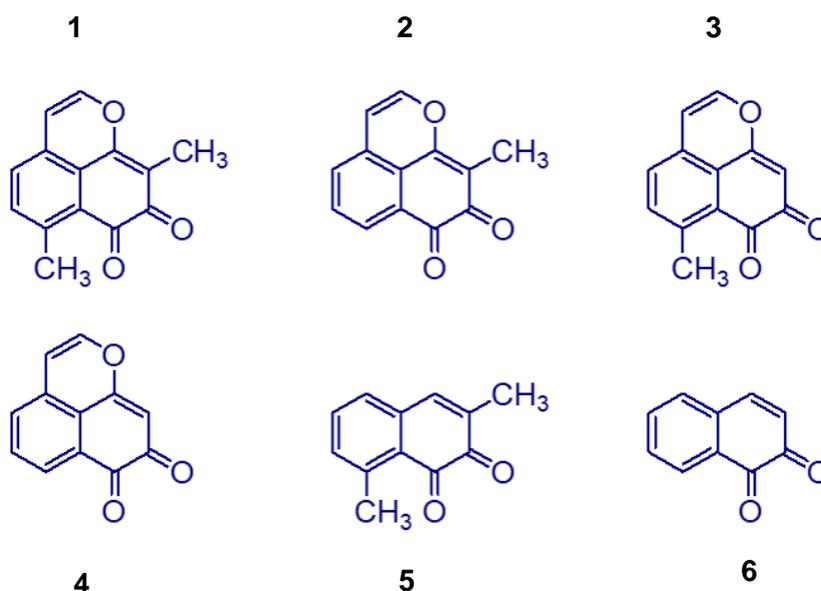


Figura 9. Compostos simplificados da biflorina (1-6).

As propriedades eletrônicas relacionadas à reatividade química foram obtidas pela diferença de energia entre o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) e orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO). Os valores das diferenças entre LUMO e HOMO (GAP^{L-H}) (**Equação 1**) foram relacionados a reatividade na transição eletrônica da região ocupada para a desocupada. Para estimar o processo redox por transferência de elétrons, foi calculado o potencial de ionização (PI) e a afinidade eletrônica (AE) das quinonas. O PI foi calculado (**Equação 2**) por meio da diferença de energia entre seu respectivo cátion radical e a molécula neutra. Já a AE foi calculada como a diferença de energia entre seu respectivo ânion radical e a molécula neutra (**Equação 3**).

Equação 1: $GAP^{L-H} = E_{LUMO} - E_{HOMO}$

Equação 2: $PI = E_{Mol^{+\cdot}} - E_{Mol^0}$

Equação 3: $AE = E_{Mol^{\cdot-}} - E_{Mol^0}$

Cabe ressaltar que HOMO e PI, bem como LUMO e AF, são parâmetros que estão relacionados com a nucleofilicidade (capacidade doadora de elétrons) e eletrofilicidade (capacidade aceptora de elétrons), respectivamente.

As distribuições de densidade de *spin* foram usadas para verificar a estabilidade química do cátion e ânion radical após as doações ou acepções de elétrons.

As barreiras de energia para transferências de um único elétron relacionadas à doação ($\Delta E^{\text{SET}1}$) ou aceitação ($\Delta E^{\text{SET}2}$) foram calculadas pela diferença de energia entre a quinona menos e a mais reativa. Todos os cálculos teóricos foram realizados utilizando o *software* Gaussian 09.

4.4. Linhagens celulares

Os testes celulares para avaliar os efeitos anticâncer da biflorina foram realizados utilizando como modelo as linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal já estabelecidas, ACP03 e AGP01, as quais foram obtidas da amostra tecidual do tumor e da ascite carcinomatosa, respectivamente (LEAL *et al.*, 2009) (Figura 10).

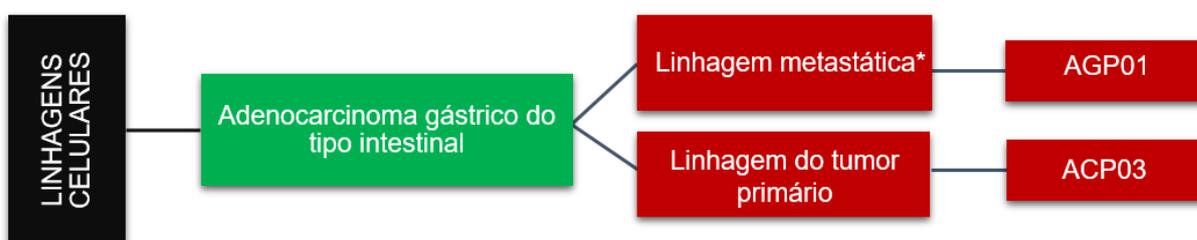


Figura 10. Linhagens celulares utilizadas neste estudo para avaliar a atividade anticâncer da biflorina.

*Estabelecida a partir de células cancerígenas obtidas da ascite carcinomatosa.

4.5. Cultivo celular

As linhagens celulares foram cultivadas em ambiente controlado, em garrafas de cultura apropriadas para o cultivo, com meio de cultura Dulbecco modificado (DMEM - *Thermo Fisher Scientific*TM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina. A manutenção foi em estufa com atmosfera em 5% de CO₂ à 37°C. As confluências celulares e o teor de nutrientes foram constantemente acompanhados em microscópio invertido (*Evos XL*[®]). Sempre que necessário, foi realizada a troca do meio de cultura e a desagregação enzimática, na qual as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e tripsinizadas (0,125%).

4.6. Ensaio de citotoxicidade por *AlamarBlue*

O *AlamarBlue* é um reagente estável, permeável e não tóxico, empregado para monitorar a atividade metabólica celular e, assim, estabelecer a citotoxicidade relativa de fármacos *in vitro*. Este ensaio baseia-se na premissa de que as células viáveis possuem a capacidade de induzir um ambiente de redução no citosol em função do aumento do consumo de oxigênio. Esta característica permite que o reagente *AlamarBlue* seja convertido em um produto fluorescente detectável. Assim, a resazurina, componente ativo deste reagente e que possui a coloração azul não fluorescente, pode ser metabolizada e reduzida a resofurina, um composto rosa que exibe alta fluorescência, sendo que a intensidade da cor resultante reflete proporcionalmente a viabilidade celular (**Figura 11**). Logo, o *AlamarBlue* é um indicador de óxido-redução que produz mudança colorimétrica e de intensidade de fluorescência em resposta a atividade metabólica celular, sendo este o principal mecanismo do método de análise quantitativa da viabilidade e proliferação celular (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994).

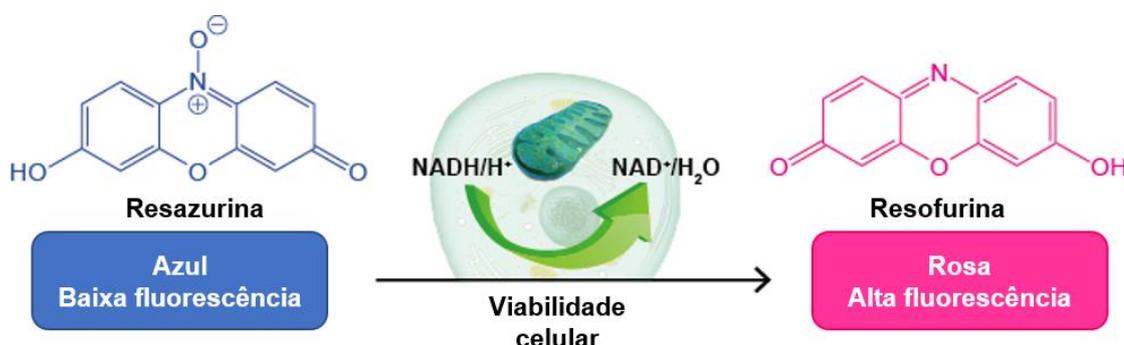


Figura 11. Princípio da técnica do ensaio de viabilidade celular por *AlamarBlue*.

Fonte: Nota técnica *ABP Biosciences*, 2017.

Este ensaio foi realizado conforme a metodologia descrita por Ahmed *et al.* (1994), utilizando placa de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 5×10^3 células em 100 μ L de DMEM, suplementado com SBF (10%) e antibióticos estreptomicina e penicilina (1%). Posteriormente, a placa foi mantida durante 24 horas em estufa para as células ficarem confluentes. Em seguida, as linhagens celulares foram tratadas com diluições seriadas 1:2 (v/v) de biflorina, cujas concentrações mínima e máxima foram 0 e 20 μ M, respectivamente, em dois tempos de tratamento (48 e 72 horas) (BARBOSA *et al.*, 2019). No grupo controle foi adicionado somente células em DMEM

acrescido de DMSO (0,1%). Três horas antes de finalizar cada tempo de tratamento foi adicionado 10 µL de solução de *AlamarBlue* (0,02%), seguido da reincubação da placa em estufa. Após este período de incubação, foi realizada a leitura das placas em leitor de microplaca (*Spectra Max i3*[®]) na região da fluorescência nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 530 nm e 590 nm, respectivamente.

A partir deste ensaio foi possível determinar a concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (CI_{50}) de biflorina para as linhagens de adenocarcinoma gástrico AGP01 (CI_{50} 3,1 µM) e ACP03 (4,5 µM), cujas concentrações foram utilizadas como referências para o experimento subsequente de invasão.

4.7. Ensaio de invasão celular em câmara de *Boyden*

O ensaio de invasão celular utilizando a câmara de *Boyden* modificada com a inserção de filtro (8 µm) com matrigel mimetiza a capacidade que as células cancerígenas possuem de invadir o estroma intersticial e favorecer as metástases (ALBINI *et al.*, 1987). O matrigel, mistura protéica obtida do estroma tumoral de sarcoma murinho, é utilizado para simular a matriz extracelular e atua como uma barreira para as células não invasivas (KLEINMAN; MARTIN, 2005).

Neste ensaio as células são plaqueadas com DMEM sem SBF na câmara superior acima do inserto que é recoberto com uma fina camada de matrigel. Na câmara inferior, abaixo do inserto, é adicionado DMEM com SBF, cuja finalidade é quimioatrair as células, estimulando a transmigração através do matrigel e dos poros contidos na membrana do inserto (**Figura 12**).

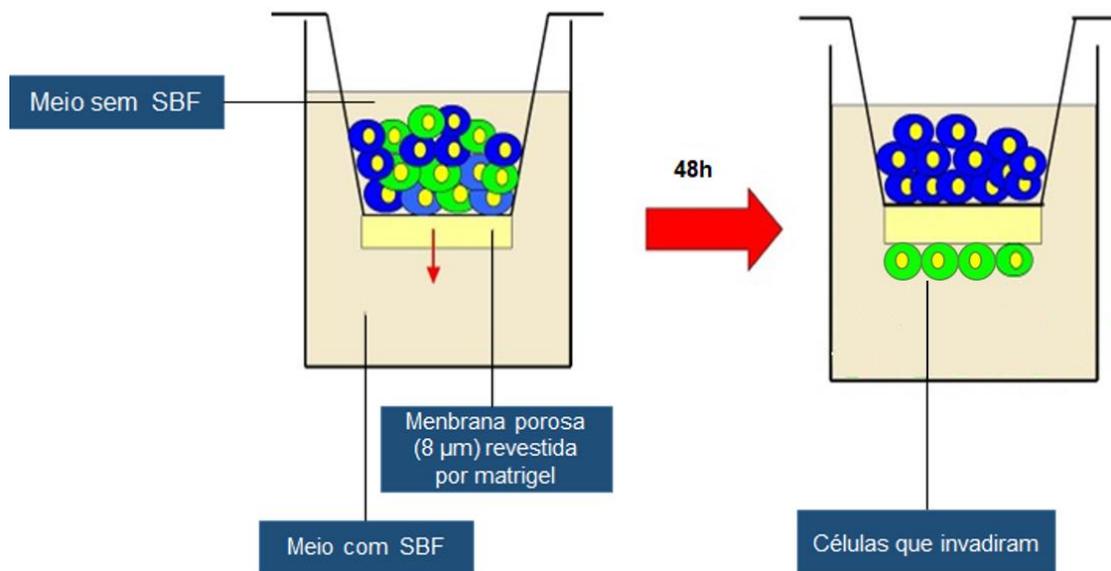


Figura 12. Representação esquemática do ensaio de invasão celular em câmara de *Boyden*. As células com o meio de cultura isento de SBF são colocadas na parte superior da câmara contendo inserto com membrana permeável e poros de 8 μm , revestida uniformemente com uma fina camada de matrigel. Na câmara inferior é acrescentado meio de cultura com SBF, cuja função é quimioatrativa para as células presentes na câmara superior. Após o período de incubação com a droga de interesse, as células transmigradas são fixadas, impermeabilizadas, coradas e quantificadas.

SBF: soro bovino fetal.

Fonte: Adaptado de Soncin *et al.*, 2009.

Em placas de 12 poços, os insertos contendo membrana porosa de 8 μm (*BD BiosciencesTM*) foram revestidos com 150 μL da solução de matrigel diluído 1:6 em DMEM isento de SBF, e solidificado à 37°C *overnight*. As células (2×10^5) foram semeadas na câmara superior em contato com o matrigel com 150 μL de DMEM também isento de SBF e a biflorina na concentração de tratamento: AGP01 (CI_{50} 3,1 μM) e ACP03 (CI_{50} 4,5 μM). Já na câmara inferior foi adicionado DMEM com SBF (10%). No grupo controle foi adicionado somente células em DMEM acrescido de DMSO (0,1%). Após 48 horas, os insertos foram lavados com PBS, as células remanescentes e o matrigel acima da membrana de inserção foram removidos delicadamente com um *swab*. As células aderidas na parte inferior da membrana foram fixadas com paraformaldeído (3,7%) e coradas com *Giemsa* (0,05%). Posteriormente, foram fotografadas em 7 campos aleatórios em microscópio invertido

na objetiva de 20x. A quantificação das células foi realizada no programa *Image J* (*software* de domínio público desenvolvido por *Wayne Rasband*, NIMH, NIH, USA).

4.8. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando-se o *software GraphPad Prism 8.0.2* (*Institute Software for Science*, San Diego, CA). A determinação da CI_{50} foi feita a partir da regressão não linear do percentual de inibição *versus* logaritmo das concentrações, considerando o coeficiente de determinação superior a 0,9 ($R^2 > 0,9$). A verificação da ocorrência de diferença entre os grupos foi realizada por análise de variância bidirecional (ANOVA) seguido pelo teste *post hoc* de *Tukey* ou *Dunnnett*. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes com o p-valor calculado igual ou menor a 0,05 ($p \leq 0,05$). Os dados foram apresentados como os valores médios de três experimentos independentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise *in silico* da relação estrutura-toxicidade da biflorina pelo mecanismo redox

5.1.1. Análise comparativa entre a biflorina e lapachonas

As geometrias das estruturas otimizadas da biflorina, β -lapachona e lapachol pelo método DFT/B3LYP/6-31+G (d,p) (**Figura 13**), mostra a forte influência do sistema naftoquinona planar sobre os grupos laterais à carbonila, especialmente as metilas, prenila e isohexeno.

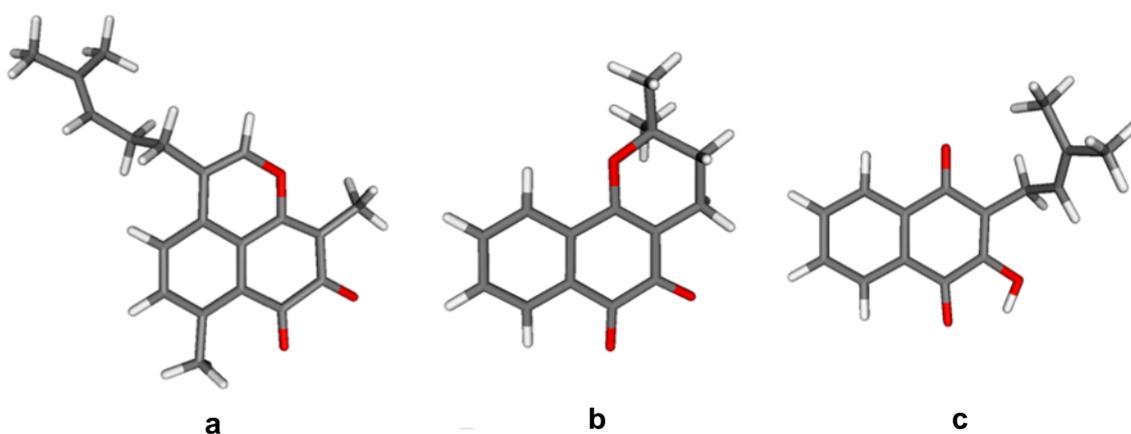


Figura 13. Estruturas químicas otimizadas da biflorina (a), β -lapachona (b) e lapachol (c).

Estes efeitos ocorrem especialmente devido as repulsões estereo-eletrônicas entre os oxigênios e os grupos alquílicos, exceto para a β -lapachona. De fato, os mapas do potencial eletrostático molecular (MEPs) mostram as regiões negativas em vermelho dos oxigênios influenciando os grupos alquilas, exceto no lapachol, onde ocorre uma ponte de hidrogênio (**Figura 14**).

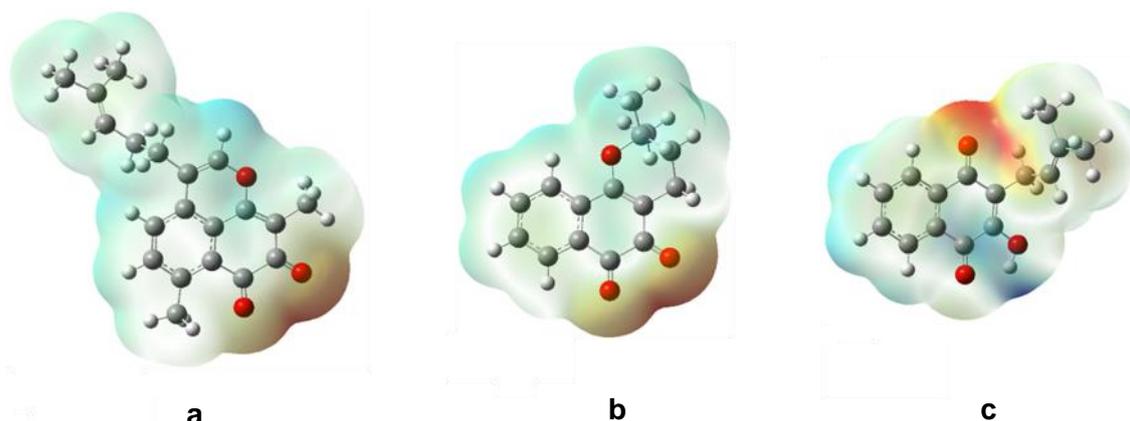


Figura 14. Mapas do potencial eletrostático molecular (MEPs) para a biflorina (a), β -lapachona (b) e lapachol (c).

Os resultados dos parâmetros teóricos calculados para a biflorina, β -lapachona e lapachol estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Parâmetros teóricos calculados para a biflorina e lapachonas.

Compostos	HOMO (eV)	LUMO (eV)	GAP ^{L-H} (eV)	PI (kcal mol ⁻¹)	AE (kcal mol ⁻¹)
Biflorina	-5,90	-3,21	2,79	166,92	-39,98
β -Lapachona	-6,54	-3,11	3,42	183,24	-39,20
Lapachol	-6,42	-3,43	2,98	180,81	-46,77

HOMO: orbital molecular de maior energia ocupado; LUMO: orbital molecular de menor energia desocupado; GAP^{L-H}: diferença entre LUMO e HOMO; PI: potencial de ionização; AE: afinidade eletrônica.

Quando comparada à β -lapachona e lapachol, a biflorina apresentou maior HOMO (-5,90 eV), menor PI (166,92 kcal mol⁻¹), assim como menor GAP^{L-H} (2,79 eV). Adicionalmente, exibiu o segundo maior valor de AE (-39,98). Em contrapartida, foi verificada similaridade entre os valores obtidos de LUMO para os três compostos avaliados. A β -lapachona, por sua vez, apresentou menor HOMO (-6,54 eV), maior PI (183,24 kcal mol⁻¹), assim como maior GAP^{L-H} (3,42 eV). No entanto, esta foi a molécula que exibiu maior AE (-39,20), comparável à biflorina. Finalmente, o lapachol assim como a β -lapachona apresentou baixo HOMO (-6,42 eV), alto PI (180,81 kcal mol⁻¹) e GAP^{L-H} (2,98 eV) que mais se aproximou ao obtido para a biflorina. Contudo, este composto apresentou menor AE (-46,77). Altos valores de PI, bem como os baixos valores de HOMO, conforme verificado para a β -lapachona e lapachol, estão

relacionados ao aumento da toxicidade, segundo modelo descrito por Borges *et al.* (2014).

A biflorina exibiu capacidade aceptora de elétrons comparável a β -lapachona, mas com todas as demais propriedades completamente diferentes, especialmente pelo seu maior potencial doador de elétrons.

Adicionalmente, a biflorina apresentou uma característica diferenciada da β -lapachona e o lapachol, podendo efetivamente atuar tanto como doadora de elétrons em reações nucleofílicas, quanto aceptora de elétrons em reações eletrofílicas. Logo, é a molécula que apresentou melhores propriedades redox e condições de reatividade, porém, com menor potencial tóxico.

Estas diferenças podem estar relacionadas à presença dos grupos alquila e em especial pela presença do anel dihidro-pirano. De acordo com os coeficientes de HOMO e LUMO obtidos (**Figura 15**) é possível ratificar que as cadeias laterais alquílicas de alcanos e alcenos, bem como o sistema formado pelo anel pirano são os grupos que mais influenciaram a reatividade da biflorina. O aumento da conjugação por efeitos indutivos e de ressonância pode ser observado pelo sistema p de elétrons e os grupos metila e o anel pirano.

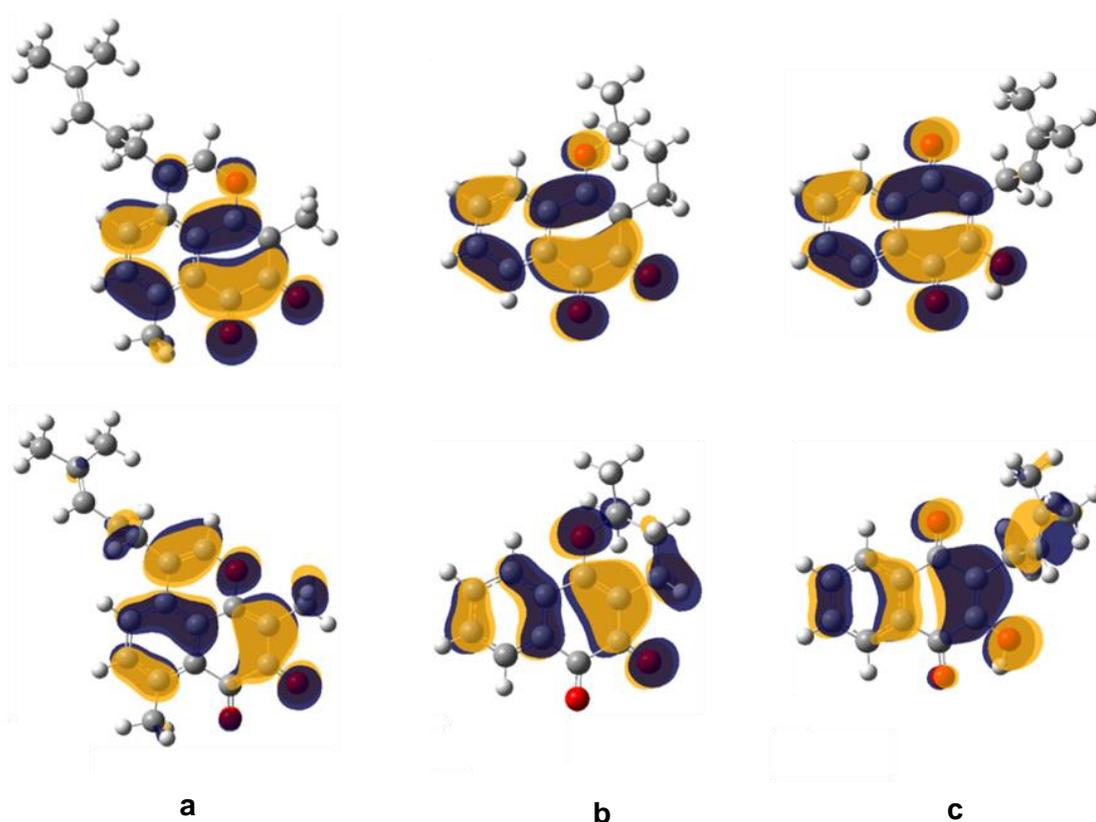


Figura 15. HOMO (abaixo) e LUMO (acima) para a biflorina (a), β -lapachona (b) e lapachol (c).

A distribuição da densidade de *spin* é um parâmetro importante para caracterização da estabilidade de radicais livres, considerando que a energia de um radical livre pode ser diminuída se os elétrons desemparelhados forem deslocados através do sistema conjugado após a retirada de um átomo hidrogênio (BORGES *et al.*, 2012). As contribuições da densidade de *spin* para as formas cátion (esquerda) e ânion (direita) radicais livres da biflorina, β -lapachona e lapachol, mostram um perfil de estabilidade química distinto entre estes compostos (**Figura 16**).

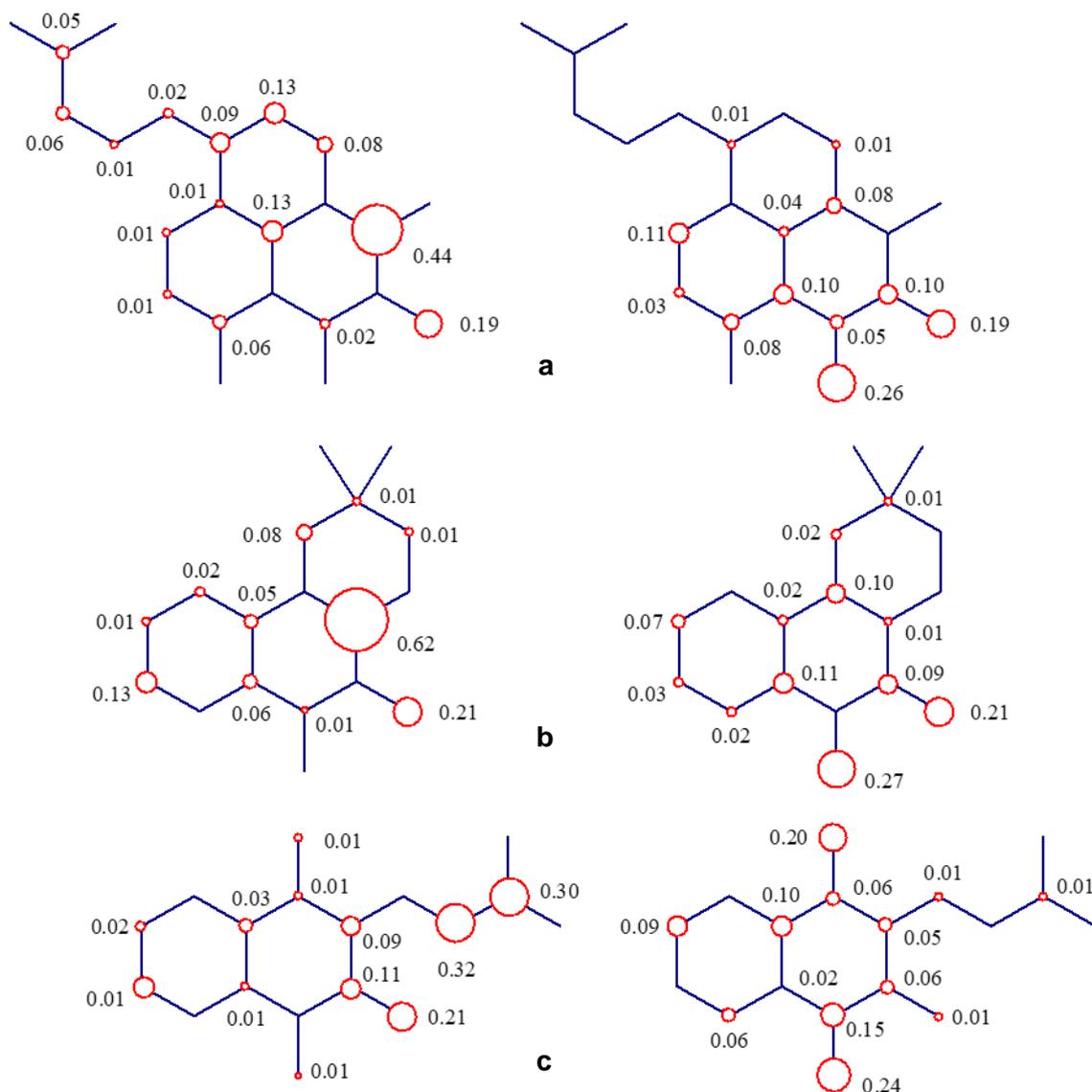


Figura 16. Densidades de *spin* para as formas cátion (esquerda) e ânion (direita) radicais livres da biflorina (a), β -lapachona (b) e lapachol (c).

O cátion radical livre da biflorina possui maior estabilidade química que a β -lapachona e o lapachol devido ao maior número de estruturas de ressonância, cujas maiores contribuições se localizam sobre o oxigênio carbonílico (0,19), o oxigênio do éter (0,08), o carbono das ligações duplas (0,44; 0,13 e 0,09) e alceno (0,06 e 0,05), sendo quantitativamente superior ao encontrado nos demais compostos.

O cátion da β -lapachona apresenta a maior contribuição concentrada sobre o carbono aromático (0,62). Já para o lapachol as maiores contribuições não estão no sistema aromático, normalmente o maior responsável pela estabilidade química, localizadas principalmente sobre o grupo alceno (0,32 e 0,30).

De igual modo, a biflorina na sua forma ânion radical livre possui capacidade de estabilização da carga aniônica radicalar superior quando comparada com a β -lapachona, especialmente pelas contribuições sobre o anel naftoquinona (0,19 e 0,26), enquanto que para a β -lapachona estes valores são 0,21 e 0,27. O lapachol, porém, possui estabilidade discretamente superior da forma aniônica radicalar, considerando as mesmas regiões (0,20 e 0,24).

Assim, a biflorina, embora seja uma molécula de elevada reatividade por atuar como doador e aceptor de elétrons, de maneira geral, é capaz de formar espécies radicalares mais estáveis em comparação às lapachonas avaliadas, particularmente para a forma cátion radical livre, corroborando os resultados obtidos para HOMO e PI.

5.1.2. Análise comparativa entre a biflorina e compostos simplificados

A simplificação molecular da biflorina possibilitou obter seis derivados estruturais, cuja influência de cada grupo funcional foi comparada às suas propriedades redox e mecanismo de toxicidade. Os resultados indicam o papel do sistema isohexeno (1), assim como das metilas (2-4) e do anel dihidro-pirano (5 e 6) neste contexto (**Tabela 4**).

Tabela 4. Parâmetros teóricos calculados para os derivados simplificados da biflorina.

Compostos	Grupos funcionais	HOMO (eV)	LUMO (eV)	GAP ^{L-H} (eV)	PI (kcal mol ⁻¹)	AE (kcal mol ⁻¹)
Biflorina	-	-5,90	-3,21	2,79	166,92	-39,98
1	Isohexeno	-6,05	-3,18	2,87	173,50	-40,20
2	Metil	-6,17	-3,31	2,85	176,80	-42,39
3	Metil	-6,27	-3,25	3,01	179,70	-41,26
4	Metil	-6,39	-3,38	3,00	183,45	-43,47
5	Anel dihidropirano	-6,83	-3,37	3,46	192,12	-42,69
6	orto-naftoquinona	-7,03	-3,59	3,43	199,77	-46,17

HOMO: orbital molecular de maior energia ocupado; LUMO: orbital molecular de menor energia desocupado; GAP^{L-H}: diferença entre LUMO e HOMO; PI: potencial de ionização; AE: afinidade eletrônica; 1-6: derivados simplificados da biflorina.

A partir da análise global da simplificação molecular da biflorina é possível inferir que a retirada sistemática dos grupos funcionais citados implicou, na redução da nucleofilicidade, eletrofilicidade e, portanto, das propriedades redox deste composto.

Além disso, os resultados indicaram também que o composto com maior simplificação obtido, orto-naftoquinona (6), apresentou maior valor de PI e menor de HOMO. Logo, é provável que seja a estrutura mais relacionado à toxicidade das naftoquinonas.

A avaliação do equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos é um parâmetro de extrema relevância no tratamento oncológico (VASCONCELOS *et al.*, 2016). Os radicais livres, por sua vez, podem estar envolvidos tanto nos mecanismos de ação quanto na indução de efeitos tóxicos de diversos quimioterápicos. Neste contexto, as quinonas têm um comportamento duplo intrigante que envolve os radicais livres e pode ser explorado. A depender do sistema em particular, grande parte destes compostos pode atuar como antioxidantes e proteger a homeostase celular especialmente a partir da doação de elétrons para a neutralização de EROs ou se comportar como agentes citotóxicos, gerando espécies reativas em um ambiente celular não saudável, como ocorre no câncer (PAIVA *et al.*, 2015).

A biflorina apresentou esta característica eclética de atuar como doador ou aceptor de elétrons, além de gerar espécies radicalares mais estáveis. Esta propriedade poderia justificar a citotoxicidade seletiva demonstrada em estudos que indicaram efeitos limitados sobre células normais em comparação a algumas linhagens de câncer (BARBOSA *et al.*, 2019; WISINTAINER *et al.*, 2015; MONTENEGRO *et al.*, 2013a,b).

A análise *in silico* dos descritores moleculares avaliados (HOMO, LUMO, PI, AE e distribuição da densidade de *spin*) viabilizou a melhor compreensão das características estruturais e da relação estrutura-toxicidade da biflorina, cujos dados obtidos poderão nortear o planejamento e desenvolvimento de novos derivados otimizados e com o perfil farmacológico potencializado, ampliando as possibilidades de utilização na terapêutica do câncer.

5.2. Ensaio de citotoxicidade

A biflorina apresentou atividade citotóxica para as duas linhagens de adenocarcinoma gástrico avaliadas, em ambos os tempos de tratamento (48 e 72h) e de maneira concentração-dependente. A citotoxicidade foi discretamente mais pronunciada para a linhagem metastática AGP01 em 48h, mas não foi verificada diferença significativa. É provável que em 72h de tratamento a metabolização da biflorina tenha iniciado, influenciado os valores distintos de CI_{50} (**Figura 17**).

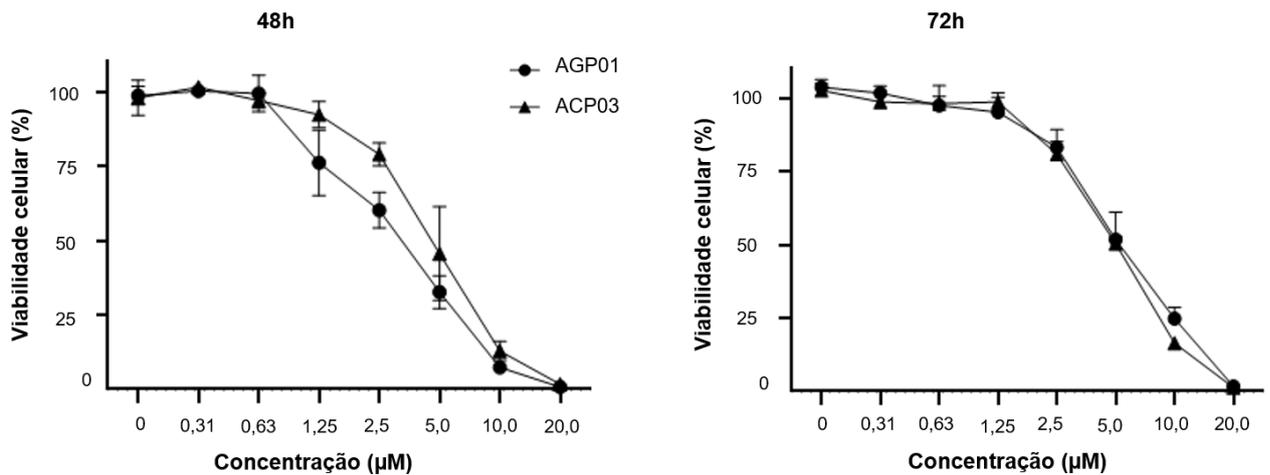


Figura 17. Atividade citotóxica da biflorina para as linhagens tumorais AGP01 e ACP03 em ambos os tempos de tratamento (48 e 72h). Diferença estatisticamente não significativa entre os grupos pela ANOVA 2way seguido pelo teste *post hoc* de Tukey ($p < 0,005$).

Os resultados de CI_{50} obtidos estão representados na **Tabela 5**. Cabe ressaltar que a média das CI_{50} em todos os tempos e linhagens testados foi de $4,45 \mu\text{M} \pm 0,98$. Dessa forma, verificou-se similaridade em relação aos valores das CI_{50} .

Tabela 5. Atividade citotóxica da biflorina nas linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico, ACP03 e AGP01, em dois tempos de tratamento (48 e 72h).

Linhagens celulares	Biflorina					
	48h			72h		
	CI_{50} (μM)	IC 95%	R^2	CI_{50} (μM)	CI 95%	R^2
AGP01	3,06	2,68 – 3,50	0,96	5,31	4,88 – 5,77	0,98
ACP03	4,49	4,11 – 4,92	0,97	4,93	4,68 – 5,20	0,99

CI_{50} : concentração inibitória de 50% da viabilidade celular; IC: intervalo de confiança.

De acordo com as CI_{50} encontradas, foi utilizado para o experimento subsequente de invasão a concentração mais citotóxica para cada linhagem, obtida em 48h de tratamento com a biflorina, sendo $3,1 \mu\text{M}$ e $4,5 \mu\text{M}$ para a AGP01 e ACP03, respectivamente.

Em um estudo prévio que avaliou a citotoxicidade *in vitro* da biflorina no CG, foi observado valor semelhante de CI_{50} para a AGP01 ($3,44 \mu\text{M}$). Além disso, também foi demonstrada atividade citotóxica para outras duas linhagens tumorais gástricas, ACP02 ($CI_{50} 1,92 \mu\text{M}$) e PG100 ($CI_{50} 6,35 \mu\text{M}$) (BARBOSA *et al.*, 2019).

Quando comparada a outras naftoquinonas especificamente isoladas de raízes de plantas, como a shikonina (*Lithospermum erythrorhizon*) e plumbagina (*Plumbago zeylanica* L.), a biflorina apresentou citotoxicidade relativamente superior para células de CG. Shikonina (5,8-di-hidroxi-s-[(1R)-1-hidroxi-4-metilpent-3-enil]naftaleno-1,4-diona) foi citotóxica para células neoplásicas gástricas SGC-7901 e BGC-823 nas concentrações de CI_{50} 9,63 μ M e 13,35 μ M, respectivamente (LIANG *et al.*, 2016), já para HGC-27 a CI_{50} foi ainda maior, 25,78 μ M (HOU *et al.*, 2015). Em outro estudo realizado com nove linhagens de CG (AGS, MKN-28, MKN-45, SNU-216, SNU-484, NCI-N87, YCC-1, YCC-6 e YCC-16), a shikonina reduziu a viabilidade celular com CI_{50} variando entre 14,29 e 30,00 μ M (WANG *et al.*, 2019). Jia *et al.* (2019) também reportou ação inibitória deste composto sobre a viabilidade das células NCI-N87 a partir de 5,0 μ M. Da mesma forma, a plumbagina (5-hidroxi-2-metilnaftaleno-1,4-diona) também inibiu a proliferação celular nas linhagens de CG AGS (CI_{50} 10,12 μ M), MNK-28 (CI_{50} 13,64 μ M) e SGC-7901 (CI_{50} 19,12 μ M) (LI *et al.*, 2012).

Em contrapartida, a capacidade citotóxica da biflorina foi similar ao verificado para a β -lapachona, que inibiu significativamente a proliferação de células de CG AGS a partir de 3 μ M (YU *et al.*, 2014).

As naftoquinonas são fontes expressivas de compostos citotóxicos e, por esta razão, estão presentes em muitos medicamentos clinicamente utilizados na terapia oncológica, como as antraciclinas daunorrubicina, doxorrubicina e mitoxantrona (PEREYRA *et al.*, 2019). Particularmente, a biflorina tem apresentado atividade citotóxica para diferentes tipos de linhagens de células neoplásicas e potencial promissor a fármaco antitumoral (BARBOSA *et al.*, 2019; RALPH *et al.*, 2016; WISINTAINER *et al.*, 2015; MONTENEGRO *et al.*, 2013a,b; VASCONCELLOS *et al.*, 2011; VASCONCELLOS *et al.*, 2005). Entretanto, é a primeira vez que esta atividade antiproliferativa é demonstrada especificamente na linhagem de CG do tipo intestinal ACP03.

Os valores das CI_{50} obtidos para as linhagens AGP01 e ACP03, utilizadas neste estudo como modelo para a avaliação da atividade da biflorina contra o CG, são significativos e ratificam sua potencialidade terapêutica. Além disso, estes resultados sugerem que a biflorina apresenta capacidade citotóxica semelhante ou superior a outras naftoquinonas naturais descritas na literatura para células de CG.

5.3. Ensaio de invasão celular

A biflorina reduziu a capacidade invasiva da linhagem metastática AGP01 ($p < 0,0001$) quando comparada ao seu controle na concentração da CI_{50} . Para a linhagem isolada do tumor primário ACP03 verificou-se a redução do quantitativo de células invasivas, mas não houve diferença significativa. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças entre os controles e a metade do valor da CI_{50} de cada linhagem (**Figuras 18 e 19**). Logo, é provável que a inibição da capacidade de invasão proporcionada pela biflorina seja, de fato, em concentrações próximas ou superiores a CI_{50} para a AGP01.

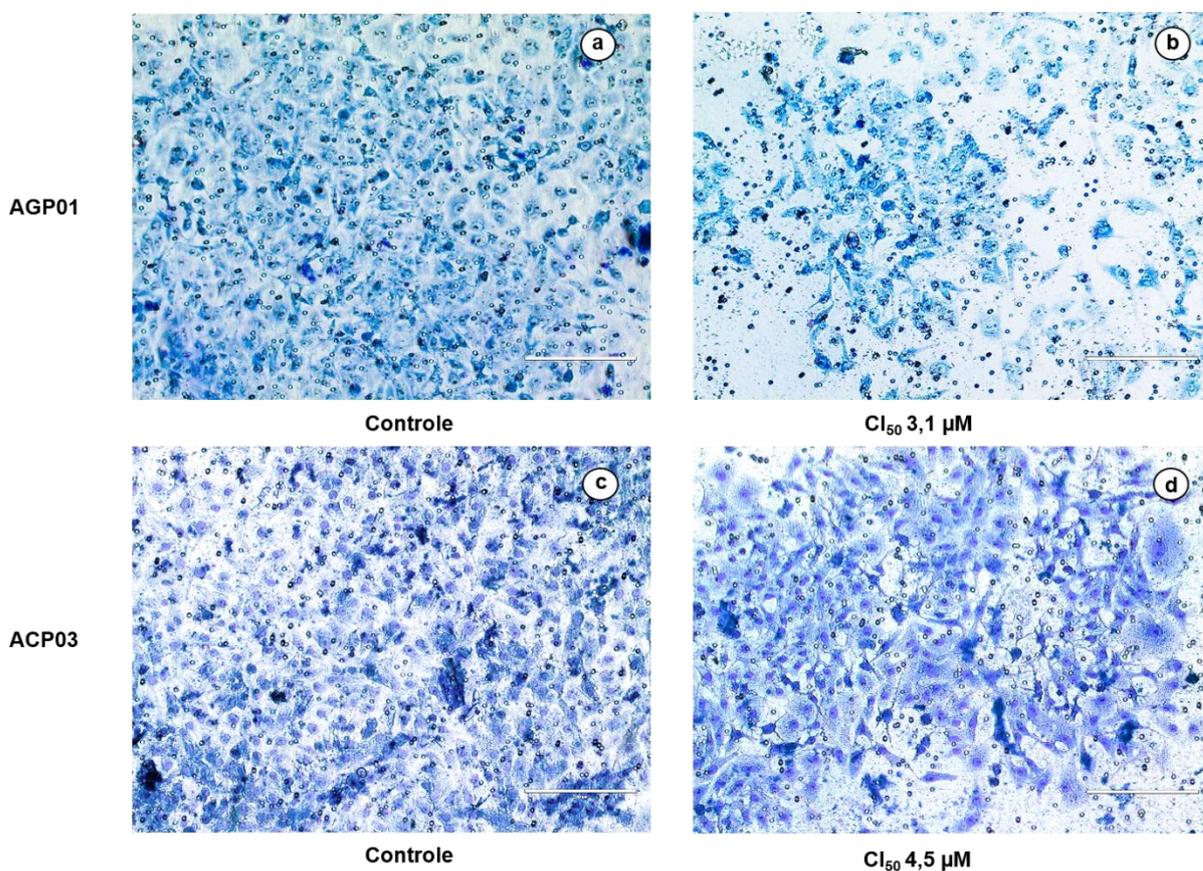


Figura 18. Capacidade invasiva das linhagens celulares AGP01 (a e b) e ACP03 (c e d) após 48h de tratamento com a biflorina, comparadas aos seus controles. As fotos são representativas de três experimentos independentes, obtidas no aumento de 200x.

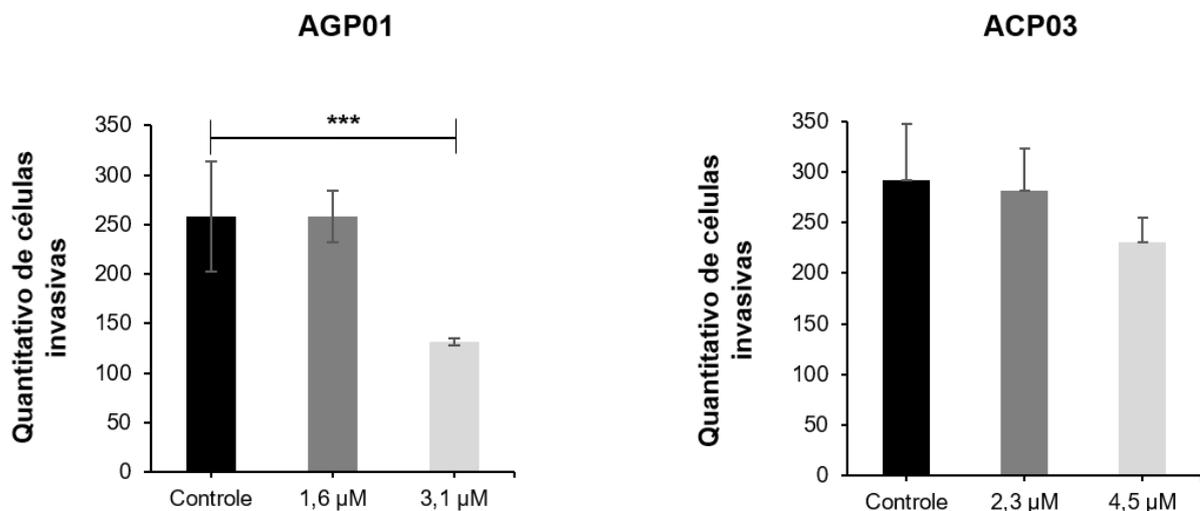


Figura 19. Inibição da invasão celular das linhagens AGP01 e ACP03 em 48h de tratamento com a biflorina. ***Diferença estatisticamente significativa entre os grupos pela ANOVA 2way seguido pelo teste *post hoc* de *Dunnett* ($p < 0,0001$).

Não há dados científicos sobre a atividade anti-invasiva da biflorina especificamente em linhagens de CG. Entretanto, em um ensaio de migração que avaliou o efeito deste composto em células de CG ACP02 foi reportada atividade antimigratória em concentrações próximas à utilizada neste estudo (1 e 2,5 µM) (BARBOSA *et al.*, 2019). Em contrapartida, em linhagem celular de melanoma (MDA-MB-435), a biflorina foi capaz de bloquear a invasividade de maneira concentração dependente após o tratamento com 1; 2,5 e 5 µM deste composto, a partir da regulação negativa da expressão de N-caderina (MONTENEGRO *et al.*, 2013a).

Assim com verificado no presente estudo com a biflorina, o tratamento de células tumorais gástricas AGS com a plumbagina suprimiu significativamente a invasão e migração em uma concentração similar (5 µM). Este efeito foi relacionado à regulação negativa do receptor de quimiocina 4 (CXCR4), cuja interação com o seu ligante CXCL12 é crítica para o processo de metástase no CG (MANU *et al.*, 2011).

A skinonina também apresentou capacidade de restringir a invasão e migração celular, porém, na linhagem de CG NCI-N87 e em uma concentração superior (10 µM). Jia *et al.* (2019) sugeriram que esta característica inibitória foi associada à inativação da via PI3/AKT. Por outro lado, Liu *et al.* (2015) reportaram inibição da invasão e migração de células gástricas neoplásicas MGC-803 em uma concentração inferior de skinonina (1,85 µM), sendo que o mecanismo inibitório associou-se à modulação das vias de ativação do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) e do receptor de membrana do tipo

Toll 2 (TLR2) que está envolvido na resposta imune, porém, sua expressão alterada é considerada um risco aumentado para o CG.

A metástase tumoral é um obstáculo clínico vital e também um grande desafio para a cura de vários tipos de câncer, como o CG. É consenso que capacidade de invasão e migração está diretamente envolvida neste processo de indução da malignidade das células cancerígenas (ZHANG *et al.*, 2017).

Curiosamente, a biflorina apresentou relevante papel anti-invasivo para a linhagem metastática, que possui capacidade de invasão ainda superior em comparação às células que não apresentam esta característica (KONG *et al.*, 2016). Estes achados sugerem que a biflorina tem potencial promissor como coadjuvante no tratamento das metástases no CG. No entanto, ainda são necessários estudos elucidativos dos possíveis mecanismos envolvidos na regulação da invasão celular.

6. CONCLUSÃO

A biflorina apresentou características de reatividade estrutural interessantes podendo participar de reações que envolvem a transferência de elétrons tanto como doador quanto aceptor, além de gerar espécies radicalares mais estáveis quando comparada a compostos naturais com estruturas químicas similares, como a β -lapachona e ao lapachol. Estas propriedades sugerem que a biflorina possa desempenhar atividade anticâncer com menos efeitos colaterais, o que poderia justificar sua citotoxicidade seletiva. A simplificação molecular da biflorina também permitiu inferir que a orto-naftoquinona é provavelmente a estrutura mais associada à toxicidade das naftoquinonas.

Adicionalmente, a biflorina foi citotóxica para as duas linhagens de adenocarcinoma gástrico avaliadas (AGP01 e ACP03) de maneira concentração-dependente e com valores de CI_{50} consideravelmente baixos, ratificando sua potente atividade citotóxica demonstrada em estudos prévios com outras células tumorais. Além disso, impediu a invasão da linhagem metastática AGP01. A proliferação celular, assim como a invasão, são importantes *hallmarks* do câncer, cujos controles são críticos para a progressão, tratamento e prognóstico das neoplasias malignas.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo ampliam as possibilidades de utilização da biflorina na terapêutica do CG do tipo intestinal, especialmente, reduzindo a capacidade metastática.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABP *Biosciences* – Nota técnica. Disponível em: <<http://www.abpbio.com/alarblue-1/>>. 2017. Acesso em: 11 Jul. 2019.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**. v.170, n.2, p.211–24, 1994.

ALBINI, A.; IWAMOTO, Y.; KLEINMAN, H.K.; MARTIN, G.R.; AARONSON, S.A. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. **Cancer Research**. v.47, n.12, p.3239–3245, 1987.

AQUINO, T.M.; LIMA, C.S.A.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma revisão. **Acta farmacêutica bonaerense**. v.25, p.460–467, 2006.

ARAÚJO, A.J.; SOUZA, A.A.; SILVA JÚNIOR, E.N.; MARINHO-FILHO, J.D.B.; MOURA, M.A.B.F.; ROCHA, D.D.; VASCONCELLOS, M.C.; COSTA, C.O.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FERREIRA, V.F.; ABREU, F.C.; PINTO, A.V.; MONTENEGRO, R.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; GOULART, M.O.F. Growth inhibitory effects of 3'-nitro-3-phenylamino nor-beta-lapachone against HL-60: a redox-dependent mechanism. **Toxicology in Vitro**. v.26, p.585–594, 2012.

BARBOSA, G..S.B.J.; LIRA, E.C.L.; RALPH, A.C.L.; GREGORIO, L.; LEMOS, T.L.G.; BURBANO, R.R.; CALCAGNO, D.Q.; SMITH, M.A.C.; MONTENEGRO, R.C.; VASCONCELLOS, M.C. Biflorin inhibits the proliferation of gastric cancer cells by decreasing *MYC* expression. **Toxicology in Vitro**. 104735, 2019.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES C. R. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**. v.25, p.129–148, 2002.

BORGES, R.S.; CARNEIRO, A.S.; BARROS, T.G.; BARROS, C.A.L.; NETO, A.M.J.C.; SILVA, A.B.F. Understanding the cytotoxicity or cytoprotective effects of biological and synthetic quinone derivatives by redox mechanism. **Journal of Molecular Modeling**. v.20, n.2541, 2014.

BORGES, R.S.; COSTA, F.M.; PEREIRA, T.L.; ARAUJO, T.L.; ALMEIDA, E.D.; SILVA, A.B.F. *N*-aetyl-cysteine increases chemical stability of hydroquinone in pharmaceutical formulations: a theoretical and experimental approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.29, n.3, p.609–614, 2018.

BORGES, R.S.; QUEIROZ, A.N.; MENDES, A.P.S.; ARAÚJO, S.C. Density Functional Theory (DFT) study of edaravone derivatives as antioxidants. **International Journal of Molecular Sciences**. V.13, p.7594–7606, 2012.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R.L.; TORRE, L.A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

or worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer Journal for Clinicians**. v.68, p.394–424, 2018.

COSTA, C.O.; COSTA, E.O.; FERREIRA, F.R.; VIANA, L.S.; SILVA, F.A.S.; ABREU, F.C.; FIGUEIREDO, I.M.; PINHO JR, W.; BENTO, E.S.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; AGUILERA-VENEGAS, B.; NORAMBUENA, E.; OLEA-AZAR, C.; MOF, F. Oncocalyxone A: electrochemical, spectroscopic investigation and studies of its interaction with DNA, nucleobases and N-acetylcysteine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.23, p.1174–1185, 2012.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Cancer Epidemiology**. v.44, n.8, p.1941–1953, 2019.

FONSECA, A.M.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; MONTE, F.J.Q.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T.L.G. Total assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectra of biflorin and bisbiflorin from *Capraria biflora*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1038–1040, 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v.144, n.5, p.646–674, 2011.

HARDY, K.M.; BOOTH, B.W.; HENDRIX, M.J.; SALOMON, D.S.; STRIZZI, L. ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. v.15, p.191–199, 2010.

HOU, Y.; XU, J.; LIU, X.; XIA, X.; LI, N.; BI, X. Shikonin induces apoptosis in the human gastric cancer cells HGC-27 through mitochondria-mediated pathway. **Pharmacognosy Magazine**. v.11, n.42, p. 250–256, 2015.

HUANG, Z.; HUANG, Q.; JI, L.; WANG, Y.; QI, X.; LIU, L.; LIU, Z.; LU, L. Epigenetic regulation of active chinese herbal components for cancer prevention and treatment: a follow-up review. **Pharmacological Research**. v.114, p.1–12, 2016.

HUSSAIN, H.; IVAN R. GREEN, I.R. Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research (1997-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v.27, n.10, 1111–1121, 2017.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Inca, 2017.

JIA, L.; ZHU, Z.; LI, H.; LI, Y. Shikonin inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis in NCI-N87 cells via inhibition of PI3K/AKT signal pathway. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. v.47, n.1, p.2662–2669, 2019.

JEZIOREK, M.; SYKŁOWSKA-BARANEK, K.; PIETROSIUK, A. Hairy root cultures for the production of anti-cancer naphthoquinone compounds. **Current Medicinal Chemistry**. v.25, p.4718–4739, 2018.

JUNIOR, E.N.S.; JARDIM, G.A.M.; JACOB, C.; DHAWA, U.; ACKERMANN, L.; CASTRO, S.L. Synthesis of quinones with highlighted biological applications: A critical update on the strategies towards bioactive compounds with emphasis on lapachones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.179, p. 863e915, 2019.

KATONA, B.W.; RUSTGIA, K. Gastric cancer genomics: advances and future directions. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**. v.3, n.2, p. 211–217, 2017.

KLEINMAN, H.K.; MARTIN, G.R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology**. v.15, n.5, p.378–86, 2005.

KONG, J.; DI, C.; PIAO, J.; SUN, J.; HAN, L.; CHEN, L.; YAN, G.; LIN, Z. Ezrin contributes to cervical cancer progression through induction of epithelial-mesenchymal transition. **Oncotarget**. v.7, n.15, 2016.

LEAL, M.F.; MARTINS DO NASCIMENTO, J.L.; DA SILVA C.E.A.; VITA LAMARÃO, M.F.; CALCAGNO, D.Q.; KHAYAT, A.S.; ASSUMPÇÃO, P.P.; CABRAL, I.R.; SMITH, A.C.M.; BURBANO, R.R. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer genetics and Cytogenetics**. v.195, n.1, p.85–91, 2009.

LI, J.; SHEN, L.; LU, F-R.; QIN, Y.; CHEN, R.; LI, J.; LI, Y.; ZHAN, H-Z, HE, Y-Z. Plumbagin inhibits cell growth and potentiates apoptosis in human gastric cancer cells *in vitro* through the NF- κ B signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**. v.33, p.242–249, 2012.

LIANG, W.; CAI, A.; CHEN, G.; XI, H.; WU, X.; CUI, J.; ZHANG, K.; ZHAO, X.; YU, J.; WEI, B.; CHEN, L. Shikonin induces mitochondria mediated apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity of gastric cancer through reactive oxygen species. **Scientific Reports**. v.6, p.38267, 2016.

LIMA, E. M.; RISSINO, J. D.; HARADA, M. L., ASSUMPÇÃO, P. P.; DEMACHKI, S.; GUIMARAES, A. C.; CASSARTELLI, C.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R. Conventional cytogenetic characterization of a new cell line, ACP01, established from a primary human gastric tumor. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.37, p.1831-1838, 2004.

LIU, J.P.; LIU, D.; GU, J.G.; ZHU, M.M.; CUI, L. Shikonin inhibits the cell viability, adhesion, invasion and migration of the human gastric cancer cell line MGC-803 via the Toll-like receptor 2/nuclear factor-kappa B pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.67, p.1143–1155, 2015.

LIU, X.; MELTZER, S.J. Gastric cancer in the era of precision medicine. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**. v.3, n.3, p. 48–358, 2017.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future, **Nature Reviews Cancer**. v.2, p.143–148, 2002.

MANU, K.A.; SHANMUGAM, M.K.; RAJENDRAN, P.; LI, F.; RAMACHANDRAN, L.; HAY, H.S.; KANNAIYAN, R.; SWAMY, S.N.; VALI, S.; KAPOOR, S. Plumbagin inhibits

invasion and migration of breast and gastric cancer cells by downregulating the expression of chemokine receptor *cxcr4*. *Molecular Cancer*. v.10, p.107, 2011.

MCLEAN, M.H.; EL-OMAR, R.M. Genetics of gastric cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. v.11, n.11, p.664–674, 2014.

MONTENEGRO, R.C.; VASCONCELLOS, M.C.; BARBOSA, G.S.; BURBANO, R.M.R.; SOUZA, L.G.S.; LEMOS, T.L.G.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O. A novel o-naphthoquinone inhibits N-cadherin expression and blocks melanoma cell invasion via AKT signaling. **Toxicology in Vitro**. v.27, p.2076–2083, 2013a.

MONTENEGRO, R.C.; BURBANO, R.R.; DA SILVA, M.N.; LEMOS, T.G.; VASCONCELLOS, M.C. Biflorin, a naphthoquinone, inhibits EGFR in breast cancer cells. **Medicinal Chemistry**. v.3, p.179–182, 2013b.

NAGINI, S. Carcinoma of the stomach: a review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**. v.15, n.4, p.156–169, 2012.

NDI, C.P.; SEMPLE, S.J.; GRIESSER, H.J.; PYKE, S.M.; BARTON, M.D. Antimicrobial compounds from the Australian desert plant *Eremophila neglecta*. **Journal of Natural Products**. v.70, p.1439–1443, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**. v.79, p.629e661, 2016.

PAIVA, Y.G.; FERREIRA, F.R.; SILVA, T.L.; LABBÉ, E.; BURIEZ, O.; AMATORE, C.; GOULART, M.O.F. Electrochemically driven supramolecular interaction of quinones and ferrocifens: an example of redox activation of bioactive compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v.5, p.136–162, 2015.

PATTABIRAMAN, D.R.; WEINBERG, R.A. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose?. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.13, n.7, p.497–512, 2014.

PEREYRA, C.E.; DANTAS, R.F.; FERREIRA, S.B.; GOMES, L.P.; SILVA-JR, F.P. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. **Cancer Cell International**. v.19, p.207, 2019.

RALPH, A.C.L. **Avaliação do potencial citotóxico da biflorina em células de melanoma humano com diferentes padrões genéticos**. 2014. [Dissertação de mestrado]. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

RALPH, A.C.L.; CALCAGNO, D.Q.; SOUZA, L.G.S.; LEMOS, T.L.G.; MONTENEGRO, R.Q.; SMITH, M.A.C.; VASCONCELLOS, M.C. Biflorin induces cytotoxicity by DNA interaction in genetically different human melanoma cell lines. **Toxicology in vitro**. v.34, p.237–245, 2016.

SALAS, C.O.; FAUNDEZ, M.; MORELLO, A.; MAYA, J.D.; TAPIA, R.A. Natural and synthetic naphthoquinones active against *Trypanosoma cruzi*: an initial step towards new drugs for Chagas disease. **Current Medicinal Chemistry**. v.18, p.144–161, 2011.

SHANKAR, E.; KANWAL, R.; CANDAMO, M.; GUPTA, S. Dietary phytochemicals as epigenetic modifiers in cancer: promise and challenges. **Seminars in Cancer Biology**. v.40, n.41, p.82–99, 2016.

SHI, Q.; BISHAYEE, A.; BHATIA, D. Genetic and epigenetic targets of natural dietary compounds as anticancer agents. In: **Epigenetics of cancer prevention**. p.3–21, 2019.

SILVA JÚNIOR, E.N.; DEUS, C.F.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; MORAES, M.O.; PINTO, M.C.F.R.; SIMONE, C.A.; FERREIRA, V.F.; GOULART, M.O.F.; ANDRADE, C.K.Z.; PINTO, A.V. 3-Arylamino and 3-alkoxy-nor- β -lapachone derivatives: synthesis and cytotoxicity against cancer cell lines. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.53, 504–508, 2010.

SONCIN, S.; LO CICERO, V.; ASTORI G.; SOLDATI, G.; GOLA, M.; SÜRDER, D.; MOCCHETTI, T. A practical approach for the validation of sterility, endotoxin and potency testing of bone marrow mononucleated cells used in cardiac regeneration in compliance with good manufacturing practice. **Journal of Translational Medicine**. v.7, n.78, 2009.

SOUZA, V.C. **Myoporaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB25821>>. Acesso em: 31 Jul. 2019.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report**. IARC Press: Lyon, 2014.

TSAIOUN, K.; KATES, S.A. **ADMET for medicinal chemists: a practical guide**. Wiley, New York, pp 1–28, 2011.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R.A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**. v.147, n.2, p.275–292, 2011.

VASCONCELLOS, M.C.; BEZERRA, D.P.; FONSECA, A.M.; ARAÚJO, A.J.; PESSOA, C.; LEMOS, T.L.G.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; MONTENEGRO, R.C. The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. **Melanoma Research**. v.21, n.2, p.106–114, 2011.

VASCONCELLOS, M.C.; COSTA, C.O.; TERTO, E.G.S.; MOURA, M.A.F.B.; VASCONCELOS, C.C.; ABREU, F.C.; LEMOS, T.L.G.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; GOULART, M.O.F. Electrochemical, spectroscopic and pharmacological approaches toward the understanding of biflorin DNA damage effects. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v.765, p.168–178, 2016.

VASCONCELLOS, M.C.; MONTENEGRO, R.C.; MILITÃO, G.C.G.; FONSECA, A.M.; PESSOA, O.D.L.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Zeitschrift für Naturforschung**.v.60, p.394–398, 2005.

VASCONCELLOS, M.C.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; MACHADO, M.S.; GUECHEVA, T.N.; VILLELA, I.; IMMICH, B.F.; MONTENEGRO, R.C.; FONSECA, A.M.; LEMOS,

T.L.G.; MORAES, M.E.; SAFFI, J.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; HENRIQUES, J. Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1, 4 o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Archives Toxicology**. v.84, p.799–810, 2010.

WALLACE, K.B. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. **Pharmacology and Toxicology**. v.93, n.3, p.105–115, 2003.

WANG, J-R.; SHEN, G-N.; LUO, Y-H.; PIAO, X-J.; ZHANG, Y.; WANG, H.; LI, J-Q.; XU, W-T.; ZHANG, Y.; WANG, S-N.; ZHANG, T.; XUE, H.; CAO, L-K.; JIN, C-H. 2-(4-methoxyphenylthio)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone induces apoptosis via ROS-mediated MAPK and STAT3 signaling pathway in human gastric cancer cells. **Journal of Chemotherapy**. v.31, n.4, p.214–226, 2019.

WISINTAINER, G.G.N.S.; SCOLA, G.; MOURA, S.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SOUZA, L.G.S.; ROESCH-ELY, M.; HENRIQUES, J.A.P. O-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. induces selective cytotoxicity in tumor cell lines. **Genetics and Molecular Research**. v.14, n.4, p.17472–17481, 2015.

YU, H.Y.; KIM, S.O.; JIN, C-Y.; KIM, G-Y.; KIM, W-J.; YOO, Y.H.; CHOI, Y.H. β -lapachone-induced apoptosis of human gastric carcinoma AGS cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K/Akt pathway. **Biomolecules & Therapeutics**. v.22,n.3, p.184–192, 2014.

ZHANG, L.L.; LIN, Z.; JIN, Y.D.; MIN, Z.L.; WEI, C.; WANG, Q.; CHEN, Y.J.; WU, Q.M.; HU, X.M.; YUAN, Q. SIRT2 mediated antitumor effects of Shikonin on metastatic colorectal cancer. *Eur J Pharmacol*. 2017; 797:1–8, 2017.

ZHU, G-J.; SONG, P-P.; ZHOU, H.; SHEN, X-H.; WANG, J-G.; MA, X-F, GU, Y-J.; LIU, D-D.; FENG, A-N.; QIAN, X-Y.; GAO, X. Role of epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin, N-cadherin, β -catenin and ZEB2 in laryngeal squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**. v.15, p.3472–3481, 2018.