

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Isolamento de achyrobichalcona e 3-O-metilquercetina a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides* utilizando cromatografia em contracorrente de alta performance (HPLC) e avaliação do potencial citotóxico *in vitro* em linhagem de câncer de mama MDA-MB-231

SARA ELIS BIANCHI

Porto Alegre, janeiro de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Isolamento de achyrobichalcona e 3-O-metilquercetina a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides* utilizando cromatografia em contracorrente de alta performance (HPLC) e avaliação do potencial citotóxico *in vitro* em linhagem de câncer de mama MDA-MB-231

Tese apresentada por **Sara Elis Bianchi**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTORA
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Klamt

Porto Alegre, janeiro de 2018

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 05.01.2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Sílvia Staniscuaski Guterres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Bianchi, Sara Elis

Isolamento de achyrobichalcona e 3-O-metilquercetina a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides* utilizando cromatografia em contracorrente de alta performance (HPCCC) e avaliação do potencial citotóxico in vitro em linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 / Sara Elis Bianchi. -- 2018.

192 f.

Orientadora: Valquiria Linck Bassani.

Coorientador: Fabio Klamt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. *Achyrobichalcona*. I. Bassani, Valquiria Linck, orient. II. Klamt, Fabio, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico, no Centro de Desenvolvimento Tecnológico e Farmacêutico (CDTF), na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e, durante o doutorado sanduíche no *Laboratory of Applied Biochemistry*, no departamento *Office of Biotechnology Research*, na instituição *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos, com apoio financeiro da CAPES, FAPERGS e CNPq. A aluna cursou doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e recebeu bolsa de estudos da CAPES.

**Dedido este trabalho aos meus pais,
Alzira M. Sandrin Bianchi e Clair Ernesto Bianchi
Fontes eternas de inspiração e força.**

*“Lógica e racionalidade não guiam o coração
humano, embora possam explicar suas paixões.”*

Immanuel Kant

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, professora Valquiria Linck Bassani, pela oportunidade, orientação, dedicação e amizade durante os 6 anos de convivência. Por toda a paciência, ensinamentos que propiciaram meu desenvolvimento intelectual e pessoal e por compreender que a verdadeira orientação não se resume apenas em cobrar resultados, e sim desenvolver o aluno para os novos desafios que surgirão. Pela tranquilidade e confiança em mim depositada mesmo nos momentos difíceis e por todos os conselhos e ensinamentos. À minha eterna orientadora, o meu eterno obrigada de coração.

Agradeço ao meu coorientador Fabio Klamt do Departamento de Bioquímica desta universidade pela colaboração e ajuda na avaliação do potencial citotóxico em linhagens de células tumorais. Fico imensamente grata pelo auxílio e apoio sempre que necessitei.

Aos meus pais, Clair e Alzira, pelas inúmeras ligações, pelo constante incentivo, amor e apoio em todos os momentos. Em especial, por nunca me deixarem desistir, mesmo quando achei que não conseguiria e pelo amor incondicional que sempre tiveram por mim. Ao meu irmão Artur pelo realismo, parceria e amizade. Amo você de coração, pela a força e por sempre acreditar em minha capacidade.

Aos professores Letícia Koester, Helder Teixeira, George Ortega e Pedro Petrovick pelos ensinamentos e amizade.

Às minhas tias, Gelvazia e Carmen, pelas visitas, pelos momentos em família e pela alegria que sempre traziam.

A todos os meus colegas, amigos e parceiros do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, em especial Cristiane, Débora, Juliana Carini, Samuel, Giovanni, Rose, Tainá, Kleyton, Luana, Lucélia, Mariana, Bruna, Simony sem os quais a realização dessa tese teria sido bem mais difícil. A grande amizade das especiais Letícia, Nessa, Duda e Marina que enfrentaram os piores e melhores momentos comigo, pela grata convivência diária que certamente vai deixar saudades e boas recordações.

À Cláudia e à Bárbara, mais que amigas, irmãs e confidentes de todos os momentos.

À Andréia, uma das melhores coisas que me aconteceram durante a graduação, uma grande parceira, divertida, amiga e conselheira.

A todos que de alguma maneira colaboraram, torceram ou incentivaram o meu crescimento durante estes dois anos.

RESUMO

Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Asteraceae, conhecida popularmente como marcela, é uma espécie vegetal estudada sob os mais diversos aspectos, químico, tecnológico e farmacológico, sendo muitas de suas propriedades atribuídas aos constituintes fenólicos presentes na planta. As investigações sobre a composição química de extratos hidroetanólicos das inflorescências de *Achyrocline satureioides* demonstrou a presença dos flavonoides quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-O-metilquercetina (3OMQ), os quais são metabólitos secundários frequentemente relacionados às atividades biológicas. Além desses flavonoides, a achyrobichalcona (ACB) uma bichalcona de estrutura química e ocorrência inéditas foi recentemente identificada na espécie. O primeiro capítulo da tese se refere ao estudo de revisão utilizando metodologias bibliométricas, sobre as produções científicas e tecnológicas referidas na base de dados do Web of Science do Institute for Scientific Information (ISI), pertencente a Thompson-ReutersTM Company envolvendo chalconas para o tratamento do câncer/tumores. O objetivo do estudo foi mapear as publicações científicas e tecnológicas na última década, de 2006 a 2016. As palavras-chave utilizadas foram: chalcona seguida pelo símbolo (*), câncer e tumor. Independentemente da origem destas chalconas, observou-se oportunidades para o desenvolvimento de produtos visando sua vetorização em alvos biológicos para o tratamento do câncer. A etapa seguinte se caracterizou pela obtenção simultânea de frações e substâncias isoladas, bem como a identificação de novos constituintes fenólicos de inflorescências de *Achyrocline satureioides*. Com o intuito de obter elevadas concentrações destas substâncias com o mínimo de interferentes possível, foram realizadas extrações sucessivas com soxhlet (com os solventes hexano, acetato de etila e metanol), seguido por etapas de isolamento e purificação utilizando técnica de cromatografia em contracorrente de alta performance (HPLC). Esta segunda parte do trabalho foi realizado em duas etapas: 1) obtenção de duas frações enriquecidas por meio do fracionamento do extrato; e 2) isolamento de ACB e 3OMQ a partir destas frações enriquecidas. A análise da fração 1 (F₁) revelou a presença de outros flavonoides-agliconas que foram analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de espectrometria de massa quadrupolo de alta definição (UPLC-QTOF/HDMS) e de ressonância magnética nuclear (RMN). Os constituintes foram identificados como canferol, isocanferol, 3,3'-di-O-metilquercetina,

sendo a presença dos dois últimos relatada pela primeira vez em inflorescências da *Achyrocline satureioides*. A ACB e 3OMQ foram obtidas com alto grau de pureza e bom rendimento, a partir da F₁ e F₂, respectivamente, utilizando colunas semi-preparativa e analítica de HPLC. Como resultado, obteve-se ACB e 3OMQ com alta pureza, respectivamente, 98% e 97% (p/p) e excelente rendimento a partir de extrato seco bruto obtido por Soxhlet (69% e 65%, respectivamente), tornando estas substâncias adequadas para uso em estudos de atividade biológica. A etapa seguinte objetivou avaliar comparativamente as propriedades citotóxicas apresentadas pelos isolados, ACB e 3OMQ. Primeiramente, foi avaliado o efeito citotóxico das moléculas isoladas, ACB e 3OMQ, frente a uma linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 e comparada à linhagem celular epitelial primária não transformada MCF-12A. Os resultados demonstraram que a ACB apresentou efeito citotóxico (GI₅₀ 16,68 µM) em relação à linhagem celular MDA-MB-231, com índice de seletividade superior a 2, quando comparado à linhagem MCF-12A. A 3OMQ também apresentou efeito citotóxico (GI₅₀ 43,69 µM) sobre o MDA-MB-231; no entanto, o índice de seletividade foi inferior a 2. Subsequentemente, analisou-se a ativação de caspases nas células MDA-MB-231 por citometria de imagem celular e *Western Blot*. ACB e 3OMQ não ativaram a caspase-8 (mecanismo extrínseco), mas foram capazes de ativar a caspase-3, caspase-7 e caspase-9. Os resultados sugerem que a apoptose na linhagem celular MDA-MB-231 foi induzida por meio de mecanismo intrínseco dependente de caspases. O conjunto de informações obtidas, somadas a maior seletividade demonstram que a ACB é um potente candidato a agente anticâncer.

Palavras-chaves: *Achyrocline satureioides*, Achyrobichalcona, 3-O-Metilquercetina, Isolamento, Cromatografia em Contracorrente de Alta Performance, Anticâncer, Antitumoral.

ABSTRACT

Achyrobichalcona and 3-O-methylquercetin isolation from *Achyrocline satureioides* inflorescences using high-performance countercurrent chromatography (HPCCC) and evaluation of *in vitro* cytotoxic potential in MDA-MB-231 breast cancer

Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Asteraceae, popularly known as marcela, is a plant that has been widely studied in chemical, technological and pharmacological aspects, and became well known for its properties attributed to the phenolic constituents present in the species. The investigations on the chemical composition of hydroethanolic extracts of *Achyrocline satureioides* inflorescences have demonstrated the presence of flavonoids quercetin (QCT), luteolin (LUT) and 3-O-methylquercetin (3OMQ), secondary metabolites often correlated with biological activities. In addition to these flavonoids, the achyrobichalcone (ACB) a bichalcone with chemical structure and occurrence unprecedented was recently identified in the species. The first chapter of the thesis refers to a review study using bibliometric methodologies on the scientific and technological productions referred in the Web of Science database of the Institute for Scientific Information (ISI) belonging to Thompson-Reuters™ Company involving chalcones for the cancer/tumors treatment. The aim of the study was to map the scientific and technological publications in the last decade, from 2006 to 2016. The keywords used were: chalcone followed by the symbol (*), cancer and tumor. Regardless of the origin of these chalcones, there were opportunities for the development of products intended for vectorization in biological targets for cancer treatment. The next stage was characterized by the simultaneous obtaining of fractions and isolated substances, as well as the identification of new phenolic constituents of *Achyrocline satureioides* inflorescences. In order to obtain high concentrations of these substances with as little interfering compounds as possible, successive extractions using soxhlet (with hexane, ethyl acetate and methanol solvents) were carried out followed by isolation and purification steps using high performance countercurrent chromatography (HPCCC). This second part of the work was carried out in two steps: 1) obtaining two enriched fractions through extract fractionation; and 2) isolation of ACB and 3OMQ from these enriched fractions. The analysis of fraction 1 (F₁) revealed the presence of other flavonoids-aglycones that were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high definition quadrupole mass

spectrometry detector (UPLC-QTOF/HDMS) and nuclear magnetic resonance (NMR). The constituents were identified as kaempferol, isokaempferide, 3,3'-di-O-methylquercetin. The presence of the last two were reported for the first time in *Achyrocline satureioides* inflorescences. ACB and 3OMQ were obtained with high purity and good yield, from F₁ and F₂, respectively, using HPLCC semi-preparative and analytical columns. As result, ACB and 3OMQ were obtained with high purity, respectively, 98% and 97% (w/w) and excellent yield from dry extract obtained by sohxlet (69% and 65% respectively), make them available for biological studies. The next step was to evaluate the cytotoxic properties of the isolates, ACB and 3OMQ comparatively. First, the cytotoxic effect of the isolated molecules, ACB and 3OMQ, were evaluated against a MDA-MB-231 breast cancer cell line and compared to an MCF-12A non-transformed primary epithelial cell line. The results showed that the ACB presented a cytotoxic effect (GI₅₀ 16.68 µM) on MDA-MB-231 cell line, with a selectivity index higher than 2 when compared to the MCF-12A. 3OMQ also had a cytotoxic effect (GI₅₀ 43.69 µM) on MDA-MB-231, however, the selectivity index was less than 2. Subsequently, the activation of caspases in MDA-MB-231 cells were analyzed by cell imaging and *Western blot* analysis. ACB and 3OMQ did not activate caspase-8 (extrinsic mechanism) but were able to activate caspase-3, caspase-7 and caspase-9. The results suggest that apoptosis in the MDA-MB-231 cell line was induced by caspase-dependent intrinsic mechanism. The set of information obtained, added to the greater selectivity demonstrate that ACB is a potent candidate as anticancer agent.

Keywords: *Achyrocline satureioides*, Achyrobichalcone, 3-O-methylquercetin, Isolation, High Performance Countercurrent Chromatography, Anticancer, Antitumor.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1.	Principais flavonoides-agliconas e bichalcona presentes em inflorescências de <i>Achyrocline satureioides</i> .	31
Figura 2.	Estrutura química de bichalconas naturais.	34
Figura 3.	Movimento rotacional do equipamento HPCCC.	35

Capítulo I

Figure 1.	General structure of chalcones.	47
Figure 2.	Annual publications (source: database WoS) between 2006 and 2016.	50
Figure 3.	Characteristics on chalcones researches.	52
Figure 4.	Areas of interest on chalcones researches crossed with keywords cancer and tumor.	54
Figure 5.	Areas of interest on chalcones researches crossed with keywords cancer and tumor.	56
Figure 6.	Biosynthetic pathway of chalcones.	60
Figure 7.	Contributive characteristics on chalcones patents.	72

Capítulo II

Graphical Abstract		90
Figure 1.	Achyrobichalcone (ACB), 3-O-methylquercetin (3OMQ), quercetin (QCT) and luteolin (LUT) concentrations in <i>Achyrocline satureioides</i> extraction solution obtained by extraction of the inflorescences with ethyl-acetate, prior extracted with <i>n</i> -hexane, in Soxhlet apparatus.	111
Figure 2.	Chromatographic profiles (HPCCC) of <i>Achyrocline satureioides</i> fractions obtained with detection wavelength at 367 nm by semi-preparative HPCCC method, using a	112

Hex:EtOAc:MeOH:H₂O solvent system, where F₁ is bichalcone fraction and F₂ is flavonoid-aglycones fraction.

- Figure 3.** Chromatographic profiles (HPLC) of *Achyrocline satureioides* fractions (a) bichalcone fraction (F₁), with detection wavelength at 367 nm and (b) flavonoid-aglycones fraction (F₂) with detection wavelength at 362 nm, both obtained by semi-preparative HPLC method, using a Hex:EtOAc:MeOH:H₂O solvent system. (c) Diode array spectra at 200–400 nm of achyrobichalcone (ACB), quercetin (QCT), luteolin (LUT) and 3-O-methylquercetin (3OMQ). 113
- Figure 4.** (a) Unidentified peaks in HPLC analysis of a bichalcone fraction from *Achyrocline satureioides* (F₁) at 367 nm. (b) Diode array spectra at 200–400 nm of the corresponding compounds 1, 2, 3 and 4. 114
- Figure 5.** Chromatographic profiles (HPLC) of (A) ACB obtained from fraction (F₁) and (B) 3OMQ obtained from fraction (F₂), with detection wavelength at 367 nm, using CH₂Cl₂:MeOH:H₂O solvent system. 115

Supplementary Materials

- Figure S1.** ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of compound 1. 117
- Figure S2.** ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) spectrum of compound 1. 118
- Figure S3.** ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) spectrum of compound 3. 119
- Figure S4.** ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) spectrum of compound 3. 120
- Figure S5.** ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) spectrum of compound 4. 121
- Figure S6.** ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) spectrum of compound 4. 122
- Figure S7.** Chromatographic profiles (UPLC) of a bichalcone fraction (F₁). 123
- Figure S8.** ESI⁺ MS^E spectrum of compound 1, 2, 3, and 4. 124
- Figure S9.** ESI⁻ MS^E spectrum of compound 1, 2, 3, and 4. 125

Capítulo III

Figure 1.	Morphological analysis of MDA-MB-231 cell cultured in 96-well plate and treated with 25 μ M ACB and 3OMQ concentrations and 1 μ M of DOX for 24 h.	154
Figure 2.	Growth inhibitions curves after 24 and 48 h.	155
Figure 3.	Time-course PI-stained of (a and b) MDA-MB-231 and (c and d) MCF-12A cells treated with ACB and 3OMQ (10, 25 and 50 μ M).	156
Figure 4.	Early and late apoptotic population obtained in annexin-V/PI analysis after 24 h by flow cytometry of (a and b) MDA-MB-231 and (c and d) MCF-12A cells treated with ACB and 3OMQ (10, 25 and 50 μ M).	157
Figure 5.	Annexin-V/PI analysis after 24 h by flow cytometry of (a) MDA-MB-231 and (b) MCF-12A cells treated with ACB and 3OMQ (10, 25 and 50 μ M).	158
Figure 6.	Caspase 3/7 analysis by Celigo Image Cytometer in MDA-MB-231 cell, after 8 h of treatment with (a) ACB and (b) 3OMQ (10, 25 and 50 μ M). ACB and 3OMQ induce caspase-7 activation in MDA-MB-231 cell.	159
Figure 7.	ACB and 3OMQ did not induce caspase extrinsic pathway in MDA-MB-231 cell. ACB and 3OMQ induce caspase intrinsic pathway in MDA-MB-231 cell.	161
Figure 8.	ACB and 3OMQ induce caspase-3 activation in MDA-MB-231 cell.	163
Figure 9.	ACB and 3OMQ induce PARP activation in MDA-MB-231 cell.	164

Supplementary Materials

Figure S1.	Early and late apoptotic population obtained in annexin-V/PI analysis after 12 h by flow cytometry of (a and b) MDA-MB-231 and (c and d) MCF-12A cells treated with ACB and 3OMQ (10, 25 and 50 μ M).	165
Figure S2.	Annexin-V/PI analysis after 12 h by flow cytometry of (a) MDA-MB-231 and (b) MCF-12A cells treated with ACB and 3OMQ (10, 25 and 50 μ M).	166
Figure S3.	ACB and 3OMQ did not induce conversion of did not induce conversion of LC3-I to LC3-II in MDA-MB-231 cell.	167

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Table 1.	Top 10 studies with the highest citation frequency related to chalcones research crossed with keywords cancer/tumor.	57
Table 2.	Chalcones obtained from plants and reported cytotoxicity/anticancer activity between 2006 and 2016 in scientific publications (database WoS).	63
Table 3.	Studies related to bichalcones research crossed with keywords cancer/tumor.	73

Capítulo II

Table 1.	ACB, 3OMQ, QCT, and LUT concentration in dry extracts obtained from <i>Achyrocline satureioides</i> extraction solutions (Soxhlet apparatus).	99
Table 2.	Partition coefficient (K_D) values for ACB and 3OMQ from <i>Achyrocline satureioides</i> extract (All).	100
Table 3.	Partition coefficient (K_D) values for ACB and 3OMQ obtained respectively, from fraction F ₁ or F ₂ .	101
Table 4.	Characterization of peaks related in <i>Achyrocline satureioides</i> fraction (F ₁) using UPLC-QTOF/HDMS analyses in MS ^E mode.	102

Capítulo III

Table 1.	Values of 50% growth inhibition (GI ₅₀) for MDA-MB-231 and MCF-12A cell lines treated with achyrobichalcone and 3-O-methylquercetin after 48h.	153
-----------------	--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACB – Achyrobichalcone

AP-1 – activator protein-1

DOX – Doxorubicin

EtOAc – ethyl acetate

F₁ – Fraction 1

F₂ – Fraction 2

GI₅₀ – 50% of growth inhibition

Hex – *n*-hexane

HPβCD – hydroxypropyl-beta-cyclodextrin

HPCCC – high performance countercurrent chromatography

HPLC – high performance liquid chromatography

IC₅₀ – Inhibitory Concentration 50%

K_D – Partition Coefficient

LUT – luteolin

MCF-7 – human breast cancer cell line

MCF-12A - primary healthy epithelial non transformed cell

MDA-MB-231 – human breast cancer cell line

MeOH – methanol

NF-κB – nuclear factor bind region of the κB chain of immunoglobulin in B cells

NRF2 – nuclear related factor 2

NMR – nuclear magnetic resonance

3OMQ – 3-O-methylquercetin

PI – Propidium iodide

PPAR-γ – peroxisome proliferator-activated receptor gamma

QCT – quercetin

SI – selectivity index

STAT3 - cytoplasmic signal transducer and activator of transcription 3

UPLC-QTOF/HDMS – ultra-performance liquid chromatography system coupled to a quadrupole time-of-flight with high definition mass spectrometry

SUMÁRIO

Introdução	29
Objetivos	39
Objetivo Geral	41
Objetivos Específicos	41
Capítulo I	43
<hr/>	
Abstract	46
1. Introduction	47
2. Results and Discussion	48
2.1. Chalcones in Scientific and Technological Productions	48
2.2. Articles: Approaches of Chalcones in Cancer	51
2.3. Natural Chalcones	59
2.4. Chalcones obtained by synthesis	68
2.5. Patents: Chalcones and cancer	71
2.6. Bichalcones and anticancer activity	73
3. Materials and Methods	74
3.1. Scientific and technological sources and strategy search	74
3.2. Data collection in anticancer/antitumor activity	74
4. Conclusion	75
5. References	75
Capítulo II	87
<hr/>	
Graphical Abstract	90
Abstract	91
1. Introduction	92
2. Materials and Methods	93
2.1. Plant material, standards and reagents	93
2.2. Extraction of phenolic compounds from the inflorescences	93
2.3. HPLC–PDA Analysis	94
2.4. Determination of Partition Coefficient (K_D) Value	94
2.5. HPLC–PDA Separation	95

2.5.1. Obtaining fractions using semi-preparative HPLC mode	95
2.5.2. 3OMQ and ACB isolating using analytical HPLC mode	96
2.6. Determination of chemical structure of F ₁ constituents	96
2.6.1. Kaempferol (1)	97
2.6.2. Isokaempferide (3)	97
2.6.3. 3,3'-di-O-methylquercetin (4)	97
3. Results and Discussion	98
3.1. Extraction of phenolic compounds from the inflorescences	98
3.2. Partition Coefficient (K_D) Value of ACB and 3OMQ	99
3.3. Semi-Preparative HPLC	101
3.4. Identification of new constituents in F ₁	102
3.5. HPLC on analytical scale for ACB and 3OMQ isolation	103
4. Conclusions	105
5. List of Abbreviations	105
6. Conflict of Interest	106
7. Acknowledgements	106
8. References	106
Supplementary Materials	116
Capítulo III	127
<hr/>	
Graphical Abstract	130
Abstract	131
1. Introduction	132
2. Results and Discussion	133
2.1. Cytotoxicity and cell viability tests	133
2.2. Apoptosis analysis	138
2.3. Live Caspase 3/7 Detection	140
2.4. Both ACB and 3OMQ Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cell through Caspase-Dependent Pathways	140
3. Experimental	143
3.1. Plant material, extraction and isolation	143
3.2. Other chemicals	144
3.3. Cell culture and treatments	144

3.4. Staining protocol and cell viability assay	145
3.5. Image acquisition	146
3.6. Apoptosis measurement by flow cytometry	147
3.7. <i>Western blotting</i> analysis	147
4. Conclusions	148
5. References	148
Discussão Geral	168
Conclusões	181
Referências Bibliográficas	185

APRESENTAÇÃO

A presente tese foi redigida na forma de capítulos, em conformidade com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e encontra-se organizada da seguinte forma:

- Introdução (relevância do tema);
- Objetivos: Geral e Específicos;
- Capítulos 1 a 3: artigos a serem submetidos à publicação;
- Discussão Geral;
- Conclusões;
- Referências.

Introdução

As plantas possuem grande variedade de metabólitos secundários que são responsáveis por diversos efeitos de interesse terapêutico, sendo potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos (HARVEY, 2000; CARPINELLA et al., 2011; TIAN-YE et al., 2011; FLAMM et al., 2012). Neste contexto situa-se *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, espécie pertencente à família Asteraceae nativa do Sul da América e conhecida como “marcela” ou “macela” (SABINI et al., 2012). Diversas propriedades medicinais são atribuídas a esta planta, como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, sedativa, hepatoprotetora, imunomoduladora, antitumoral e fotoprotetora (SIMÕES et al., 1988; HNATYSZYN et al., 2004; POLYDORO et al, 2004; DE SOUZA et al., 2007; SABINI et al., 2012; RETTA et al., 2012).

Dentre os metabólitos secundários presentes em *Achyrocline satureioides* se destacam os flavonoides quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-O-metilquercetina (3OMQ) (SIMÕES et al., 1988; RETTA et al., 2012; CARINI et al, 2014). Em 2010, HOLZSCHUH e colaboradores isolaram da espécie uma bichalcona, denominada achyrobichalcona (ACB). Cinco anos mais tarde, CARINI e colaboradores conseguiram isolar esta bichalcona utilizando cromatografia em contracorrente de alta velocidade, seguida de outras etapas de purificação, obtendo a substância com pureza de 90% (CARINI et al., 2015). A ACB, em especial, apresenta uma estrutura química inédita e ocorrência sem precedentes (Figura 1).

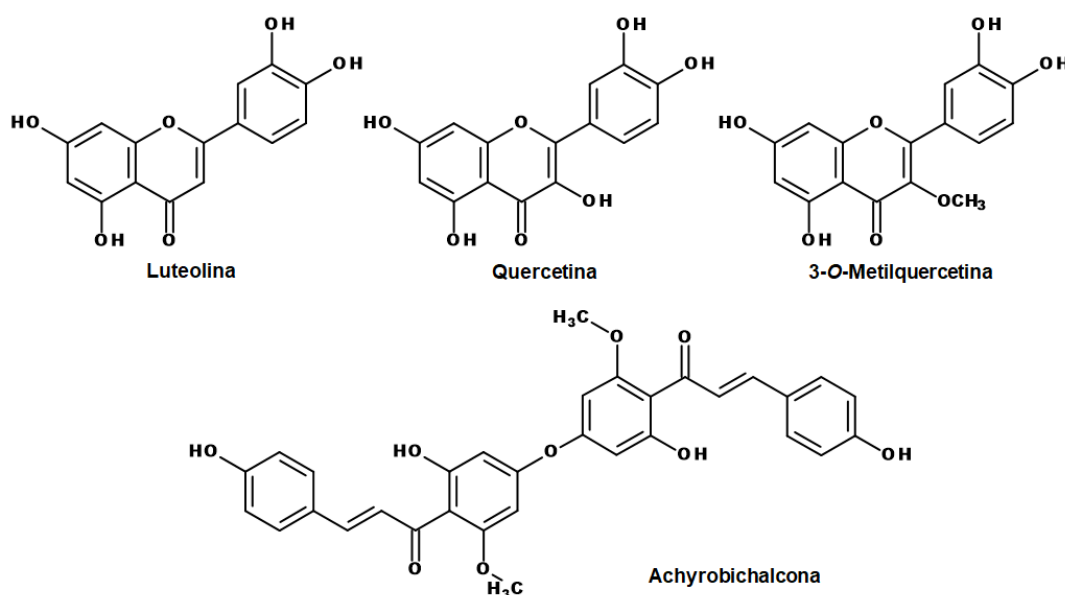


Figura 1. Principais flavonoides-agliconas e bichalcona presentes em inflorescências de *Achyrocline satureioides*.

A 3OMQ (3',4',5,7-tetraidróxi-3-metoxiflavona) é um metoxiflavonoide que representa o flavonoide majoritário presente na espécie cultivada pelo Centro de Pesquisas Agronômicas da Universidade de Campinas (CPQBA-UNICAMP). Este flavonoide difere estruturalmente da QCT pela presença de um grupamento metoxilado no carbono 3 (SCHWINGEL et al., 2008). A conformação molecular e polaridade atribuída a esta O-metilação recebe destaque quanto às atividades antivirais e anticâncer apresentadas pela 3OMQ (VANDEN BERGHE et al., 1993; RUBIO et al., 2006; CARINI et al., 2014). Outros potenciais terapêuticos atribuídos a este flavonoide são: atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, neuroprotetoras, broncodilatadoras, vasodilatadoras, anti-nociceptivas e imunomoduladoras (DOK-GO et al., 2003; HNATYSZYN et al., 2004; KO et al., 2004; SADHU et al., 2006; KÜPELI e YESILADA, 2007).

Biologicamente, as chalconas são precursoras imediatas da rota biossintética de flavonoides (MURAKAMI et al., 1992) e são estudadas em virtude de suas inúmeras propriedades biológicas, dentre elas, atividades antifúngica, anti-hipertensiva, antimicrobiana, antiviral, anti-malária, anti-inflamatória e anticâncer (MOJZIS et al., 2008; ORLIKOVA et al., 2011). De maneira geral, a estrutura básica das chalconas é a 1,3-difenil-2-propen-1-ona, ou seja, dois anéis aromáticos (A e B) contendo uma cetona α,β -insaturados como espaçador. São moléculas não-quirais e ocorrem preferencialmente na forma de agliconas (SIMOKORIYAMA, 1991).

As chalconas são conhecidas por conferirem coloração amarela às pétalas de flores de algumas famílias vegetais, como Asteraceae. Nas plantas, são convertidas em suas correspondentes flavanonas por uma reação estereoespecífica catalizada pela enzima chalcona isomerase. A relação estrutural e biogenética existente entre chalconas e flavanonas explica porque elas frequentemente co-ocorrem em produtos naturais (ANDERESEN e MARKHAM, 2006). As propriedades biológicas descritas para as chalconas incluem propriedades anticâncer, antibióticas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antimaláricas (HAMEED, 2006; HIJOVA, 2006; KATSORI e HADJIPAVLOU-LITINA, 2011; SAHU et al., 2012).

A ACB (4,2',4'',2'''-tetraidróxi-6',6'''-dimetóxi-4'-O-4''''-bichalcona) é uma bichalcona de estrutura semicristalina, coloração amarela intensa e ponto de

fusão de cerca de 141 °C (CARINI et al., 2015). A estrutura monomérica (4,2',4'- triidróxi-6'-metóxi chalcona) dessa chalcona já havia sido descrita para inflorescências de *Achyrocline flaccida* (NORBEDO et al., 1982) e a estrutura monomérica glicosilada em outras plantas, como *Helichrysum calliconum* e *Gnaphalium multiceps*, integrantes da família Asteraceae (MARUYAMA et al., 1974; BOHLMANN e ABRAHAM, 1979).

A literatura destaca algumas chalconas naturais e sintéticas com pronunciada atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagens de células tumorais de mama (CHAUHAN et al., 2014; JANDIAL et al., 2017) e *in vivo* frente a modelo de câncer de mama murino 4T1 modificado (ABU et al., 2015). De maneira geral, os biflavonoides vem demonstrando diversas atividades biológicas, dentre elas, promissoras propriedades antitumor (SUZART et al., 2007; PRADHAN et al., 2009). O subgrupo das bichalconas, por sua vez, tanto de origem natural quanto sintética apresentaram efeito citotóxico em várias linhagens celulares de câncer. As rhuschalconas I-VI (Figura 2), bichalconas isoladas da planta *Rhus pyroides*, foram estudadas frente à linhagens celulares de adenocarcinoma colorretal (HT-29, HCT-116, Colo-205, HCT-15, KM-12 e SW-620) (MASESANE et al., 2000). Dentre elas, a rhuschalcona VI foi notoriamente a substância mais potente se destacando pela atividade anticâncer em outras linhagens de cancer de melanoma SK-MEL-5, SK-MEL-28 e UACC-62 (LC_{50%} = 4,8, 4,6 e 4,6 µg/mL, respectivamente) (MDEE et al., 2003). A luxenchalcona, uma bichalcona isolada de *Luxemburgia octandra*, também apresentou atividade anticâncer frente à várias linhagens celulares de câncer de pulmão (NCI-H460), renal (RXF-393), mama (MCF-7), ovariano (OVCAR-3), colorretal (HT-29) (CARVALHO et al., 2004; DANIEL et al., 2007). Estes resultados promissores demonstram o interesse em explorar as chalconas como moléculas bioativas com potencial atividade anticâncer.

Neste contexto, o conjunto de estudos preliminares sobre a atividade biológica de chalconas e metoxi-flavonoides evidenciam o interesse do isolamento da ACB e 3OMQ a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides* com vistas no aprofundamento das investigações de suas atividades biológicas. ACB, por tratar-se de estrutura química inédita e 3OMQ, pelo fato de ser disponível para aquisição no mercado, mas de alto custo quando de alta pureza. Muito embora a 3OMQ se constitua o componente majoritário

entre os flavonoides-agliconas, seu isolamento dos demais constituintes flavonoídicos e sua purificação tem representado, até o presente, um grande desafio devido à semelhança de sua estrutura química e propriedades físicas e físico-químicas com outras agliconas flavonoídicas como a QCT e LUT presentes na planta (HOLZSCHUH, 2010).

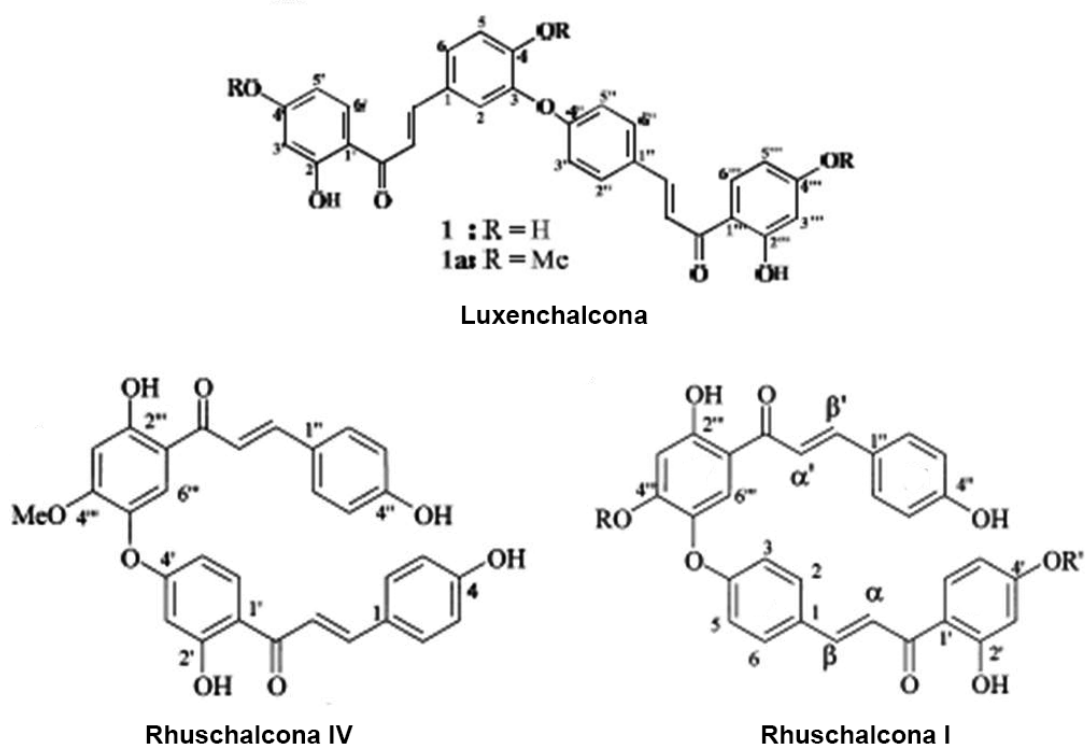


Figura 2. Estrutura química de bichalconas naturais (MASESANE et al., 2000; MDEE et al., 2003; CARVALHO et al., 2004; DANIEL et al., 2007).

Em suma, o isolamento destas substâncias com pureza e alto rendimento tem se constituído uma tarefa difícil envolvendo diversas etapas. Frente a estas dificuldades, a cromatografia em contracorrente (CCC) é uma técnica que tem se destacado devido à rápida e eficiente partição das substâncias de interesse no sistema de solventes empregado e ao reduzido tempo de separação. A técnica consiste na partição líquido-líquido de um soluto entre duas fases imiscíveis contidas numa coluna capilar. A fase estacionária é retida pela força gravitacional e pela força centrífuga, sem a utilização de matriz porosa adsortiva, enquanto a fase móvel passa pela fase estacionária. A distribuição do soluto no sistema bifásico de solventes é determinada pelo coeficiente de partição entre as duas fases imiscíveis (SUTHERLAND, 2007). A CCC vem sendo amplamente utilizada para isolamento em escala preparativa, o que possibilita obter

moléculas em maior escala de maneira altamente preditiva, reprodutível, econômica, versátil e rápida (DUO-LONG et al., 2011).

A nova geração de instrumentos de CCC (Figura 3), os chamados instrumentos de cromatografia de contracorrente de alta performance (do inglês *High Performance Countercurrent Chromatography* - HPCCC), levaram ao renascimento da cromatografia líquido/líquido no século XXI. Esses instrumentos variam desde a escala analítica até preparativa (utilização de quilos de material vegetal, por exemplo), permitindo o aumento do desempenho, reduzindo significativamente os tempos de purificação para minutos (PULJULA & TURHANEN, 2017).

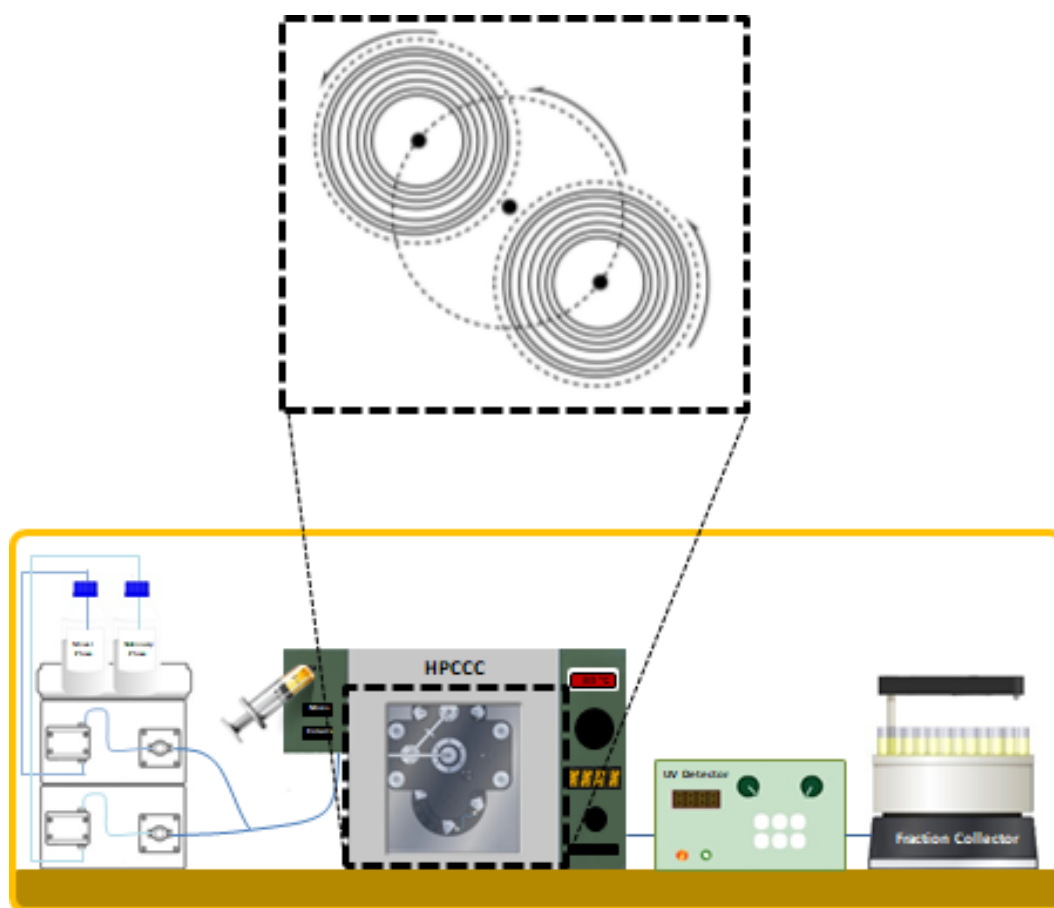


Figura 3. Movimento rotacional do equipamento HPCCC (Adaptado de PULJULA & TURHANEN, 2017).

O potencial antitumoral do extrato hidroetanólico de *Achyrocline satureioides* e de seus flavonoides isolados QCT, LUT, 3OMQ e ACB frente à linhagem humana de câncer de pulmão de não-pequenas células (A549) foi recentemente relatado por CARINI (2013). Os dois constituintes que

apresentaram maior atividade foram 3OMQ e ACB. Esta atividade tem sido também atribuída a outras bichalconas bioativas (MDEE et al., 2003). Tais resultados preliminares motivaram a avaliação da atividade do flavonoide mais ativo e abundante nas inflorescências (3OMQ) e da ACB frente a outra linhagem celular de câncer, no presente trabalho, bem como avaliar o efeito citotóxico em células normais.

O câncer de mama é o câncer mais comum em mulheres em todo o mundo. Cerca de 1,7 milhões de novos casos foram diagnosticados em 2012, representando cerca de 12% de todos os novos casos de câncer e 25% de câncer em mulheres. Com a passagem dos anos, tornou-se a quinta causa mais comum de morte nas mulheres devido à sua alta agressividade (SIEGEL et al., 2014). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres, depois do câncer de pele não melanoma, respondendo por cerca de 28% dos casos novos a cada ano. O câncer de mama também acomete homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença (INCA, 2017). Em geral, os cânceres de mama triplo-negativos, que são aqueles que não exibem expressão de receptores de progesterona, estrogênio e de fator de crescimento epidérmico humano representam 15% dos casos de câncer de mama (HUDIS; GIANNI, 2011; ANDERS; ZAGAR; CAREY, 2013). Um dos cânceres de mama que apresenta essa característica triplo negativa é a linhagem celular humana de câncer de mama MDA-MB-231, que está correlacionada com inúmeros casos de metástases em mulheres, resultando em prognóstico desfavorável (GRIFFITHS; OLIN, 2012). Frequentemente, o câncer de mama tem a capacidade de desenvolver resistência às terapias farmacológicas existentes (HOUSMAN et al., 2014).

Portanto, a crescente prevalência desses cânceres resistentes a fármacos demonstra a necessidade de pesquisa com o intuito de encontrar novos agentes terapêuticos. Este problema é agravado pela resistência desenvolvida pela maioria dos pacientes aos medicamentos quimioterápicos disponíveis e pela alta possibilidade de metástase, reduzindo drasticamente as chances de sobrevivência desses indivíduos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Assim, a busca de novas moléculas com boa atividade anticancerígena é constante, para seu uso isoladamente ou como um adjuvante para o tratamento de células resistentes a

quimioterápicos convencionais, através de mecanismos diferenciados (HOUSMAN et al., 2014).

Os produtos naturais têm desempenhado um papel importante como fonte potencial de terapias anticâncer principalmente por causa de sua diversidade química. Sabe-se também que cerca de 50% dos quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer são provenientes, direta ou indiretamente, de fontes naturais, como plantas, microrganismos e organismos marinhos, evidenciando a importância dos estudos com produtos naturais (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Neste panorama, o presente trabalho visa avançar na investigação da atividade anticâncer de duas substâncias presentes em inflorescências de *Achyrocline satureioides*: ACB e 3OMQ, especialmente, a atividade frente a linhagens celulares de câncer de mama.

Objetivos

Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia de cromatografia contracorrente de alta performance para o isolamento da achyrobichalcona e da 3-O-metilquercetina com alta pureza e rendimento a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides* e avaliação do potencial citotóxico *in vitro* em linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231.

Objetivos específicos

- Realizar análise bibliométrica relativa à investigação da atividade anticâncer/antitumoral de chalconas;
- Otimizar a extração de flavanoides-agliconas e da bichalcona a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides* utilizando extrator do tipo soxhlet;
- Obter frações enriquecidas contendo flavanoides-agliconas e bichalcona por meio da metodologia de cromatografia contracorrente de alta performance;
- Isolar e purificar a achyrobichalcona e a 3-O-metilquercetina por cromatografia em contracorrente de alta performance com elevado grau de pureza e bom rendimento;
- Identificar outros constituintes presentes na fração enriquecida contendo a bichalcona;
- Investigar e comparar a atividade citotóxica *in vitro* para achyrobichalcona e 3-O-metilquercetina frente à linhagem de câncer de mama MDA-MB-231;
- Avaliar comparativamente, *in vitro*, o perfil citotóxico da achyrobichalcona e 3-O-metilquercetina sobre a linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231) e sobre a linhagem celular epitelial normal (MCF-12A);
- Avaliar o índice de seletividade destas moléculas;
- Identificar os principais mecanismos moleculares envolvidos na atividade citotóxica.

Capítulo I

**Scientific and technological potential of chalcones in anticancer activities between
2006 to 2016: a bibliometric analysis**

Bianchi, Sara Elis¹; Klamt, Fabio², Bassani, Valquiria Linck¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Correspondence author: +55-51-33085515, valquiria.bassani@ufrgs.br (V. L. Bassani)

O capítulo I deste trabalho é um artigo científico que se dedicou à análise bibliométrica acerca da atividade anticâncer e antitumoral de chalconas naturais e sintéticas. Na tentativa de entender o papel das chalconas nestas atividades foi realizado um estudo das produções científicas e tecnológicas referidas. Desta maneira, uma perspectiva global da utilização destas moléculas e os principais alvos terapêuticos descritos para esta atividade foi possível. A análise bibliométrica foi realizada utilizando a base de dados do Web of Science do Institute for Scientific Information (ISI), pertencente a Thompson-ReutersTM Company.

O texto completo do Capítulo I, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 45 – 86, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

Capítulo II

Isolation and purification of compounds from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. by an improved high-performance counter-current chromatography method

Bianchi, Sara Elis¹; Kaiser, Samuel¹; Pittol, Vanessa¹; Doneda, Eduarda¹; De Souza, Kellen Cristhina Borges²; Bassani, Valquiria Linck^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

²Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: +55-51-33085243, valquiria.bassani@ufrgs.br (V. L. Bassani). Postal address: Av Ipiranga 2752 CEP 90610-000 - Porto Alegre, Brazil.

O capítulo II descreve a etapa inicial do trabalho que teve como foco o isolamento da ACB e da 3OMQ a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides*. No presente trabalho o método estudou aspectos adicionais como o tempo de extração, bem como o teor de ACB. Na sequência, a metodologia de isolamento e purificação da ACB e da 3OMQ envolvendo apenas HPCCC foi descrita pela primeira vez neste trabalho, mostrando-se eficiente por resultar em produtos com elevado grau de pureza, além de propiciar um elevado rendimento, considerando que apenas dois ciclos de separação são envolvidos, rápido fracionamento e reduzido consumo de solventes orgânicos durante as análises, sendo estes recuperáveis.

O texto completo do Capítulo II, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 89 – 126, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

Capítulo III

Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of achyrobichalcone and 3-O-methylquercetin isolated from *Achyrocline satureioides* on human breast cancer MDA-MB-231 cells and its molecular mechanism

Sara E. Bianchi^a, Eduarda Doneda^a, Vanessa Pitol^a, Fábio Klamt^b, Francesca Mascia^c
Ashutosh Rao^c, Valquiria L. Bassani^{a*}

^aLaboratório de Desenvolvimento Galênico, Faculdade de Farmácia, UFRGS;

^bLaboratório de Bioquímica Celular, ICBS/UFRGS;

^cLaboratory of Applied Biochemistry, Office of Biotechnology Research, FDA.

*Corresponding author: +55-51-33085243, valquiria.bassani@ufrgs.br (V. L. Bassani).

Postal address: Av Ipiranga 2752 CEP 90610-000 - Porto Alegre, Brazil.

No capítulo III deste trabalho foi realizada a avaliação da citotoxicidade da ACB e da 3OMQ *in vitro* em linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231) e dos mecanismos de apoptose envolvidos. Os resultados foram comparados com os obtidos com linhagem celular epitelial normal de mama e foram redigidos no formato de manuscrito a ser submetido à publicação.

O texto completo do Capítulo III, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 129 – 168, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

Discussão Geral

A espécie *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., Asteraceae, popularmente conhecida como “marcela” ou “macela” é uma planta bastante utilizada na medicina popular no Rio Grande do Sul, em infusos digestivos, antiespasmódicos, carminativos, antiinflamatórios, e na redução das taxas sanguíneas de colesterol (SIMÕES et al., 1998; DE SOUZA et al., 2007; MORESCO et al., 2017). Diversas atividades biológicas são descritas para a espécie (RETTA et al., 2012); no entanto, o presente trabalho focou apenas as atividades anticâncer e antitumorais. Recentemente, CARINI e colaboradores (2014), publicaram artigo de revisão comparando os relatos de atividade anticâncer dos flavonoides-agliconos majoritários presentes nas inflorescências, QCT, LUT e 3OMQ.

3OMQ e a ACB são compostos encontrados nas inflorescências de *Achyrocline satureioides* com atividades anticâncer/antitumorais promissoras. ACB, em especial, é uma substância de estrutura química bastante diferenciada, pertencente a um restrito grupo de moléculas de origem natural, denominado bichalconas. Nosso grupo de pesquisa isolou pela primeira vez a ACB (HOLZSCHUH et al., 2010) e também desenvolveu um método para obter esta molécula por cromatografia contra corrente de alta velocidade em escala analítica e semi-preparativa (HSCCC), seguido de etapas de purificação e cristalização (CARINI et al., 2015). No entanto, o isolamento, que resultava na ACB 90% de pureza, envolvia várias etapas de purificação (CARINI et al., 2015) posterior à separação por HSCCC, tais como cromatografia em camada delgada e recristalização. Sendo assim, a realização do presente trabalho teve como objetivo o aprimoramento do isolamento da ACB e purificação em escala semi-preparativa por cromatografia contracorrente de alta performance (HPCCC) com o intuito de alcançar um elevado grau de pureza desta molécula (superior a 98%) em um rápido processo.

Concomitantemente, avaliou-se a possibilidade de isolar por HPCCC a 3OMQ, flavonoide-aglicona majoritário na espécie cultivada em estudo, o qual embora disponível para aquisição no mercado apresenta alto custo, quando em alta pureza. Para esta aglicona tem sido relatados pronunciados efeitos biológicas (DOK-GO et al., 2003; HNATYSZYN et al., 2004; KO et al., 2004; SADHU et al., 2006; KÜPELI e YESILADA, 2007).

No que tange à atividade anticâncer, CARINI (2013), observou efeitos citotóxicos da 3OMQ e ACB *in vitro* em linhagens de câncer pulmão de não pequenas células,

A549 e sobre a linhagem EKVX (mais agressivas). No entanto, a autora não testou a seletividade destas moléculas frente à células normais.

Assim, a confluência dos aspectos supracitados resultou na motivação do presente trabalho, de investigação da atividade anticâncer da 3OMQ e ACB, isoladas por HPLC a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides*, sobre linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 comparando com a suas atividades sobre a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 e determinando o índice de seletividade destas moléculas. Além destes aspectos a identificação dos principais mecanismos moleculares envolvidos na atividade citotóxica foram alvo investigados para a ACB.

O capítulo I dedicou-se à análise bibliométrica acerca da atividade anticâncer e antitumoral de chalconas naturais e sintéticas. Na tentativa de entender o papel das chalconas nestas atividades foi realizado um estudo das produções científicas e tecnológicas referidas. Desta maneira, uma perspectiva global da utilização destas moléculas e os principais alvos terapêuticos descritos para esta atividade foi possível. A análise bibliométrica foi realizada utilizando a base de dados do Web of Science do Institute for Scientific Information (ISI), pertencente a Thompson-Reuters™ Company. O mapeamento dessas produções na última década (de 2006 a 2016) utilizando as palavras-chave chalcona seguida pelo símbolo (*), câncer e tumor demonstrou um crescente número publicações científicas principalmente a partir de 2010. No entanto, a partir de 2007 já se observa interesse na proteção do desenvolvimento tecnológico por meio do depósito de patentes. Prova disto é o crescente número de revisões publicadas em periódicos acerca da atividades biológicas das chalconas, principalmente quanto aos potenciais farmacológicos antimalariais, anti-inflamatórias, anti-infecciosas e anticâncer (SINHA; MEDHI; SEHGAL, 2013; SINGH et al., 2014; MATOS et al., 2015; SHDEBARSCHI et al., 2015).

A fim de avaliar as produções científicas, os documentos foram analisados quanto ao número de publicações, citações e índice-H. Os dados resultantes da pesquisa permitiram observar um número bastante expressivo de trabalhos descritos na literatura, visando avaliar propriedades anticâncer e antitumorais das chalconas, evidenciando a maciça participação deste grupo de metabólitos secundários em processos de inibição de crescimento de células cancerígenas. O manuscrito se mostrou de extrema relevância uma vez que esclareceu os principais alvos terapêuticos já descritos para a atividade antitumoral e anticâncer das chalconas, tais como o fator de ligação nuclear da região da cadeia kB de imunoglobulinas das células

B (NF- κ B), a via de p53, a polimerização da tubulina, ativação de caspases, receptores de morte e das mitocôndrias que participam das vias de apoptose, ciclo celular, dentre outros. Exemplo disso foi o efeito citotóxico apresentado pela chalcona 1,3-difenil-2-propen-1-ona (núcleo fundamental das chalconas) que inibiu a proliferação em linhagem celular de câncer de mama humano (MCF-7 e MDA-MB-231), pela indução de apoptose e bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G2/M. Além disso, a chalcona também desencadeou a sinalização apoptótica mitocondrial aumentando a quantidade de Bax e Bak, reduzindo o nível de Bcl-2 e Bcl-X-L, e posteriormente ativando a caspase-9 em células MCF-7 e MDA-MB-231 (HSU et al., 2006). Sendo assim, foi possível compilar aspectos fundamentais a respeito das propriedades destas moléculas que servem de base para a discussão mais aprofundada dos efeitos biológicos e das perspectivas para os estudos futuros. O trabalho reafirma a importância de produtos naturais na busca por novos agentes anticâncer e destaca a crescente atuação dos metabólitos secundários neste campo.

O capítulo II descreve a etapa inicial do trabalho que teve como foco o isolamento da ACB e da 3OMQ a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides*, com base no método relatado por DE SOUZA (2002) para os flavonoides-agliconas, unicamente. No presente trabalho o método estudou aspectos adicionais como o tempo de extração, bem como o teor de ACB. Os resultados foram descritos e discutidos no formato de manuscrito recentemente submetido ao *Journal of Separation Science*. Inicialmente, um extrato foi obtido a partir de inflorescências da planta dispostas em cartucho e submetidas à extração em soxhlet, extraídas numa relação planta:solvente 1,8:50 (m:v). Uma sequência de três solventes (hexano, acetato de etila e metanol) foram utilizados nesta etapa e quatro tempos de extração foram testados (3, 4, 6 e 8 horas). Os extratos foram obtidos por meio da utilização de solventes com polaridade crescente (hexano, acetato de etila e metanol). No extrato obtido com o solvente hexano não foi observada a presença dos flavonoides-agliconas, tampouco da ACB. Por outro lado, o extrato obtido com acetato de etila, após prévia extração com hexano apresentou as maiores concentrações das substâncias QCT, LUT, 3OMQ, e ACB. No que se refere ao tempo de extração, as maiores concentrações de todas as substâncias de interesse foi obtida em 4 e 6 horas de extração. Tais resultados levaram à seleção das condições para obtenção de extrato para as subseqüentes etapas: acetato de etila como solvente, com prévia extração das inflorescências com hexano, e o tempo de extração de 4 horas. Após evaporação do solvente, as concentrações obtidas no

extrato seco correspondente foram: 6,98% (QCT), 2,33% (LUT), 18,10% (3OMQ) e 3,7% (ACB). Comparativamente, em extratos secos obtidos a partir de macerado hidroetanólico (80% v/v de etanol), por 8 dias, as concentrações encontradas foram: 2,25% (QCT), 1,02% (LUT), 6,66% (3OMQ) and 1,08% (ACB) (CARINI, 2013). Estes resultados demonstram que a utilização do aparelho de soxhlet propiciou extração em maiores quantidades dos constituintes da planta. O desenvolvimento de metodologia utilizando tecnologias verdes com rendimento semelhante está em andamento.

Na sequência, foi desenvolvido método para o isolamento da ACB e 3OMQ, utilizando HPCCC. A vantagem no isolamento de produtos naturais em escala preparativa por esta técnica é a rapidez, reprodutibilidade, economia e versatilidade que oferece. Além disso, há a possibilidade da recuperação de praticamente a totalidade dos constituintes presentes no extrato processado, uma vez que não ocorrem perdas por adsorção irreversível dos componentes na fase estacionária, que é líquida e as frações menos puras coletadas podem ser reprocessadas. Ambas as fases imiscíveis (estacionária e móvel) podem ser bombeadas para fora do sistema ao final da separação (MARSTON e HOSTETTMANN, 2006; PAULI et al., 2008).

Na separação por HPCCC foi obtida em duas etapas. A escolha do sistema de solventes é uma etapa crítica na aplicabilidade da técnica de cromatografia contracorrente. O sistema solvente ideal deve proporcionar retenção adequada da fase estacionária, uma boa separação das substâncias de interesse e otimização do tempo de execução (COSTA e LEITÃO, 2010). Para a partição dos flavonoides das inflorescências de *Achyrocline satureioides* o sistemas bifásicos de solventes hexano:acetato de etila:metanol:água, em diferentes proporções, foram selecionados. Este sistema já havia sido utilizado por CARINI e colaboradores (2015) e é referido no isolamento de diversos flavonoides (COSTA e LEITÃO, 2010). Na primeira etapa o extrato seco obtido em soxhlet utilizando acetato de etila foi dissolvido nas fases (móvel e estacionária) e injetado no HPCCC, gerando duas frações enriquecidas: a fração 1 (F₁) contendo ACB e outros compostos não-identificados e a fração 2 (F₂) contendo os flavonoides-agliconas QCT, LUT e 3OMQ. A separação destas duas frações foi rápida (60 min) e ocorreu num único ciclo. Após eliminação do solvente, F₁ apresentou-se com coloração marrom e consistência semissólida, sendo constituída de ACB e outros constituintes minoritários, não-identificados, mas com comportamento cromatográfico semelhante à ACB. A análise por CLAE revelou a presença de 4 picos bem definidos, além da ACB, com tempos de retenção 5,5, 5,8,

6,3 e 6,7 minutos. Três destes picos já haviam sido observados para os extratos hidroetanólicos da planta (CARINI, 2013) e constituíram-se nas impurezas presentes na ACB isolada pela autora. Com vistas a identificar estes constituintes, os mesmos foram isolados por HPLC e submetidos a análises por ressonância magnética nuclear de carbono-13 e hidrogênio-1 (^1H , $^1\text{H-COSY}$, ^{13}C , $^{13}\text{C APT}$, $^1\text{H}/^{13}\text{C HSQC}$, $^1\text{H}/^{13}\text{C-HMBC}$) e espectrometria de massas (UPLC-QTOF/HDMS). A primeira substância a ser identificada, tempo de retenção de 5,5 minutos, foi o canferol, cuja quantificação nas inflorescências da planta foi recentemente relatada (SALQUEIRO et al, 2016). As outras duas substâncias foram identificadas como isocanferol e 3,3'-di-O-metilquercetina, sendo suas ocorrências citadas pela primeira vez para inflorescências de *Achyrocline satureioides*. A quarta substância trata-se, provavelmente, de poriol, no entanto, a confirmação da sua identidade não foi possível por meio das técnicas de RMN de ^{13}C , $^{13}\text{C APT}$, $^1\text{H}/^{13}\text{C HSQC}$, $^1\text{H}/^{13}\text{C-HMBC}$, devido a sua baixa concentração na planta.

Na etapa seguinte, as frações (F_1 e F_2) foram submetidas, separadamente, a uma segunda separação por HPLC, utilizando outro sistema de solventes. Vários sistemas foram testados com o intuito de purificar a ACB presente na F_1 e a 3OMQ presente na F_2 . O sistema bifásico composto por diclorometano:metanol:água (3,5:3,5:2,5, v/v) foi o que apresentou o melhor perfil de separação dos constituintes das duas frações, resultando no isolamento das moléculas de interesse. Por meio de um único ciclo a ACB foi obtida com 98% de pureza, no seu estado sólido semicristalino, apresentando coloração amarela, numa disposição dos cristais que lembrava as inflorescências da planta. A 3OMQ, por sua vez, apresentou 97% de pureza, coloração amarela bem menos intensa e estado sólido semicristalino. A obtenção das duas substâncias na forma cristalina, sem necessidade de etapas de cristalização revela-se como uma grande vantagem da técnica de HPLC.

A metodologia de isolamento e purificação da ACB e da 3OMQ envolvendo apenas HPLC está sendo descrita pela primeira vez neste trabalho, mostrando-se eficiente por resultar em produtos com elevado grau de pureza (acima de 97%), além de propiciar um elevado rendimento (mais de 65%) considerando que apenas dois ciclos de separação são envolvidos, rápido fracionamento e reduzido consumo de solventes orgânicos durante as análises, sendo estes recuperáveis. Em suma, o capítulo II demonstra a versatilidade do método de HPLC para a obtenção de diferentes produtos a partir de extrato de *Achyrocline satureioides*. Foi possível obter

frações enriquecidas (F₁ e F₂) e substâncias isoladas (ACB e 3OMQ) que se configuram como candidatos para os estudos da atividade anticâncer.

Além da ocorrência em *Achyrocline satureioides*, há relatos da presença de bichalconas em outras espécies vegetais como é o caso da luxenchalcone presente nas folhas de *Luxemburgia octandra* (CARVALHO et al., 2004) e as rhuschalconas I-VI presentes nos galhos de *Rhus pyroides* (MASESANE et al., 2000). Destaca-se particularmente a semelhança estrutural da ACB com essas bichalconas naturais, as quais se mostraram bastante citotóxicas frente a linhagens de células tumorais (CARVALHO et al., 2004; DANIEL et al., 2007; MASESANE et al., 2000; MDEE et al., 2003). Além disso, há relatos de propriedades anticâncer também para bichalconas sintéticas (LIN et al. 2014; LIN, CHEN & WU, 2015). LIN e colaboradores (2014), analisaram o efeito citotóxico da bichalcona sintética TSWU-CD4 em linhagens celulares de carcinoma de nasofaringe humano (NPC-TW 039) e demonstraram que o tratamento induziu apoptose mesmo quando concentrações baixas foram utilizadas (IC₅₀ = 2,5 µM). Na mesma linha de pesquisa, LIN, CHEN & WU (2015) avaliaram a atividade anticâncer da TSWU-BR23, outra bichalcona sintética, em linhagens celulares de câncer de cólon humano (HT-29) e observaram que houve indução de apoptose nas células mediada pela oligomerização mitocondrial de p53.

No capítulo III deste trabalho foi realizada a avaliação da citotoxicidade da ACB e da 3OMQ *in vitro* em linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231) e dos mecanismos de apoptose envolvidos. Os resultados foram comparados com os obtidos com linhagem celular epitelial normal de mama e foram redigidos no formato de manuscrito a ser submetido à publicação no periódico *Natural Product Reports*.

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente em mulheres, atrás apenas do câncer de pele, com cerca 1,7 milhão de novos casos por ano. É considerada a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres no mundo. Caracteriza-se como uma doença heterogênea que pode ter diferentes manifestações clínicas e morfológicas, diferentes perfis genéticos e principalmente respostas terapêuticas distintas. As anormalidades podem estar presentes nos lóbulos e ductos da mama que incluem hiperplasia, hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. Este último, é o tipo histológico que compreende entre 80 e 90% do total de casos (GLOBOCAN, 2012). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a taxa de mortalidade por câncer de mama na população mundial apresenta uma curva ascendente e representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina

brasileira, sendo as regiões sudeste e sul as que apresentam as maiores taxas (14,21 e 14,60 óbitos/100.000 mulheres em 2014, respectivamente) (INCA, 2017).

A linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 é um tipo histológico que apresenta característica triplo negativa, ou seja, não expressão de receptor para estrogênio, para progesterona e para o fator de crescimento epidérmico humano. Este fenômeno está correlacionado com inúmeros casos de metástases em mulheres e autofagia, resultando em prognóstico desfavorável (GRIFFITHS; OLIN, 2012). Destaca-se também, que frequentemente o câncer de mama tem a capacidade de desenvolver resistência às terapias farmacológicas existentes (HOUSMAN et al., 2014).

Estudos realizados por CARINI (2013) revelaram o potencial citotóxico da ACB e dos demais flavonóides presentes no extrato hidroetanólico da planta *Achyrocline satureioides*. Os valores de GI_{50} encontrados para os flavonóides frente à linhagem celular de câncer de pulmão de não pequenas células (A549) obedeceram à seguinte ordem de atividade: 3OMQ (7,3 μ M) > ACB (13,5 μ M) > LUT (14,6 μ M) > QCT (51,1 μ M). A 3OMQ foi a molécula mais ativa, seguido pela da ACB. Adicionalmente, a ACB foi avaliada frente a outras linhagens celulares de câncer de pulmão de não pequenas células: H460 e EKVX, células com baixo e alto grau de agressividade, respectivamente, ao passo que a A549 é uma linhagem de média agressividade. Os GI_{50} para estas células foram próximos ao valor encontrado para a A549. A atividade citotóxica da ACB frente a linhagens de células de câncer de pulmão se mostrou bastante relevante, especialmente para a EKVX (GI_{50} 11,0 μ M), pois o valor de GI_{50} encontrado foi próximo ao da cisplatina (GI_{50} 9,0 μ M) (CARINI, 2013).

A atividade anticancer da 3OMQ já avaliada em linhagens celulares de câncer de mama, como nas SK-Br-3 sensíveis ao lapatinib (LAP) e SK-Br-3-Lap resistentes. A 3OMQ (10 μ M) causou inibição do crescimento com parada na fase G2/M (LI et al., 2013). O mesmo comportamento foi apresentado para a 3OMQ isolado da planta *Inula viscosa* em linhagens celulares de câncer de mama MCF-7, que apresentaram atividade antiproliferativa ($IC_{50\%}$ 11,23 mg/mL), com indução de apoptose e fragmentação de DNA (TALIB; ZARGA; MAHASNEH, 2012). O resultado de GI_{50} observado neste trabalho para ACB frente à linhagem celular de câncer de mama (GI_{50} 16,7 μ M), foi bastante similar ao encontrado para a linhagem celular de câncer de pulmão de não pequenas células (GI_{50} 13,5 μ M). Contudo, a 3OMQ não apresentou efeito citotóxico semelhante frente a linhagens de frente à linhagem celular de câncer

de mama (GI₅₀ 43,7 µM), quando comparado à linhagem celular de câncer de pulmão de não pequenas células (GI₅₀ 7,3 µM) (CARINI, 2013).

Estudos referentes ao tipo de morte induzida pela ACB e 3OMQ e alguns mecanismos moleculares envolvidos no processo também foram identificados no trabalho. Resultados baseados na citometria de fluxo indicaram que o processo de morte celular foi mediado por apoptose, para ambas as amostras. Este é o mecanismo de morte celular desejável, uma vez que indica que a mesma foi realizada de modo programado, através de estratégias pré-estabelecidas que são utilizadas no intuito de atingir mediadores celulares específicos envolvidos no processo (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003). Subsequentemente, analisou-se a ativação de caspases nas células MDA-MB-231 por citometria de imagem celular e *Western Blot*. Dentre os achados, observou-se que ACB e 3OMQ não ativaram caspase-8 (mecanismo extrínseco), mas foram capazes de ativar caspase-3, caspase-7 e caspase-9. O estudo apontou que a morte celular induzida por ACB e 3OMQ foi ativada pela via intrínseca, ou seja, receptores da mitocôndria são ativados e posteriormente induzem a ativação da cascata apoptótica dentro das células, culminando na morte celular.

Recentemente, Bassani et al. (2016) solicitaram depósito de patente junto ao INPI (BR 10 2016 027068 5), relativa aos resultados promissores de atividade anticâncer da ACB, associada ou não a outros constituintes da planta, especialmente frente a linhagens de células de câncer de pulmão (A549, EKVX e H460); à testes preliminares de atividade frente a linhagem de melanoma (linhagem A375) (CARINI, 2013); e frente a linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231), cujos resultados foram obtidos no âmbito desta tese de doutorado.

Os resultados *in vitro* revelam os excelentes efeitos anti-proliferativos e indutores de apoptose da ACB e da 3OMQ na linhagem celular de câncer de mama humano (MDA-MB-231). Portanto, o presente trabalho abordou temas extremamente relevantes em relação ao protagonismo tanto da ACB quanto da 3OMQ como promissores agentes antitumorais, embora estudos mais aprofundados dos mecanismos envolvidos, além de estudos *in vivo*, devam ser realizados para classificá-los como novos candidatos a quimioterápicos ou agentes quimiopreventivos. O trabalho também demonstra, especialmente o potencial da ACB a candidato a agente anticâncer, por ser viável seu isolamento em maior escala, por sua atividade

frente a células de câncer de mama e pulmão e devido a sua alta seletividade quando comparado à células epiteliais primárias não transformadas.

Conclusões

- As chalconas pertencem a uma classe de moléculas com crescente número de publicações científicas e de registro de propriedade industrial (patentes) relacionadas com o seu potencial para o tratamento de câncer/tumor, especialmente a partir de 2007.

- Os resultados de artigos e patentes depositadas durante a última década (2006 a 2016) mostraram que as chalconas, tanto naturais como sintética, são alvo de interesse e proteção da propriedade industrial de produtos ou processos.

- Nos anos de 2014 à 2016 houve um aumento no número de artigos publicados. O número de patentes também foi maior. Os dados indicam os avanços crescentes na investigação de chalcones contra o câncer/tumor.

- A ampla utilização das chalconas, nos artigos e patentes pesquisados, demonstraram a possibilidade da utilização destas moléculas em diferentes alvos terapêuticos, com o intuito de avaliar os mecanismos celulares na atividade anticâncer/antitumoral, além de possibilitar o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos;

- Duas frações enriquecidas foram obtidas a partir do extrato das inflorescências de *Achyrocline satureioides* utilizando um método em escala semi-preparativa por cromatografia em contracorrente de alta performance num único ciclo de 60 minutos de fracionamento: a fração 1 (F₁) contendo ACB (59,8%) e outros constituintes (28,46%); e a fração 2 (F₂) contendo majoritariamente 3OMQ (46,0%) e os flavonoides-agliconas QCT (19,6%), LUT (6,2%).

- A fração F₁ contém majoritariamente ACB, mas outros flavonoides-agliconas, estão presentes em menores concentrações. A identidade dos flavonoides-agliconas foi avaliada por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de espectrometria de massa quadrupolo de alta definição (UPLC-QTOF/HDMS) e de ressonância magnética nuclear (RMN). Os constituintes identificados foram o canferol, isocanferol, 3,3'-di-O-metilquercetina, sendo a ocorrência dos dois últimos relatados pela primeira vez em inflorescências da *Achyrocline satureioides*.

- A ACB e a 3OMQ foram isoladas, respectivamente, a partir de F₁ e F₂ utilizando cromatografia em contracorrente de alta performance, no modo analítico e em um único ciclo. ACB e 3OMQ foram obtidas com alto grau de pureza, respectivamente, 98% e 97%, de forma rápida (75 minutos para ACB e 45 minutos para 3OMQ), com muito bom rendimento nesta etapa (67% para ACB e 65% para 3OMQ). Estes

resultados denotam a eficiência e versatilidade do método empregado para o isolamento das substâncias de interesse.

- A ACB apresentou o maior efeito citotóxico em relação à linhagem celular MDA-MB-231 (GI_{50} 16,7 μ M), e um índice de seletividade superior a 2 em relação à linhagem de células normais de epitélio de mama MCF-12A. A 3OMQ apresentou a menor efeito citotoxicidade (GI_{50} 43,7 μ M) e índice de seletividade inferior a 2. Em suma, frente à linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 a ACB, demonstrou ser mais ativa e mais seletiva que a 3OMQ.

- ACB e 3OMQ induziram a morte celular na linhagem MDA-MB-231 mediante a ativação da apoptose. O mecanismo molecular envolvido no processo foi o intrínseco (mitocondrial), através da ativação das caspase-9, caspase-3 e caspase-7.

- Em seu conjunto, os resultados do presente trabalho abrem perspectivas para o aprofundamento da investigação do potencial anticâncer de mama da ACB, devido sua alta atividade e seletividade, mas também pelo fato de poder ser isolada com alta pureza para os testes biológicos, a partir das inflorescências.

Referências Bibliográficas

ABU, N.; MOHAMED, N.E.; YEAP, S.K.; LIM, K.L.; AKHTAR, M.N.; ZULFADLI, A.J.; KEE, B.B.; ABDULLAH, M.P.; OMAR, A.R.; ALITHEEN, N.B. *In Vivo* Anti-Tumor Effects of Flavokawain A in 4T1 Breast Cancer Cell-Challenged Mice. **Anticancer Agents Med Chem.**, v. 15, p. 905–915, 2015.

ANDERS, C.K.; ZAGAR, T.M.; CAREY, L.A. The Management of Early-Stage and Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Review. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 737–749, 2013.

BOHLMANN, F.; ABRAHAM, W. Neue diterpene und weitere inhaltsstoffe aus *Helichrysum calliconum* und *Helichrysum heterolasium*. **Phytochemistry**, v.18, p.889-891, 1979.

CARINI, J. P. **Achyrobichalcona obtida a partir de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae: Isolamento, Caracterização, Complexação com Ciclodextrina e Avaliação da Atividade Antitumoral.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. 2013. Tese de doutorado.

CARINI, J. P.; KAISER, S.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L. Development, optimization and validation of a stability-indicating HPLC method of achyrobichalcone quantification using experimental designs. **Phytochem Anal.**, v. 24, v. 193-200, 2013.

CARINI, J. P.; KLAMT, F.; BASSANI, V. L. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. **RSC Adv.**, v. 4, p. 3131-3144, 2014.

CARINI, J.P. et al. Isolation of Achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by High-Speed Countercurrent Chromatography. **Curr Pharm Biotechnol.**, v. 16, p. 66-71, 2015.

CARPINELLA, M.C.; CARPINELLA, L.; DE BELLIS, M.B.; JORAY, V.; SOSA, P.M.; ZUNINO, S.M.; PALACIOS. Inhibition of development, swarming differentiation and virulence factors in *Proteus mirabilis* by an extract of *Lithrea molleoides* and its active principle (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol. **Phytomedicine**, v. 18, p. 994–997, 2011.

CARVALHO, M. G.; ALVES, C. C. F.; SILVA, K. G. S.; EBERLIN, M. N.; WERLE, A. A. Luxenchalcone, a new bichalcone and other constituents from *Luxemburgia octandra*. **J Braz Chem Soc.**, v.15, p.146-149, 2004.

CHAUHAN, S.S.; SINGH, A.K.; MEENA, S.; LOHANI, M.; SINGH, A.; ARYA, R.K.; CHERUVU, S.H.; SARKAR, J.; GAYEN, J.R.; DATTA, D.; CHAUHAN, P.M.S. Synthesis of novel β -carboline based chalcones with high cytotoxic activity against breast cancer cells. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 24, n.13, p. 2820-2824, 2014.

COSTA, F. Das Neves, LEITÃO, G. G. Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. **J. Sep. Sci.** v.33, p. 336-347, 2010.

DANIEL, J. F. S.; ALVES, C. C. F.; GRIVICICH, I.; ROCHAI, A. B.; CARVALHO, M. G. Antitumor activity of biflavonoids from *Ouratea* and *Luxemburgia* on human cancer cell lines. **Indian J Pharmacol.**, v. 39, p.184-188, 2007.

DE SOUZA, K. C. B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 28, p. 771-777, 2002.

DE SOUZA, K. C. B. **Avaliação biológica de preparações obtidas a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. (Marcela)**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. 2002. Tese de doutorado.

DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, p. 102-108, 2007.

DIAS, D. A.; URBAN, S., ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 16, n. 2, p. 303-36, 2012.

DOK-GO, H.; LEE, K.H.; KIM, H.J.; LEE, E.H.; LEE, J.; SONG, Y.S.; LEE, Y.H.; JIN, C.; LEE, Y.S.; CHO, J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Brain Res.**, v. 965, p. 130–136, 2003.

DUO-LONG, D.; YUAN-YUAN, Z.; XIAO-FEN, C.; XIN-YI, H.; SHI-LAN, F. Advances in application of high-speed countercurrent chromatography in separation and purification of flavonoids. **Chinese J Anal Chem.**, v. 39, p. 269-275, 2011.

FLAMM, R.K.; SADER, H.S.; FARRELL, D.J.; JONES, R.N. Summary of ceftaroline activity against pathogens in the United States, 2010: report from the Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance Evaluation (AWARE) Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chem.**, v. 56, p. 2933–2940, 2012.

GRIFFITHS, Carrie L.; OLIN, Jacqueline L. Triple negative breast cancer: a brief review of its characteristics and treatment options. **J Pharm Practice**, United States, v. 25, n. 3, p. 319–323, 2012.

GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M. I.; TOMS-BARBERN, F. A.; FERRERES, F. Influence of industrial processing on orange juice flavanone solubility and transformation to chalcones under gastrointestinal conditions. **J Agric Food. Chem.**, v. 51, p. 3024-3028, 2003.

HAMEED, S. A. Electronic structure of some chalcone derivatives. 1. Ground state geometric parameters and charge density distributions, AM1-MO treatment. **JKAU: Science**, v.18, p.13-25, 2006.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discov Today**. v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HIJOVA, E. Bioavailability of chalcones. **Bratisl Lek Listy**, v. 107, p. 80-84, 2006.

HNATYSZYN, O.; MOSCATELLI, V.; RONDINA, R.; COSTA, M.; ARRANZ,C.; BALASZCZUCK A.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of guinea pig corpus cavernosum. **Phytomedicine**, v. 11, p. 366-369, 2004.

HOLZSCHUH, M. H., GOSMANN, G., SCHNEIDER, P. H., SCHAPOVAL, E. E. S., BASSANI, V. L. Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder. **Pharmazie**, v. 65, p. 650-656, 2010.

HOUSMAN, Genevieve et al. **Drug Resistance in Cancer: An Overview**, 2014.

HSU, Y. L. et al. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 704–713, 2006.

HUDIS, C.A.; GIANNI, L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. **The oncologist**, United States, v. 16 Suppl 1, p. 1–11, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Atlas da Mortalidade. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>. Acesso em: 11/11/2017.

JANDIAL, D.D.; KRILL, L.S.; CHEN, L.; WU, C.; KE, Y.; XIE, J.; HOANG, B.H.,; ZI, X. Induction of G2M Arrest by Flavokawain A, a Kava Chalcone, Increases the Responsiveness of HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells to Herceptin. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 462-475, 2017.

KATSORI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Recent progress in therapeutic applications of chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 21, p. 1575-1596, 2011.

KO, W.C.; SHIH, C.M.; CHEN, M.C.; LAY, Y.H.; CHEN, J.H.; LIN, C.N. Suppressive effects of 3-O-methylquercetin on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. **Planta Med.**, v.70, n.12, p. 1123–1127, 2004.

KÜPELI, E.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. **J Ethnopharmacol.**, v.112, p. 524–530, 2007.

LI, J. et al. Quercetin-3-methyl ether inhibits lapatinib-sensitive and -resistant breast cancer cell growth by inducing G2/M arrest and apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 52, n. 2, p. 134–143, 2013.

LIN, M.L.; CHEN, S.S.; HUANG, R.Y.; LU, Y.C.; LIAO, Y.R; REDDY, M.V.; LEE, C.C.; WU, T.S. Suppression of PI3K/Akt signaling by synthetic bichalcone analog TSWU-CD4 induces ER stress- and Bax/Bak-mediated apoptosis of cancer cells. **Apoptosis**. v. 19, n. 11, p. 1637-53, 2014.

LIN, M.L., CHEN, S.S.; WU, T.S. Synthetic Bichalcone TSWU-BR23 Induces Apoptosis of Human Colon Cancer HT-29 Cells by p53-Mediated Mitochondrial Oligomerization of BAX/BAK and Lipid Raft Localization of CD95/FADD. **Anticancer Res.**, v. 35, n. 10, p. 5407-16, 2015.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **J Chrom A**, v. 1112, p. 181-194, 2006.

MARUYAMA, M.; HAYSAKA, K.; SASAKI, S. A new chalcone glucoside from *Gnaphalium multiceps*. **Phytochemistry**, v.13, p.286-288, 1974.

MASESANE, I.B.; YEBOAH, S.O.; LIEBSCHER, J.; MÜGGE, C.; ABEGAZ, B.M.; A bichalcone from the twigs of *Rhus pyroides*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, p. 1005-8, 2000.

MDEE, L. K.; YEBOAH, S. O.; ABEGAZ, B. M. Rhuschalcones II-VI, five new bichalcones from root bark of *Rhus pyroides*. **J Nat Prod.**, v.66, p.559-604, 2003.

MOLECULAR PROBES™ HANDBOOK, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Assays for Cell Viability, Proliferation and Function, 2010.

MURAKAMI, A.; TANAKA, S.; OHIGASHI, H.; HIROTA, M.; IRIE, R.; TAKEDA, N.; TATEMATSU, A.; KOSHIMIZU, K. Possible anti-tumour promoters: bi- and tetraflavonoids from *Lophira alata*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 2689-2693, 1992.

MOJZIS, J.; VARINSKA, L.; MOJZISOVA, G.; KOSTOVA, I.; MIROSSAY, L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. **Pharmacol Res.**, v.57, p.259-265, 2008.

MOKRINI, R.; TROUILLAS, P.; KAOUADJI, M.; CHAMPAVIER, Y.; HOUÉE-LÉVIN, C.; CALLISTE, C.; DUROUX, J. Radiolytic transformation of 2,2',4'-trihydrochalcone. **Radiation Research**, v. 165, p. 730-740, 2006.

MORESCO, K. S. et al. Supplementation with *Achyrocline satureioides* Inflorescence Extracts to Pregnant and Breastfeeding Rats Induces Tissue-Specific Changes in Enzymatic Activity and Lower Neonatal Survival. **Biomedicines**, v. 5, n. 3, 2017.

NORBEDO, C.; FERRARO, G.; COUSSIO, J. D. A new flavanone from *Achyrocline flaccida*. **J Nat Prod.**, v.45, p.635-636, 1982.

ORLIKOVA, B.; TASDEMIR, D.; GOLLAIS, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes Nutr.** v. 6, p. 125-147, 2011.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calciumapoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 552-65, 2003.

PAULI, G. F., PRO, S. M., FRIESEN, J. B. Countercurrent separation of natural products. **J Nat Prod.**, v. 71, p. 1489-1508, 2008.

PRADHAN, D.; PANDA, P.K.; TRIPATHY, G.; NAYAK, J. R.; PATTANAYAK, A. Anticancer activity of biflavonoids from *Lonicera japonica* and *Benincasa hispida* on human cancer cell lines. **J Pharm Res.**, v. 2, p. 5, p.983-985, 2009.

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOLA, F.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, v. 74, p. 2815-2826, 2004.

PULJULA, E. & TURHANEN, P.A. Semi-preparative high-performance countercurrent chromatography method for the purification of chemically synthesized ATP analogue, Appl. **J Chrom B.**, v. 1063, p. 180-182, 2017.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S. A.; BANDONI, A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. **Ind Crops Prod.**, v. 38, p. 27-38, 2012.

RUBIO, S.; QUINTANA, J.; LÓPEZ, M.; EIROA, J.; TRIANA, J.; ESTÉVEZ F. Phenylbenzopyrones structure–activity studies identify betuletol derivatives as potential antitumoral agents. **Eur J Pharmacol.**, v. 548 , p. 9–20, 2006.

SABINI, M. C.; ESCOBAR, F. M.; TONN, C. E.; ZANON, S. M.; CONTIGIANI, M. S.; SABINI, L. I. Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *Achyrocline satureioides* against Western equine encephalitis virus. **Nat Prod Res.**, v. 26, p. 405-415, 2012.

SADHU, S.K.; OKUYAMA, E.; FUJIMOTO, H.; ISHIBASHI, M.; YESILADA E. Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. **J Ethnopharmacol.**, v.108, n.3, p. 371–378, 2006.

SAHU, N. K.; BALBHADRA, S. S.; CHOUDHARY, J.; KOHLI, D. V. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. **Curr Med Chem.**, v. 19, p. 209-225, 2012.

SALGUEIRO, A. C. F. *et al.* In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. **J. Ethnopharmacol.** v. 194, p. 6-14, 2016.

SCHWINGEL, L.; FASOLO, D.; HOLZSCHUH, M.; LULA, I.; SINISTERRA, R.; KOESTER, L.; TEIXEIRA H.; BASSANI, V. L. Association of 3-O-methylquercetin with β -cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies. **J Incl Phenom Macrocycl Chem.**, v. 62, p. 149-159, 2008.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, United States, v. 64, n. 1, p. 9–29, 2014.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 281-293, 1988.

SIMÕES, C. M. O; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. F.; STEHMANN, J. R. Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul. In: ***Achyrocline satureioides***. 5.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade. Federal do Rio Grande do Sul, 1998. p. 108-109.

SIMOKORIYAMA, M. **Flavonoid: Plant pigments**. Hayashi K, ed. Yohkendo, Tokyo, p. 12-22, 1991.

SUTHERLAND, I. A. Recent progress on the industrial scale-up of countercurrent chromatography. **J Chromatogr A.**, v. 1151, p. 6-13, 2007.

SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. S.; CARVALHO, M. G. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxenburgia* (Ochnaceae). **Química Nova**, v. 30, p. 948-987, 2007.

TAKAHASHI, M.; TAKARA, K.; TOYOZATO, T.; WADA, K. A novel bioactive chalcone of *Morus australis* inhibits tyrosinase activity and melanin biosynthesis in B16 melanoma cells. **J Oleo Sci.**, v. 61, n. 10, p. 585-592, 2012.

TALIB, W.H.; ZARGA, M.H.A.; MAHASNEH, A.M. Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula viscosa*. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3291–3303, 2012.

TIAN-YE, G.; YAN, L.; CHUN-ZHU, L.; LIN, X.; GUANG-JI, W.; LONG-SHENG, S. Recent development in liquid chromatography/mass spectrometry and allied topics for traditional Chinese medicine research. **Chin J Nat Med**. v. 9: 385–400, 2011.

VANDEN BERGHE, D.A.R.; HAEMERS, A.; VLIETINCK, A.J. Antiviral agents from higher plants and an example of structure–activity relationship of 3-methoxyflavones. S.M. Colegate, R.J. Molyneux (Eds.), In: **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination**. CRC Press, London, cap17, p. 405–440, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Agency for Research on Cancer**. Globocan 2012.