

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E ANTICÂNCER  
DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE  
*STRYPHNODENDRON ADSTRINGENS***

DEBORA DA SILVA BALDIVIA  
DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

DOURADOS  
MS - BRASIL  
2018

DEBORA DA SILVA BALDIVIA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E ANTICÂNCER  
DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE  
*STRYPHNODENDRON ADSTRINGENS***

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, para obtenção do título de doutora em Biotecnologia e Biodiversidade.

DOURADOS

MS - BRASIL

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

B177a Baldivia, Debora Da Silva

Avaliação das propriedades antioxidante e anticâncer do extrato aquoso da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens* / Débora Da Silva Baldivia -- Dourados: UFGD, 2018.

118f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Edson Lucas dos Santos

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Cerrado. 2. plantas medicinais. 3. LC-DAD-MS. 4. melanoma. 5. apoptose. I. Título.


Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pela autora.

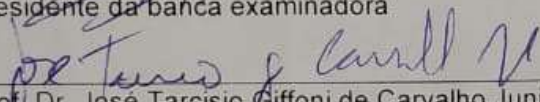
**©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.**

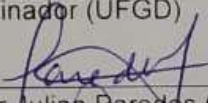


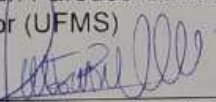
### Termo de Aprovação

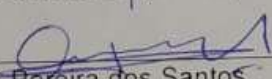
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer **APROVADO**, para a tese intitulada: "**Avaliação das propriedades antioxidante e anticâncer do extrato aquoso da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens***", de autoria de **Debora da Silva Baldivia**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos  
Presidente da banca examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Tarcisio Giffoni de Carvalho Junior  
Membro Examinador (UFGD)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero  
Membro Examinador (UFMS)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira  
Membro Examinador (UFGD)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Uilson Pereira dos Santos  
Membro Examinador (HEMOSUL)

Dourados/MS, 13 de agosto de 2018.

*Dedico este trabalho a minha amada MÃE (in memoriam). Um anjo que sempre me apoiou e com seu simples sorriso me fazia mais forte quando eu mais precisava. Lembrar do seu sorriso é um combustível diário para acreditar que pode ser possível SIM. Amor eterno!*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** por todas por todas as coisas que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fez chegar aonde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou. Foi a minha jornada de tropeços e vitórias que me fez enxergar o verdadeiro significado e beleza da vida e entender os planos de Deus.

À minha família por estar sempre presente em minha vida. Em especial aos meus pais **José Baldivia** e **Marlene Bernarda da Silva** (*in memoriam*) que sempre acreditaram em mim e fizeram de tudo para que eu pudesse ser quem eu gostaria de ser. Aos meus queridos irmãos **Jessé da Silva Baldivia** e **Eduardo da Silva Baldivia** pelo carinho, cuidado e amor dispensado a mim. Meus sinceros agradecimentos.

Ao meu esposo e eterno namorado **Rogério Pereira de Araújo**, pelo companheirismo, apoio, incentivo, paciência, compreensão, conselhos, críticas, carinho e amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Edson Lucas dos Santos** pela competência, exemplo de profissional e respeito com que conduziu este trabalho, do alvorecer da ideia até a sua síntese. Agradeço pela oportunidade e confiança dada a mim durante esses quatro anos e pela imensa contribuição para minha formação. Meus sinceros agradecimentos, respeito e consideração.

À profa. Dra. **Kely de Picoli Souza**, por mais uma oportunidade e confiança em mim depositada. Pela contribuição na minha formação profissional e para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dr. **Carlos Alexandre Carollo** e Dra. **Denise Brentan da Silva** da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pela disponibilidade em realizar a parte química e contribuir na redação do artigo científico.

Aos professores doutores **Caio Fernando Ramalho de Oliveira**, **Edgar Julian Paredes Gamero**, **José Tarcísio Giffoni de Carvalho Júnior** e ao Dr. **Wilson Pereira dos Santos** pela disponibilidade e o interesse em participar como avaliadores na banca da minha defesa de tese. Minha gratidão às contribuições na correção desse trabalho e sugestões para futuros estudos.

Aos professores do programa de pós-graduação pelos conhecimentos compartilhados em diversas áreas da biotecnologia e da biodiversidade.

Aos membros do **Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo** (GEBBAM): Alex Santos Oliveira, Cintia Miranda dos Santos, Daniel Ferreira Leite, David Tsuyoshi Hiramatsu de Castro, Hélder Freitas dos Santos, Janielle da Silva Melo da Cunha, Profa. Dra. Jaqueline Ferreira Campos, Kátia Ávila Antunes, Kellen Natalice, Laura Costa Alves de Araújo, Natã Vinicius da Silva Miranda, Natasha Rios Leite, Paola dos Santos Rocha, Priscilla Pereira de Toledo Espindola, Tamaeh Monteiro Alfredo, Thaliny Bonamigo, Uilson Pereira dos Santos muito obrigada por tudo. Todos vocês foram essenciais para o desenvolvimento desse e de outros trabalhos. E no final dessa jornada, agradeço também aos mais novos GEBBANIANOS **André Durão de Lemos** e **Fernanda Corrêa Alves** pela disposição e presteza nas tarefas diárias do laboratório. A todos, muito obrigada pela amizade, pelas constantes risadas, críticas, sugestões e trocas de experiências. Desejo que todos vocês tenham sucesso na vida pessoal e profissional.

Ao senhor **Adonias** e a senhora **Jucicleide** do Assentamento Lagoa Grande – ITAHUM-MS, pela autorização e ajuda nas coletas das plantas e pelos deliciosos almoços que preparavam para nós com muito carinho. Obrigada por tudo!

À secretária do programa de pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade **Rosiane de Souza Silva**, pela paciência e disponibilidade em ajudar quando nas inúmeras vezes que eu precisei.

À **Universidade Federal da Grande Dourados** (UFGD) por disponibilizar a infraestrutura e recursos para que esse trabalho fosse desenvolvido.

À **Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul** (FUNDECT) e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Obrigada a todos!

## RESUMO

BALDIVIA, Debora da Silva. [Tese]. Universidade Federal da Grande Dourados, agosto de 2018. **Avaliação das propriedades antioxidante e anticâncer do extrato aquoso da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens***. Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos.

*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) é uma árvore nativa do Cerrado brasileiro conhecida popularmente como barbatimão ou casca-da-mocidade. Na medicina popular, a decocção ou infusão das cascas do caule desta planta são utilizadas no tratamento de várias doenças. Neste estudo, o objetivo foi investigar a composição química do extrato aquoso das cascas do caule de *Stryphnodendron adstringens* (EASA), avaliar as propriedades antioxidante e anticâncer, bem como caracterizar os mecanismos de morte promovidos contra células de melanoma murino B16F10Nex-2. Cascas do caule de *Stryphnodendron adstringens* foram coletadas no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, e em seguida maceradas com água destilada durante 48 horas para obtenção do extrato aquoso, EASA. A identificação dos constituintes químicos foi determinada por LC-DAD-MS e a quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides foi determinada por ensaios colorimétricos. A atividade antioxidante do EASA foi investigada pelos métodos de captura dos radicais 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), inibição da hemólise oxidativa e inibição da peroxidação lipídica induzida por 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) em eritrócitos humanos. Células de melanoma murino B16F10Nex-2 foram utilizadas para avaliar a ação anticâncer e os mecanismos envolvidos na morte celular promovida pelo EASA. Foram identificados no EASA ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, cromonas isoméricas C-hexosil O-pentosil 5,7-dihidroxicromona e proantocianidinas dimérica e trimérica composta principalmente por unidades de prodelfidina. As concentrações de compostos fenólicos foram  $197,10 \pm 0,83$  mg EAG/g de EASA e para flavonoides foram  $2,87 \pm 0,08$  mg EQ/g. A capacidade antioxidante pelo ensaio de ABTS demonstrou que o EASA foi capaz de inibir 50 % dos radicais livres ( $IC_{50}$ ) na concentração de  $1,83 \pm 0,15$   $\mu$ g/mL e inibição máxima dos radicais livres em  $99,68 \pm 0,08$  % na concentração de 10  $\mu$ g/mL. No ensaio de DPPH o EASA apresentou  $IC_{50}$  na concentração de  $3,81 \pm 0,02$   $\mu$ g/mL e inibição máxima em  $89,92 \pm 1,36$  % na concentração de 50  $\mu$ g/mL. Estes resultados corroboram com os obtidos no ensaio de AAPH, onde o EASA apresentou atividade anti-hemolítica e diminuição do conteúdo de malondialdeído em eritrócitos humanos ao longo de todo período experimental (240 min) de forma concentração e tempo dependente. Na avaliação de citotoxicidade, o EASA apresentou ação citotóxica contra as células do melanoma B16F10Nex-2 na concentração de 65  $\mu$ g/mL após o tratamento de 24 e 48 h, sendo o perfil de morte celular observado a apoptose tardia. A investigação dos mecanismos de morte celular promovido pelo EASA evidenciou aumento dos níveis de ERO intracelular, disfunção do potencial de membrana mitocondrial e ativação da caspase-3. Em conjunto, estes dados mostram atividades antioxidantes e anticâncer do extrato aquoso das cascas do caule de *Stryphnodendron adstringens*, resultados que abrem novas perspectivas para investigações contra outras linhagens de células tumorais, modelos *in vivo*, bem como para a identificação e isolamento dos constituintes químicos responsáveis por estes efeitos.

**Palavras chave:** Cerrado, plantas medicinais, LC-DAD-MS, estresse oxidativo, ERO, melanoma, caspase-3, apoptose.



## ABSTRACT

BALDIVIA, Debora da Silva. [Thesis]. Universidade Federal da Grande Dourados, agosto de 2018. **Evaluation of *in vitro* antioxidant and anticancer properties of the aqueous extract from the stem bark of *Stryphnodendron adstringens*.** Advisor: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos.

*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) is a tree species native to the Brazilian Cerrado, commonly known as barbatimão or casca-da-mocidade. In traditional medicine, decoctions or infusions of the stem bark of this plant are used in the treatment of several diseases. The objective of this study was to investigate the chemical composition of the aqueous extract of the stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (EASA), to evaluate the antioxidant and anticancer properties, as well as to characterize the mechanisms of death promoted against B16F10Nex-2 murine melanoma cells. *Stryphnodendron* stem bark were collected in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, and then macerated with distilled water for 48 hours to obtain the aqueous extract, SAAE. Identification of the chemical constituents was determined by LC-DAD-MS and the quantification of phenolic compounds and flavonoids present in the SAAE were determined by the colorimetric methods Folin-Ciocalteu and aluminum chloride, respectively. The antioxidant activity of SAAE was investigated using the monocation of 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, inhibition of oxidative hemolysis and inhibition of lipid peroxidation induced by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH) in human erythrocytes. B16F10Nex-2 murine melanoma cells were used to evaluate the anticancer action and mechanisms involved in the cell death promoted by the SAAE. From the SAAE, gallic acid, galocatechin, epigallocatechin, isomeric chromones C-hexosyl- and O-pentosyl-5,7-dihydroxychromone, dimeric and trimeric proanthocyanidins mainly composed of prodelphinidin units and the were identified. The concentrations of phenolic compounds were  $197.10 \pm 0.83$  mg EAG / g SAAE and for flavonoids were  $2.87 \pm 0.08$  mg EQ / g. The antioxidant capacity by the ABTS assay demonstrated that SAAE was able to inhibit 50% of the radicals ( $IC_{50}$ ) at a concentration of  $1.83 \pm 0.15$   $\mu$ g / mL and maximal inhibition of free radicals of  $99.68 \pm 0.08\%$  at the concentration of  $10$   $\mu$ g / mL. In the DPPH assay, SAAE presented  $IC_{50}$  at the concentration of  $3.81 \pm 0.02$   $\mu$ g / mL and maximum inhibition of  $89.92 \pm 1.36\%$  at the concentration of  $50$   $\mu$ g / mL. These results corroborate with those obtained in the AAPH assay, where SAAE showed anti-hemolytic action activity and decreased malondialdehyde content in human erythrocytes throughout the experimental period (240 min) in concentration and time dependent manner. In the evaluation of cytotoxicity, the presented cytotoxic action against the B16F10Nex-2 melanoma cells at the concentration of  $65$   $\mu$ g / mL after the treatment of 24 and 48 h, the observed cell death profile being the late apoptosis. The investigation of the mechanisms of cell death promoted by showed an increase in intracellular ROS levels, dysfunction of the mitochondrial membrane potential and activation of caspase-3. Together, these data show antioxidant and anticancer effects of the aqueous extract from the stem bark of *Stryphnodendron astringens*, results that open new perspectives for investigations against other tumor cell lines, in vivo models, as well as for the identification and isolation of the responsible chemical constituents for these purposes.

**Keywords:** Cerrado, medicinal plants, LC-DAD-MS, oxidative stress, ROS, melanoma, caspase-3, apoptosis.

## LISTA DE SIGLAS

a.C	antes de Cristo
AAPH	2,2'- azobis (2-amidinopropano)
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
CCCP	Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
CNA	Candida não-albicans
COX-2	Ciclooxigenase 2
DL <sub>50</sub>	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente ao ácido gálico
EASA	Extrato aquoso de <i>Stryphnodendron adstringens</i>
EPM	Erro padrão da média
EQ	Equivalente a quercetina
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GI <sub>50</sub>	Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% da atividade
ILPC	Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer
MDA	Malondealdeído
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltertrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico, do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Sigla em inglês para Tampão Salino de Fosfato
PI	Iodeto de Propídeo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SFB	Soro fetal bovino
TBA	Ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....	15
2.1.1. Aspectos gerais .....	15
2.1.2. Atividades biológicas .....	16
2.1.3. Abordagem geral de fitoterápicos e patentes registradas .....	19
2.1.4. Composição química .....	22
2.2. Plantas medicinais do Cerrado.....	24
2.3. Fármacos anticancerígenos oriundos de plantas medicinais .....	26
2.4. Estresse oxidativo e atividade antioxidante.....	28
2.5. Compostos fenólicos e atividades anticâncer.....	34
2.6. Melanoma.....	39
2.6.1. Fatores de risco.....	40
2.6.2. Diagnóstico clínico .....	41
2.6.3. Tratamento do melanoma .....	46
3. OBJETIVOS .....	49
3.1. Objetivo geral .....	49
3.2. Objetivos específicos .....	49
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
5. APÊNDICE .....	68
5.1. Artigo publicado na revista “International Journal of Molecular Sciences”. .....	68
6. CONCLUSÃO GERAL.....	88
7. ANEXO.....	89

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade até os dias atuais os seres humanos têm buscado na natureza recursos terapêuticos alternativos para atender às suas necessidades básicas, tais como alimentar e para o tratamento de doenças.

Dentre os recursos utilizados, as plantas ocupam um lugar de destaque, pois são fontes de moléculas bioativas com atividade antioxidante que podem exercer efeitos benéficos para a saúde (Diouf et al., 2009; Singh e Katiyar, 2011; Padumadasa et al., 2016). Os antioxidantes naturais são moléculas que conferem ao organismo proteção contra os danos celulares promovidos pelo excesso de espécies reativas, responsáveis pela indução do estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição celular resultante do desequilíbrio fisiológico entre os níveis de antioxidantes e oxidantes (radicais livres ou espécies reativas) em favor dos oxidantes levando a uma interrupção da sinalização e do controle redox e / ou danos a biomoléculas essenciais, tais como ácidos nucléicos, proteínas e lipídios (Sies e Jones, 2007; Campos et al., 2016). O dano às biomoléculas está intimamente associado ao desenvolvimento de doenças, entre elas o câncer (Acharya et al., 2010).

O câncer é considerado como uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo (Chinembiri, et al., 2014). É uma doença complexa e multifatorial caracterizada pelo crescimento desordenado de células anormais (George et al., 2016) e engloba mais de 100 diferentes tipos (NCI, 2017), dentre eles o câncer de pele. O câncer de pele é o mais comum, especialmente na população de pele clara (Simões et al., 2015). Sua classificação é decorrente da célula em que o tumor origina, podendo ser denominado câncer de pele não melanoma (carcinoma de células escamosas e carcinoma basocelular) e melanoma (Kaushik e Kaushik, 2016).

Melanoma é um câncer de pele com origem nos melanócitos, células produtoras de melanina, pigmento que dá cor a pele. O melanoma é o menos comum, representa cerca de 10% de todos os cânceres de pele, porém é a forma mais agressiva, sendo responsável por 90% das mortes relacionadas aos tumores cutâneos, devido ao elevado potencial metastático e a resistência às drogas quimioterápicas (Pfeifer e Besaratinia, 2012; Garbe et al., 2016).

Com incidência global de 160.000 novos casos e 40 mil mortes por ano, cerca de 80% desses novos casos de melanoma ocorrem na Nova Zelândia (com taxa incidente de 35,8 casos para cada 100.000 habitantes por ano), Austrália (34,9 casos para cada 100.000 habitantes por ano) e América do Norte (13,8 para cada 100.000 habitantes por ano) (Globocan, 2012; Eggermont, Spatz e Robert 2014). No Brasil, a incidência é menor quando comparada a esses países, apresentando cerca de 2,92 novos casos em homens e 3,34 novos casos em mulheres para cada 100.000 habitantes (INCA, 2018).

Nos últimos 40 anos o número de novos casos de melanoma tem aumentado drasticamente, o que é preocupante para a saúde pública (NCI, 2016). As causas subjacentes para o desenvolvimento do melanoma é multifatorial, e inclui pré-disposição genética e exposição a agentes ambientais (Chudnovsky, Khavari e Adams, 2005). A exposição cumulativa a radiação ultravioleta está entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma (Gorantla e Kirkwood, 2014; Eggermont, Spatz e Robert 2014). Desta forma, o melanoma é um dos poucos exemplos de câncer humano em que o agente etiológico é conhecido com grande certeza (Pfeifer e Besaratinia, 2012).

Além disso, ao contrário de outros tipos de cânceres, o melanoma é de fácil identificação por surgir na pele. O diagnóstico precoce desta doença permite que o tratamento seja realizado numa fase em que a cura pode ser facilmente alcançável através da excisão cirúrgica (Thompson, Scolyer, Kefford, 2005). Em casos avançados onde a cirurgia já não é indicada, o procedimento é o uso da quimioterapia, radioterapia, e da imunoterapia em alguns casos (Garbe et al., 2016; Kee e McArthur 2016). Atualmente, essas modalidades terapêuticas são as mais utilizadas para o tratamento do melanoma, no entanto, promovem elevados efeitos colaterais no paciente, além de não alcançarem resultados satisfatórios em termos de remissão completa do tumor e prevenção de metástases.

Neste contexto, a busca por plantas medicinais que apresentam baixa toxicidade para células não alvo e alta especificidade contra o câncer de pele melanoma tem atraído à atenção da comunidade científica para a busca de novos fármacos antitumorais. As plantas produzem inúmeras e diferentes moléculas bioativas que apresentam elevado poder antioxidante, capazes de apresentar diferentes mecanismos de prevenção e morte das células tumorais.

De acordo com Dzialo (2016) os compostos fenólicos estão entre os principais compostos bioativos produzidos por plantas que apresentam propriedades anticancerígenas contra o câncer de pele. Muitas plantas produzem ou elevam as concentrações dessas moléculas durante a sua defesa contra ataques de herbívoros ao tecido vegetal ou injúrias ambientais (Dias et al., 2015).

Neste sentido, plantas endêmicas do Cerrado brasileiro têm recebido cada vez mais atenção no âmbito farmacológico por apresentarem elevadas concentrações de compostos fenólicos provavelmente em decorrência ao estresse hídrico, a alta radiação ultravioleta, ataques de herbívoros e infecções por fungos (Violante et al., 2012; Bailão et al., 2015; Fank-de-Carvalho et al., 2015).

*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae), conhecida popularmente como barbatimão, é uma das plantas medicinais encontradas e utilizadas na medicina popular do Cerrado (Lorenzi, 2008). As cascas do caule da espécie são utilizadas na cicatrização de feridas, inflamações, dor em geral, diarreia, tumores entre outras doenças (Rodrigues e Carvalho, 2001; Pereira et al., 2009; Santana, Voeks Funch, 2016).

Tendo em vista o uso medicinal popular de *S. adstringens* e a inexistência de estudos sobre suas propriedades antioxidantes e antitumorais contra o melanoma, o presente estudo propôs investigar a composição química, a atividade antioxidante e anticâncer, bem como os mecanismos de morte promovidos pelo extrato aquoso das cascas do caule de *S. adstringens* contra células de melanoma B16F10Nex-2.

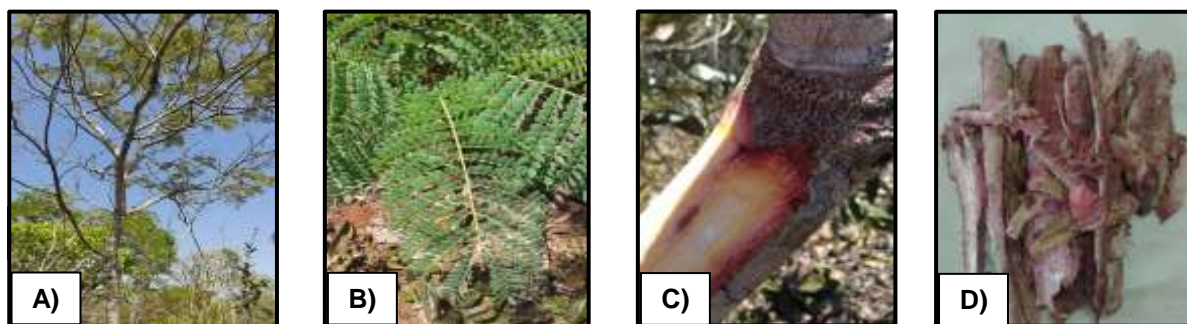
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Stryphnodendron adstringens*

#### 2.1.1. Aspectos gerais

O gênero *Stryphnodendron* descrito por Martius em 1873, atualmente possui 53 espécies registradas, porém são aceitos apenas 30 (The plant list, 2013). *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Figura 1) conhecida popularmente como barbatimão, barbatimão-verdadeiro, barba-de-timão, charãozinho-roxo e casca-da-mocidade, é uma árvore nativa e endêmica do Brasil (Lorenzi, 2008). A espécie está distribuída em todo território brasileiro, principalmente em Tocantins (regiões Norte), Bahia (Nordeste), Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Centro-Oeste), Minas Gerais e São Paulo (Sudeste) e Paraná (Sul) (Scalon, 2015). Caatinga e Cerrado são os domínios fitogeográficos onde *Stryphnodendron adstringens* é encontrada, sendo Campo Rupestre e Cerrado (*Lato sensu*) são os tipos de vegetação predominante da espécie. Sua altura varia de quatro a cinco metros, apresenta tronco e ramos tortuosos de vinte a trinta centímetros de diâmetro (Lorenzi, 2008; Scalon, 2015).

Suas folhas são alternas, composta bipinadas, apresentando cinco a oito pares de pinas, cada uma com cerca de seis a oito pares de folíolos por pina, geralmente alternos, ovais ou orbiculares, largamente elípticos a subglobosos, subcoriáceos a coriáceos (Lorenzi, 2008). As flores são esbranquiçadas, pequenas e numerosas dispostas em inflorescências do tipo racemo de espigas cilíndricas. Seus frutos são vagens grossas, carnosas de cor castanho-claras com muitas sementes achatadas e oblongas de cor parda. Sua floração inicia-se a partir de setembro até o final de novembro e a frutificação de julho a setembro (Lorenzi, 2008).



**Figura 1.** Aspecto geral de *Stryphnodendron adstringens*. **A)** Morfologia estrutural. **B)** Folhas. **C)** Caule. **D)** Cascas. Fonte: Baldivia, DS (2015).

De acordo com Lorenzi (2008) a madeira de *S. adstringens* é muito utilizada na construção civil, em obras expostas e de lugares úmidos por ser bastante durável quando em condições adversas.

Na medicina popular, a decocção ou infusão das cascas do caule são utilizadas empiricamente no tratamento de infecções fúngicas, diabetes, problemas na próstata, inflamação, gastrite, doenças do fígado (Santana et al., 2016), má circulação, limpeza de feridas uterinas (Albuquerque et al., 2007), úlcera, corrimento, dor de barriga (Souza et al., 2010), tumores, irritação vaginal, adstringente (Pereira et al., 2009), blenorragia, diarreia, uretrites (Rodrigues e Carvalho, 2001), cicatrização, antibiótico, inflamação do útero e do ovário (Lopes, 2010; Ferrão et al., 2014) e hemorragia (Agra et al., 2008).

### **2.1.2. Atividades biológicas**

Estudos científicos com os extratos hidroetanólicos das cascas e folhas de *S. adstringens* demonstraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia spp* (Oliveira et al., 2013; de Pinho et al., 2012; Audi et al., 2004). Em outros estudos contra microrganismos, o extrato hidroetanólico das cascas apresentou ação contra *Mycobacterium tuberculosis* (Oliveira et al., 2007), *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Orlando, 2005).

Além disso, o extrato bruto obtido da casca do caule é descrito por sua ação antifúngica contra diversos patógenos, dentre eles *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (Ishida et al., 2006). Estudos posteriores mostram que a frações ricas em taninos condensados derivadas do extrato bruto das cascas apresentam ação antifúngica contra essas leveduras além de aumentar significativamente a sobrevivência das larvas *Tenebrio molitor* infectadas por fungos (Luiz et al., 2015; Morey et al., 2016). Adicionalmente, estudos com frações ricas em taninos poliméricos de proantocianidinas da casca do caule de *S. adstringens* apresentam atividade antifúngica *in vitro* contra *Candida albicans* e *Candida* não-albicans (CNA, incluindo isolados resistentes ao fluconazol), além disso, um gel contendo a fração aquosa controlou eficientemente a infecção vaginal por *C.*



*albicans* e *C. glabrata* em camundongos, sem apresentar toxicidade ao tecido vaginal (de Freitas et al., 2018).

Outra atividade biológica já descrita pelo extrato etanólico das cascas do caule de *S. adstringens* é a ação tripanocida através da diminuição do número de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* no sangue de camundongos (Herzog-Soares et al., 2002). Concomitante a este estudo, Luize et al. (2005) e Toledo (2002) avaliaram a ação do extrato sobre *T. cruzi* e de *Leishmania amazonenses in vivo* e demonstram atividade inibitória no crescimento de promastigostas e amastigostas.

Além das atividades biológicas apresentadas em micro-organismos, frações derivadas do extrato do caule de *S. adstringens* têm demonstrado efeitos citotóxicos contra linhagens tumorais.

A fração obtida das folhas de *S. adstringens* composta por ácido gálico, dímero de procianidina B1 e (-) epicatequina-3-O-galato induz a apoptose em linhagens celulares de câncer mama MCF-7 e MDA-MB-435, através do aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, caspase-9, caspase-3 ativa, caspase-8, e diminuição da expressão de Bcl-2. Além disso, o tratamento com a fração aumentou a expressão das proteínas LC-3 e beclin-1, ambas marcadoras da autofagia celular (Sabino et al., 2017).

Kaplum et al. (2018), demonstraram que uma fração rica em polímero de proantocianidina apresenta atividade citotóxica de maneira tempo e dose dependente nas linhagens celulares de câncer do colo do útero HeLa (HPV18-positivo), SiHa (HPV16-positivo) e C33A (HPV-negativo) com valores da concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) de 20,0, 35,4, e 33,5 µg/mL após 24 h, e 15,3, 21,3, e 15,6 µg/mL após 48 horas de tratamento, respectivamente. Esse estudo demonstra ainda que o valor do IC<sub>50</sub> para queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), foi de 55,4 e 48,1 µg/mL para os períodos de 24 e 48 h de avaliação, respectivamente. O tratamento com a fração nessas linhagens foi capaz de inibir significativamente a migração de células cancerígenas, aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio, o potencial de membrana mitocondrial, a razão Bax / BCL-2 e a expressão da caspase 9 e 3, a lipoperoxidação em todas as três linhagens celulares além de reduzir os níveis intracelulares de adenosina trifosfato. Além disso, no estudo *in vivo*, a fração (150 mg/kg/dia) reduziu significativamente o volume tumoral e o peso do

tumor sólido de Ehrlich murino e aumentou significativamente a lipoperoxidação, indicando que a fração também induz estresse oxidativo no modelo *in vivo*.

Considerando que *S. adstringens* é uma planta comumente utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamação e cicatrização, a atividade anti-inflamatória da fração acetona das cascas do caule foi investigada em ratos com inflamação aguda e crônica, e apresentou inibição significativa do edema de pata (Lima et al., 1998).

Quanto à atividade cicatrizante, diversos estudos têm demonstrado o potencial farmacológico de *S. adstringens* (Panizza et al., 1988; Coutinho 2004; Coelho et al., 2010). Formulações em gel contendo 1% de extrato hidroacetônico e pomada contendo 1% da fração acetato de etila obtidas das cascas do caule de *S. adstringens* apresentam atividade cicatrizante em ratos diabéticos através da proliferação epitelial e da produção de fibras de colágeno no local da ferida (Pinto et al., 2015; Hernandez et al., 2010). Além disso, tem-se demonstrado que o extrato etanólico das cascas do caule de *S. adstringens* inibem fortemente a atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (valores de IC<sub>50</sub> de 1,86 e 0,61  $\mu$ g / mL, respectivamente), ambas relacionadas à *Diabetes mellitus* (Souza et al., 2012).

Embora extratos de *S. adstringens* apresentem atividades tóxicas contra diversos microrganismos, estudos demonstram que extratos das cascas do barbatimão não apresentam atividade genotóxica em *Drosophila melanogaster* (Souza et al., 2003) e nem mutagênica em camundongos *Mus musculus* (Andrade et al., 2006).

Estudos não clínicos realizados para avaliar a toxicidade do extrato acetônico e da fração rica em proantocianidinas obtidos das cascas do caule de *S. adstringens* em camundongos *Swiss*, demonstram que as doses letais (DL<sub>50</sub>) do extrato foi de 2699 mg/kg e 3015 mg/kg, respectivamente (Rebecca et al., 2002; Costa et al., 2010).

Porém, estudos com as folhas têm demonstrado efeitos tóxicos *in vivo* e *in vitro*. Almeida et al. (2009) demonstrou no estudo toxicológico pré-clínico agudo com camundongos tratados por via intraperitoneal com extrato das folhas de *S. adstringens*, toxicidade com uma DL<sub>50</sub> igual a 0,25 mg/mL.

Burger et al. (1999) demonstram no estudo de toxicidade subcrônica que o extrato hidroetanólico das favas (5 mg/kg) apresentou efeito abortivo e infertilizante

em ratas *Wistar* após 21 dias de tratamento. Diferentemente do extrato da fava, extrato acetônico obtido das cascas do caule apresenta toxicidade subcrônica em ratos *wistar* machos na concentração de 800 mg/kg e 1600 mg/kg aos 30 dias de tratamento via oral, sendo evidenciado diminuição do peso corporal e alterações dos níveis de glicose e do aspartato amino transferase (Rebecca et al., 2002).

### **2.1.3. Abordagem geral de fitoterápicos e patentes registradas**

*S. adstringens* é uma das espécies brasileiras registradas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS, 2014). De acordo com a resolução RDC N° 10, de 09 de abril de 2010 *S. adstringens* é uma das espécies que compõe a lista de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Conforme a resolução, as cascas do caule é a parte utilizada, e a forma do preparo se dá pela decoção de 3 g do material vegetal para cada 1 litro de água. Seu uso se faz através de compressas no local afetado de 2 a 3 vezes ao dia para tratamentos de lesões, com ação cicatrizante e antisséptico tópico na pele e mucosas bucal e genital. Como contraindicação, o decocto não deve ser utilizado em lesões com processo inflamatório intenso.

A partir das cascas do caule de *S. adstringens* foi desenvolvido um medicamento conhecido por Fitoscar pela empresa Apsen Farmacêutica S/A (CNPJ 62.462.015/0001- 29). Esse medicamento foi registrado na ANVISA sob o número 1.0118.0605. O fitoterápico Fitoscar é apresentado sob forma de pomada composta de 60 mg de extrato seco das cascas de *S. adstringens* a 50% por grama de pomada. Cada 60 mg de extrato seco que corresponde a 30 mg de fenóis totais e 27 mg de taninos totais e essa pomada é utilizada como agente cicatrizante em vários tipos de lesões (Apsen farmacêutica, 2017).

Estudos realizados com animais têm demonstrado efeitos satisfatórios de formulações contendo extrato de *S. adstringens* na cicatrização de feridas. Coelho et al. (2010) demonstrou que ratos *Wistar* tratados durante 30 dias com pomada contendo 10% de extrato aquoso das cascas de *S. adstringens*, apresentaram epitelização das lesões após 14 dias de tratamento. Já o tratamento utilizando pomada contendo 1% da fração acetônica do extrato das cascas do caule de *S. adstringens* ratos *Wistar* apresentam reepitelização das lesões cutâneas em 10 dias de tratamento (Hernandes et al., 2010).

Diante das atividades biológicas já comprovadas cientificamente, *S. adstringens* é um vegetal que apresenta potencial para o desenvolvimento de fármacos ou para compor formulações de uso medicinal para o tratamento de várias doenças. De acordo com o Ministério da Saúde (2014), 26 registros de pedido de patentes foram solicitados para a espécie entre os anos de 2001 a 2012. Desses registros de pedidos, 8 foram solicitados ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) e 18 pedidos registrados no *World International Property Organization (WIPO)*.

**Tabela 1.** Patentes solicitadas para a espécie vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.

<b>Brasil – Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)</b>		
<b>Registro</b>	<b>Data</b>	<b>Título</b>
PI 0105968-8 A2	28/11/2001	Medicamento natural para tratamento alternativo anti-HIV
PI 0303680-4 A2	17/02/2003	Formulação de sabonete natural à base de aroeira e barbatimão
PI0300440- 6 A2	25/02/2003	Formulação de medicamento natural
PI 0305535-3 A2	11/11/2003	Forma farmacêutica fitoterápica com propriedades cicatrizante, antimicrobiana e outras atividades de interesse médico e veterinário para o tratamento de úlceras isquêmicas e infecções; seu processo de preparação e sua aplicação
PI 0305658-9 A2	21/11/2003	Larvicida bioquímico
PI 0405132-7 A2	10/11/2004	Composição para uso tópico contendo extrato de planta do gênero <i>Stryphnodendron</i> ; seu processo de preparação e sua aplicação
PI 0705071-2 A2	19/04/2007	Processo para obtenção de medicamentos ou cosméticos através do extrato de <i>Stryphnodendron barbatiman</i> , para diminuição de pêlos em diversas regiões do corpo
PI 1004542-2 A2	01/07/2010	Composição farmacêutica para tratamento de infecções HPV utilizando extratos de barbatimão
<b>Internacional – World International Property Organization (WIPO)</b>		
2000241843 (JP – 2002020243)	23/01/2002	Agent for preventing and improving gray hair
PCT/JP2003/004253 WO-WO/2003/0845559	19/08/2003	Compositions for inhibiting fibrosis

Registro	Data	Título
0001028613 (UY – 0001028613)	31/12/2004	Composicion para uso topico conteniendo extracto de planta del genero <i>Stryphnodendron</i> ; su proceso de preparacion y su aplicacion
0001028613 (UY – 0001028613)	31/12/2004	Composicion para uso topico conteniendo extracto de planta del genero <i>Stryphnodendron</i> ; su proceso de preparacion y su aplicacion
2537118(CA – 2537118)	19/05/2005	Composition for topical use containing an extract of <i>Stryphnodendron</i> , its preparation and its application
PCT/BR2004/000221 (WO–WO/2005/044288)	19/05/2005	Composition for topic use containing an extract of <i>Stryphnodendron</i> , its preparation as well as its application
2002102905 (JP – 2005289813)	20/10/2005	Composition for inhibiting fibrosis
PCT/JP2005/018633 (WO–WO/2006/038690)	13/04/2006	Functional food and drink
173976 (IL – 173976)	05/07/2006	Composition for topic use containing an extract of <i>Stryphnodendron</i> , its preparation as well as its application
04797138 (EP – 1684773)	02/08/2006	Composition for topic use containing an extract of <i>Stryphnodendron</i> , its preparation as well as its application
11381655 (US – 20060216364)	28/09/2006	Composition for topic use containing an extract of <i>Stryphnodendron</i>
1020057019381 (KR – 1020060119708)	24/11/2006	Composition for topic use containing an extract of <i>Stryphnodendron</i> , its preparation as well as its application
200480032832.6 (CN – 1878560)	13/12/2006	Composition for topic use containing an extract of <i>Stryphnodendron</i> , its preparation as well as its application
PA/a/2006/005275 (MX-PA/a/2006/005275)	23/04/2007	Composition for topic use containing an extract of <i>Stryphnodendron</i> , its preparation as well as its application.
2006/04443 (ZA – 2006/04443)	16/09/2007	Composition for topical use containing an extract of <i>Stryphnodendron</i> its preparation as well as its application
2006120457/15 (RU – 02358751)	20/06/2009	Local composition containing <i>Stryphnodendron</i> extract, preparation and application thereof
12823397 (US – 20100267841)	21/10/2010	Composition for topical use containing an extract of <i>Stryphnodendron</i> ; its preparation as well as its application
8401 (CR – 01/11/2010 211/8401)	01/11/2010	Composicion para uso topico conteniendo extracto de la planta del genero <i>Stryphnodendron</i> , su proceso de preparaciony su aplicacion
PCT/BR2011/000205 (WO–WO/2012/000070)	05/01/2012	Pharmaceutical composition using <i>Stryphnodendron</i> extracts for treating HPV infections

**Fonte da tabela:** MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE (BARBATIMÃO) – Ministério da Saúde e Anvisa (2014).

#### 2.1.4. Composição química

A casca do caule de *S. adstringens* é a principal parte da planta utilizada para o tratamento de várias doenças, sendo assim, sua composição química foi e é extensivamente estudada (Tabela 2), demonstrando altas concentrações de compostos fenólicos, dentre eles taninos presentes em extratos aquosos, hidroalcoólicos e hidroacetônicos (Souza-Moreira et al., 2018).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), a droga vegetal (pó das cascas secas do caule) de *S. adstringens* apresenta cerca de 8% de taninos totais, expressos em pirogalol, dos quais 0,2 mg/g equivalem a ácido gálico e 0,3 mg/g correspondem a galocatequina. Esses taninos são representados principalmente por proantocianidinas, tais como prodelfinidinas e prorobinetinidinas (Mello, Petereit e Nahrstedt, 1996; Ishida et al., 2006, Costa et al., 2010).

Outros estudos demonstram que a concentração de taninos encontrada em extratos etanólico (36,6%), hidrometanólicos (38,81%) e acetônico (36,6%) das cascas do caule de *S. adstringens* são maiores que a % de taninos encontrados para droga vegetal (Nascimento, 2008; Costa et al., 2010; Bardal, 2011).

**Tabela 2.** Compostos identificados nas cascas do caule de *S. adstringens*.

Compostos	* Referências
Ácido gálico	1,2,3,4,5
Catequina	2,6
Epicatequina	6
Epicatequina-(4 $\beta$ → 8)-catequina, (-)-epicatequina-3-O-galato	7
Galocatequina	1,2,3,4,6,8
Epigalocatequina	1,2,3,4,5,6,8
Epigalocatequina 3-O-galato	2,9,4,5,8
Epigalocatequina 3-O-metil galato	5
Epigalocatequina 3-O-(3,5-dimetil)galato	1,8
4'-O-metilgalocatequina	1,4,8
4'-O-metilepigalocatequina	6
4'-O-metilepigalocatequina-3-O-galato	4
Epigalocatequina 3-O-(3-metoxi-4-hidroxi)benzoato	1,8
Galocatequina-(4 $\alpha$ → 8)-epigalocatequina 3-O-(4-hidroxi)benzoato	1,8
Epigalocatequina-(4 $\beta$ → 8)-epigalocatequina 3-O-(4-hidroxi)benzoato	1,8
Galocatequina-(4 $\beta$ → 8)-epigalocatequina 3-O-galato	8
Epigalocatequina-(4 $\beta$ → 8)-galocatequina	1,8
Epigalocatequina-(4 $\beta$ → 8)-epigalocatequina	4,5,8
Epigalocatequina-(4 $\beta$ → 6)-epigalocatequina	8
Epigalocatequina-(4 $\beta$ → 8)-epigalocatequina-3-O-galato	8
Epigalocatequina 3-O-galato-(4 $\beta$ → 8)-epigalocatequina 3-O-galato	4,8
4'-O-metilepigalocatequina 3-O-galato-epigalocatequina 3-O-galato	4
Epigalocatequina-epigalocatequina 3-O-galato	4,5,8
4'-O-metilepigalocatequina-epigalocatequina	4
4'-O-metilepigalocatequina-4'-O-metilepigalocatequina	5
Robinetinidol	5
Robinetinidol-(4 $\alpha$ → 8)-epigalocatequina	5,10
Robinetinidol-(4 $\beta$ → 8)-epigalocatequina	10
Robinetinidol-4'-O-metilepigalocatequina	5,10
Robinetinidol-(4 $\beta$ → 8)-epigalocatequina-3-O-galato	10
Robinetinidol-(4 $\alpha$ → 8)-epigalocatequina-3-O-galato	10
Robinetinidol-(4 $\alpha$ → 8)-epigalocatequina-3-O-galato	10
Robinetinidol-(4 $\alpha$ → 6)-epigalocatequina	10
Robinetinidol-[4 $\beta$ → 6(8)]-galocatequina	10
Robinetinidol-(4 $\alpha$ → 8)-galocatequina	10
4'-O-metilrobinetinidol-(4 $\alpha$ → 8)-4'-O-metilgalocatequina	10
4'-O-metilrobinetinidol-(4 $\alpha$ → 8)-4'-O-metilepigalocatequina	1
4'-O-metilgalocatequina-(4 $\alpha$ → 8)-4'-O-metilgalocatequina	1,11
Polímero com 2114 Da de peso molecular com 6 monômeros de flavan-3-ols e um grupo galoil consistindo de unidades de prodelfinidina e prorobinetinidina com configuração 2,3-cis e 2,3-trans	12

\* Referências. **1** (Lopes et al., 2009); **2** (Nascimento et al., 2013); **3** (Santos et al., 2002); **4** (Henriques et al., 2016); **5** (Pinto et al., 2015); **6** (Felipe et al., 2006); **7** (Sabino et al., 2017); **8** (Mello et al., 1996); **9** (Souza et al., 2014); **10** (Mello et al., 1996); **11** (Mello et al., 1999); **12** (Ishida et al., 2006).

## 2.2. Plantas medicinais do Cerrado: fonte para a descoberta de novos fármacos anticancerígenos

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta especialmente no que se refere a sua flora, sendo considerado promissor para descobertas de novas moléculas oriundas de produtos naturais, com potencial farmacológico para distintas doenças, incluindo o câncer.

Espécies de plantas encontradas no Cerrado Brasileiro têm apresentado efeitos citotóxicos e anticancerígenos *in vitro* e *in vivo*.

Estudos de Formagio et al. (2013) demonstram que óleo essencial das folhas de *Annona sylvatica* (Annonaceae) é capaz de inibir o crescimento celular das linhagens tumorais melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), pulmão (NCI- H460), ovário (OVCAR03), prostata (PC-3), colon (HT-29), renal (786-0), ovário resistente (NCI/ADR-Res) e glioma (U251) com valores de GI<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular) entre 36,04 à 45,37 µg/mL. Além disso, demonstram ainda que o extrato metanólico das folhas de *Annona dioica* St. Hill foi efetivo contra diversas linhagens tumorais, especialmente para pulmão, cólon, ovário resistente, ovário e mama apresentando GI<sub>50</sub> de 0,10 a 11,10 µg/mL (Formagio et al., 2013).

As espécies do gênero *Campomanesia* são amplamente encontradas no cerrado brasileiro. Os frutos são utilizados para fazer licores, sucos e doces, enquanto que as folhas são tradicionalmente utilizadas no preparo de remédios caseiros para diversas doenças (Pascoal et al., 2014).

Pascoal e colaboradores (2015) verificaram o efeito anti-proliferativo *in vitro* do extrato etanólico e das frações das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg e da *Campomanesia guaviroba* (Myrtaceae) frente várias linhagens celulares tumorais, tais como glioma (U251), leucemia (K562), ovário (OVCAR-03), como ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES), mama (MCF-7) rim (786-O), cólon (HT-29) e pulmão (NCI-H460). Além disso, o extrato e o composto chalcona cardamonin isolado das folhas de *Campomanesia adamantium* inibe a proliferação de células de câncer de próstata (PC-3), diminuindo a expressão de NFκB1 e induzindo a fragmentação do DNA, sugerindo indução de morte por apoptose (Pascoal et al., 2014). Estudo de Campos et al., (2017), demonstrou que extratos das folhas e das raízes de *C. adamantium* promove morte celular por



apoptose em células leucêmicas via ativação de cálcio intracelular e ativação da caspase-3. Esses resultados obtidos para as espécies do gênero *Campomanesia*, demonstram potencial terapêutico para uso na prevenção e tratamento de doenças associadas a proliferação de células tumorais, bem como, abre perspectivas para a descobertas de novas moléculas e desenvolvimento de medicamentos para o tratamento antineoplásico.

Recentemente, Campos e colaboradores (2016) descobriram outra espécie do Cerrado com grande potencial farmacológico. Avaliaram a atividade citotóxica do extrato hidroetanólico das folhas de *Senna velutina* (Fabaceae) contra as linhagens leucêmicas, K562 e Jurkat e verificaram que o extrato de *S. velutina* induz a morte por apoptose tardia em ambas as linhagens. Outras espécies vegetais encontradas no Cerrado Sul-Mato-Grossense, incluindo *Hancornia speciosa* e *Jacaranda decurrens* também têm demonstrado efeitos citotóxicos contra linhagens leucêmicas (Santos et al., 2016; Casagrande et al., 2014).

Mesquita e colaboradores (2009) realizou um screening citotóxico contra 4 diferentes linhagens tumorais, envolvendo 412 extratos de plantas brasileiras do Cerrado utilizadas na medicina popular para tratar o câncer. O estudo revelou que dos 412 extratos avaliados, 28 demonstraram efeito antiproliferativo substancial, demonstrando pelo menos 85% de inibição da proliferação celular com valores de IC<sub>50</sub> de 50 µg / mL contra uma ou mais linhagens celulares.

Além disso, outros estudos têm demonstrado a potencialidade de plantas na atividade citotóxica e antitumoral para diversas linhagens, incluindo para o melanoma (Kwon et al., 2014; Jin et al., 2014). Diante desse contexto, é nítida a importância de estudos científicos com as espécies nativas do Cerrado brasileiro, visto que essas se mostram fontes promissoras para a descoberta de novos agentes anticancerígenos de suma importância para a sociedade.

### 2.3. Fármacos anticancerígenos oriundos de plantas medicinais

Ao longo do tempo, seres humanos têm buscado na natureza alternativas medicinais para atender às suas necessidades básicas. As plantas em particular, são fontes de moléculas bioativas com potencial terapêutico e representam a grande parcela de alternativas utilizadas pelo homem para o tratamento e cura de doenças. Os primeiros registros escritos sobre aplicações medicinais de plantas datam de 2600 a.C e relatam a existência de um sofisticado sistema medicinal na Mesopotâmia, compreendendo cerca de 1000 medicamentos derivados de plantas (Atanasov et al., 2015).

O conhecimento empírico das propriedades medicinais das plantas e sua aplicação medicinal, possibilitou e ainda possibilita a descoberta de várias moléculas terapêuticas para o tratamento de doenças, incluindo o câncer. De acordo com Newman e Cragg (2016), cerca de 49% das moléculas aprovadas para serem utilizadas na prática clínica para o tratamento do câncer são provenientes de produtos naturais.

A vincristina, por exemplo, foi um dos primeiros agentes anticancerígenos derivados de plantas aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1963. É um alcaloide isolado a partir das folhas de *Catharanthus roseus* (Apocinaceae), conhecida como vinca rósea ou vinca de Madagascar. Os alcaloides da vinca ligam-se à  $\beta$ -tubulina na extremidade (+) de microtúbulos inibindo a polimerização da tubulina e, portanto, impedindo a extensão dos microtúbulos (Stanton et al., 2011). A supressão da extensão dos microtúbulos perturba a formação do eixo mitótico interrompendo a transição metáfase-anáfase no ciclo celular e desencadeia mecanismos que resultam no processo apoptótico. Essa droga é utilizada no tratamento de diversos cânceres em adultos como câncer de mama, fígado, pulmão e testículos (Iqbal et al., 2017) no entanto, é principalmente utilizada na prática oncológica pediátrica contra leucemia linfoblástica aguda (Seca e Pinto, 2018).

Outra droga de suma importância para o tratamento do câncer é o taxano paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), um diterpeno isolado a partir das cascas da *Taxus brevifolia* (Taxaceae). Ao contrário dos alcaloides da vinca, os taxanos ao se ligarem à  $\beta$ -tubulina promovem polimerização dos microtúbulos e inibem sua despolarização. A estabilização dos microtúbulos em estado polimerizado interrompe as células em mitose e por fim, leva a ativação do processo apoptótico (Stanton et al., 2011). A

descoberta do mecanismo de ação em 1979 dessa substância foi um importante marco no tratamento do câncer, pois ela é capaz de regredir o câncer de mama e de ovário, ambos resistentes à terapia tradicional (Rowinsky et al., 1995).

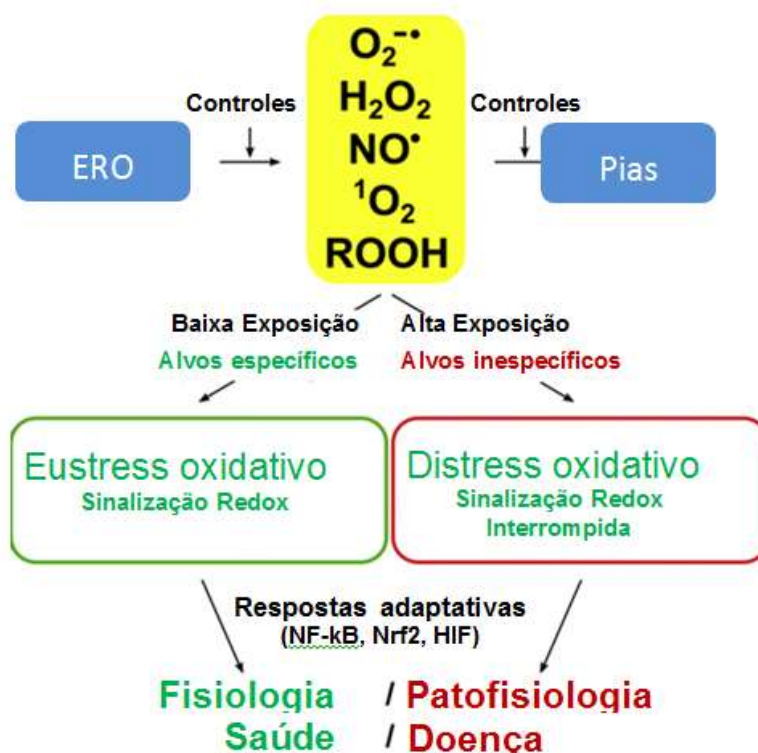
Adicionalmente, outra importante molécula que compõe o arsenal de agentes quimioterápicos derivados das plantas é a camptotecina, um alcaloide extraído e isolado da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). É um regulador negativo da topoisomerase I e através desse mecanismo induz a apoptose em células tumorais (Martino et al., 2017). Devido ao seu baixo rendimento, sua elevada toxicidade, fraca solubilidade e hidrólise em condições fisiológicas, foram desenvolvidos os análogos topotecana, irinotecana e belotecan clinicamente ativos com solubilidade melhorada em solução aquosa e com atividade citotóxica mais potentes (Venditto e Simanek, 2010).

A homoharringtonina, um alcaloide isolado das cascas de *Cephalotaxus harringtonii* (Knight ex J.Forbes) K.Koch e de *Cephalotaxus fortunei* Hook (Seca e Pinto, 2018) foi aprovado pela FDA em 2012 sob o nome comercial de Synribo® para o tratamento da leucemia mielóide crônica em diferentes países do mundo, como China, Japão, Paquistão, EUA e Alemanha (Li e Weng, 2017; Iqbal et al., 2017; Seca e Pinto, 2018). Essa molécula apresenta propriedades antitumorais originalmente identificadas há quase 40 anos, e demonstra um mecanismo de ação único, impedindo a etapa inicial de alongamento da síntese de proteínas (Lü e Wang, 2014). Embora o tratamento com homoharringtonina possa resultar em alguma toxicidade hematológica, como mielossupressão, a sua eficiência terapêutica continua a ser avaliada, e seu uso é esperado em um futuro próximo em outras malignidades hematológicas (Seca e Pinto, 2018).

## 2.4. Estresse oxidativo e atividade antioxidante

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e as defesas antioxidantes no organismo. Evidências indicam que a interrupção da sinalização redox é um aspecto importante para desencadear o estresse oxidativo (Jones, 2006). Portanto, uma nova definição de estresse oxidativo foi proposta como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um interrompimento da sinalização e do controle redox e / ou danos moleculares” (Sies e Jones, 2007).

De acordo com Sies (2018), o grande conhecimento sobre a sinalização redox estimulou as pesquisas sobre o papel do estresse oxidativo sob condições fisiológicas normais conhecida como *eustress oxidativo* e sobre condições de estresse oxidativo excessivo o qual apresenta consequências fisiopatológicas chamada de *distress oxidativo* (Figura 2).



**Figura 2. Estresse oxidativo e sua relação com a sinalização redox.** Vários oxidantes (ERO: espécies reativas de oxigênio) são produzidos por fontes endógenas ou exógenas. Seus níveis de estado estacionário também são controlados por reações de remoção (pias). A baixa exposição ao oxidante permite abordar alvos específicos no uso para sinalização redox (*eustress oxidativo*), enquanto a alta exposição promove o interrompimento da sinalização redox e / ou danos a biomoléculas (*distress oxidativo*). Figura adaptada e modificada de Sies, 2018 (Current Opinion in Toxicology 2018, 7:122–126). <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>.

Na literatura são descritas 4 importantes espécies reativas que apresentam impactos negativos na biologia redox e conseqüentemente promovem o estresse oxidativo, são elas as espécies reativas de enxofre (Giles e Jacob, 2002), de carbonila (Vidal et al., 2014), de nitrogênio e de oxigênio (Wilhelm et al., 2016).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são um grupo de íons e moléculas altamente reativas derivadas do oxigênio molecular como resultado do metabolismo celular normal (Zou et al., 2017). Essas espécies podem ser produzidas por fontes endógenas e exógenas. As ERO endógenas são produzidas como subprodutos em organelas celulares, como mitocôndrias, peroxissomos e também da atividade em citocromo P-450, enquanto as fontes exógenas de ERO incluem fumaça de cigarro, poluentes do ar, medicamentos, íons de metais pesados, radiação ultravioleta e ionizante (Prasad, Gupta e Tyagi, 2017; Lefaki et al., 2017).

Algumas das espécies reativas de oxigênio mais importantes com significado fisiológico são os radicais livres, como radical superóxido ( $O_2\bullet$ ), radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), e alguns não radicais derivados de  $O_2$  capazes de gerar radicais livres, como por exemplo, ácido hipocloroso (HClO), ozônio ( $O_3$ ), oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) os quais não são considerados radicais livres mas são muito importantes pela capacidade de gerar radical hidroxila ( $OH\bullet$ ) em presença de metais como o ferro (Prasad, Gupta e Tyagi, 2017).

As ERO estão associadas a inúmeros processos fisiológicos e fisiopatológicos (Prasad, Gupta e Tyagi, 2017). Quando em baixas concentrações no organismo, as ERO apresentam efeitos benéficos através da regulação da sinalização intracelular e da homeostase (Finkel, 2011). No entanto, níveis elevados de ERO se tornam maléficos para a saúde humana, pois resultam na superprodução de radicais livres que podem danificar proteínas, DNA e lipídeos (Acharya, et al., 2010), facilitando o desenvolvimento de várias doenças, incluindo o câncer (Prasad, Gupta e Tyagi, 2017).

Os ácidos graxos poli-insaturados são um dos principais alvos de oxidação das ERO. Os radicais superóxido ( $O_2\bullet$ ) e hidroxila ( $\bullet OH$ ) são importantes ERO iniciadores da peroxidação de lipídeos. Uma vez iniciada a peroxidação lipídica, ocorrerá uma propagação de reações em cadeia, até serem produzidos os produtos finais de peroxidação lipídica citotóxicos, tais como malondialdeído (MDA) que são acumulados em sistemas biológicos (Rahal et al., 2014). Além disso, as ERO podem

induzir a modificações do DNA através da degradação de bases nitrogenadas, quebras de fitas de DNA de cadeia simples ou dupla, eventos altamente relevantes para o desenvolvimento do câncer (Birben et al., 2012). A oxidação das bases nitrogenadas de DNA pode causar mutações e deleções tanto no DNA nuclear quanto no DNA mitocondrial, este último em especial, é o principal alvo devido à sua proximidade com uma fonte primária de ERO e sua capacidade de reparo deficiente em comparação com o DNA nuclear (Rahal et al., 2014). Essas modificações oxidativas levam a alterações funcionais em vários tipos de proteínas (enzimáticas e estruturais), como fragmentação da cadeia polipeptídica, alteração da carga elétrica das proteínas, reticulação de proteínas e oxidação de aminoácidos específicos, o que podem ter um impacto fisiológico substancial (Birben et al., 2012; Rahal et al., 2014).

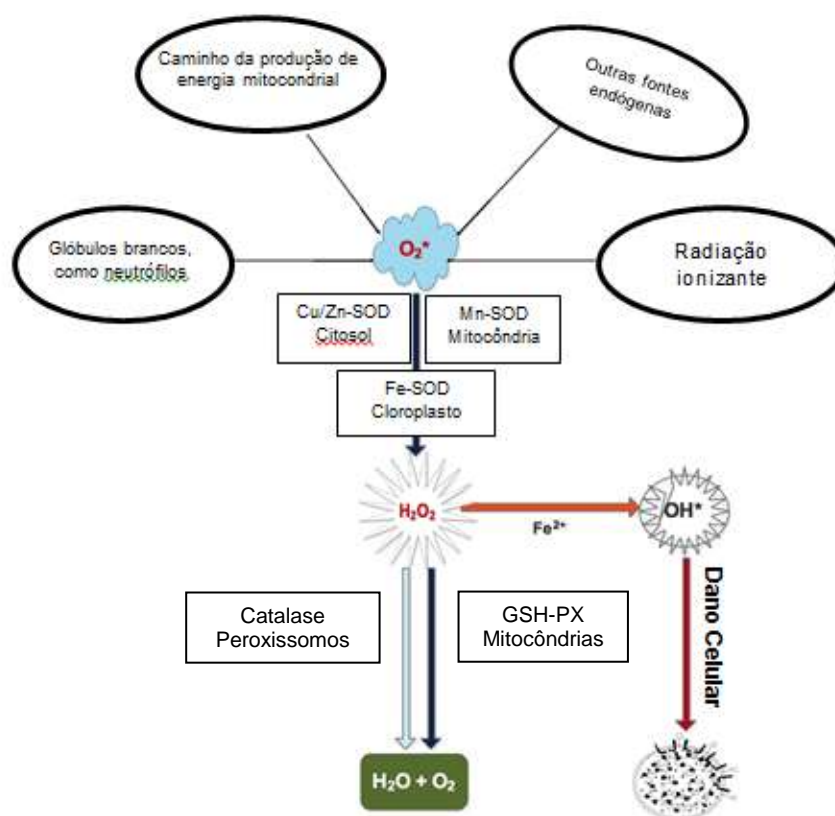
Para minimizar os danos oxidativos provocados pelos altos níveis de ERO o nosso organismo detém de um importante mecanismo de defesa antioxidante endógeno categorizado em enzimático e não enzimático. De acordo com Mut-Salud et al. (2016) os antioxidantes podem ser classificados em três linhas de defesa de acordo com seu mecanismo de ação. São eles:

Antioxidantes de defesa da primeira linha - atuam para suprimir ou impedir a formação de radicais livres ou de espécies reativas nas células, são eles as enzimas superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a catalase (CAT), essenciais para manter os processos fisiológicos normais para o organismo.

A SOD é a primeira enzima de desintoxicação e o antioxidante mais poderoso da célula, apresenta alta atividade catalítica e por isso esta constantemente se renovando. A glutathiona peroxidase é uma importante enzima intracelular que desempenha um papel crucial em inibir o processo de peroxidação lipídica, enquanto que a catalase, localizada principalmente nos peroxissomos protege as células do dano oxidativo (dano no DNA) pela sua capacidade em decompor de moléculas de peróxido de hidrogênio peroxissomal em moléculas de água e oxigênio (Sznarkowska et al., 2017; Ighodaro e Akinloye, 2017). Essas enzimas antioxidantes são indispensáveis na estratégia de defesa no organismo, especialmente em referência ao radical superóxido aniônico ( $*O_2$ ) que é gerado no metabolismo celular normal através de vários processos (Ighodaro e Akinloye, 2017).

O radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) ou radical de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) gerado nos tecidos em reações do metabolismo é cataliticamente convertido em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) pela SOD. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  quando acumulado é tóxico para células e tecidos. Além disso, na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  é convertido em radical hidroxila deletério ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) através da reação de Fenton .

A fim de evitar esse fenômeno, a catalase abundante nos peroxissomos decompõe o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e em oxigênio molecular, reduzindo, conseqüentemente os danos induzidos pelos radicais livres. No entanto, a catalase está ausente na mitocôndria, daí a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para água e peróxidos lipídicos aos seus álcoois correspondentes é realizado pela glutathiona peroxidase (Figura 3).



**Figura 3. Defesa antioxidante de primeira linha contra espécies reativas de oxigênio.** Figura adaptada e modificada de Ighodaro e Akinloye, 2017. (Alexandria Journal of Medicine, 2018, 54: 287-293). <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.

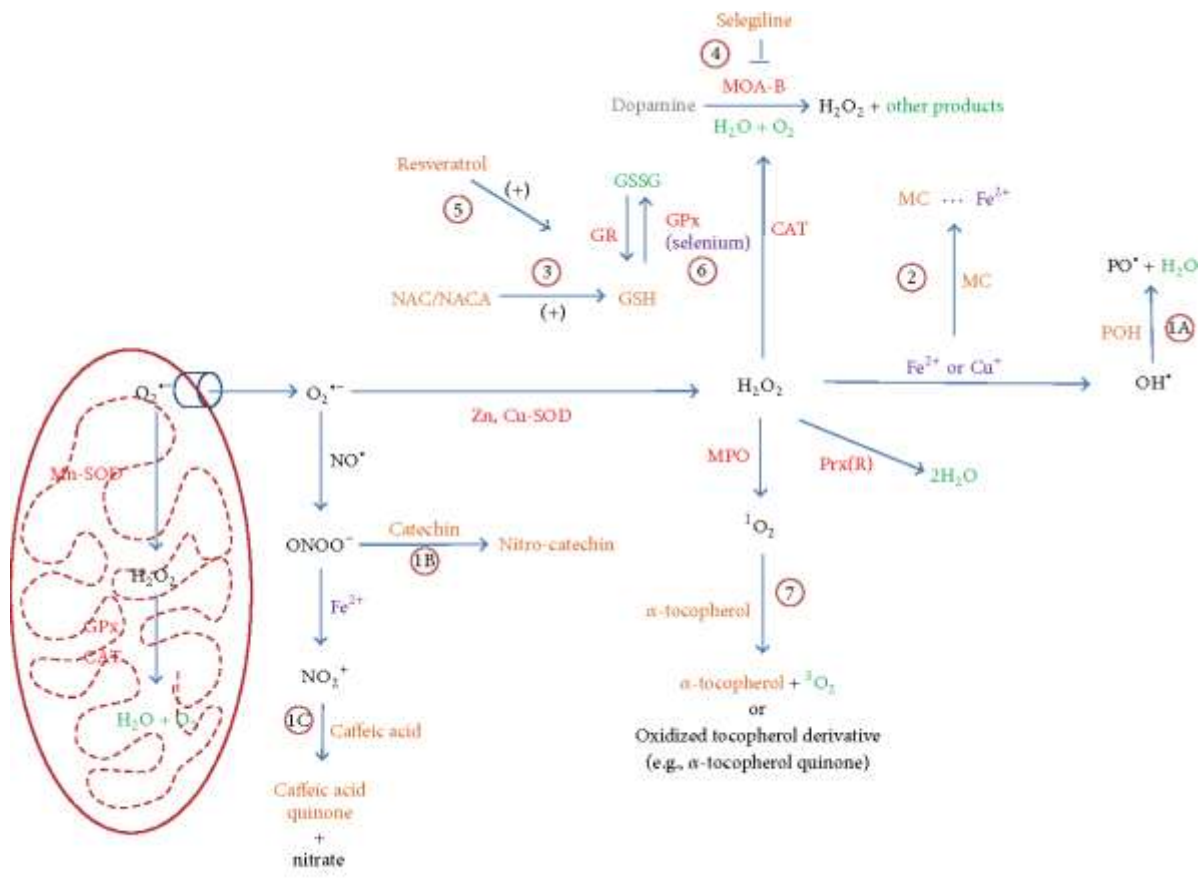
Antioxidantes de defesa da segunda linha – são os antioxidantes não enzimáticos, esses tem a capacidade de inativar rapidamente radicais e oxidantes e, assim, previnem reações em cadeia oxidativa. (Mirónczuka-Chodakowsk et al 2018). Os antioxidantes não enzimáticos são classificados em metabólicos e exógenos (Aslani e Ghobadi, 2016).

Os antioxidantes metabólicos são produzidos endogenamente pelo corpo através de vias metabólicas, são eles a glutatona, ácido lipóico, melatonina, coenzima Q10, ácido úrico, bilirrubina e proteínas de ligação a metal (Pisoschi e Pop, 2015). Essas moléculas possuem funções biológicas muito importantes para o organismo, o ácido úrico, por exemplo, é um eliminador eficaz de oxigênio singlete, radical peroxila e hidroxila, além de proteger a membrana eritrocitária da peroxidação lipídica, a bilirrubina exibe uma efetiva atividade citoprotetora (Pisoschi e Pop, 2015). A melatonina, um eliminador de radical hidroxila tem a capacidade de desintoxicar algumas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, além de atuar como regulador de algumas enzimas antioxidantes e prevenir a geração de níveis crescentes de ERO durante a atividade mitocondrial (Mirónczuk-Chodakowska et al 2018).

Embora o sistema de defesa antioxidante endógeno atue em conjunto para prevenir ou minimizar os danos celulares indesejáveis causados por ERO, é necessário à suplementação de antioxidantes exógenos, ou seja, moléculas obtidas diariamente da alimentação rica em frutas, verduras, bebidas (sucos, vinhos, chá, café), nozes e cereais (Rahal et al., 2014). Os antioxidantes exógenos podem atuar sinergicamente com os antioxidantes endógenos para manter ou estabelecer a homeostase redox e conseqüentemente promover um menor risco no desenvolvimento de doenças induzidas pelo estresse oxidativo. Os compostos fenólicos, carotenoides, vitaminas A, C e E, alguns minerais (selênio, enxofre, zinco) são alguns antioxidantes exógenos de maior importância para a saúde humana.

Os antioxidantes exógenos exercem seus efeitos protetores no organismo através de sete mecanismos de ação (Fraunberger et al., 2016). Conforme a figura 4, o mecanismo da ação dos antioxidantes exógenos sobre os radicais livres ocorre através do processo de (1A) transferência de átomos de hidrogênio como o do grupo hidroxila reativo presente, por exemplo, nas estruturas químicas das vitaminas C e E, de compostos fenólicos e de flavonol; (1B) doação de elétrons; (1C) eliminação direta; 2 quelação de metal; 3 restauração de antioxidantes endógenos; 4 inibição de espécies reativas; 5 agem como suporte de enzimas antioxidantes endógenas; 6 atuam como co-fator em enzimas antioxidantes; 7 quelam o oxigênio singlete.





**Figura 4. Mecanismos de ação de antioxidantes exógenos.** Vermelho: enzimas; verde: outros produtos; roxo: cofator / substrato; negro: espécies reativas; CAT, catalase; MC, quelante de metal; POH, polifenol; GSSG, glutatona oxidada; MPO, mieloperoxidase. Figura adaptada de Fraunberger et al., 2016. (Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v.2016, Article ID 4729192, 14 páginas). <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4729192>.

Antioxidantes de defesa de terceira linha - são representados por enzimas proteolíticas e peptidases (proteínases e proteases), presentes no citosol e nas mitocôndrias das células de mamíferos. Essas enzimas reparam os danos causados por ERO e ou radicais livres às biomoléculas (DNA, proteínas e lipídeos), reconstituem a membrana celular danificada, combate lipídeos oxidados, reconhecem, degradam e removem proteínas modificadas oxidativamente e impedem o acúmulo de proteínas oxidadas (Lobo et al., 2010; Ighodaro e Akinloye, 2017).

Dada a importância do sinergismo entre os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para a manutenção da vida devido a capacidade de promoverem um equilíbrio redox intracelular e diminuição do dano celular indesejável causado por ERO, os antioxidantes exógenos, e em particular os

compostos fenólicos tem ganhado atenção considerável nos últimos anos devido a sua capacidade em atuar como moduladores redox em células cancerígenas (Kaur et al., 2018).

## **2.5. Compostos fenólicos e atividades anticâncer**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos por plantas que possuem pelo menos um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila. Esses compostos são reconhecidos como moléculas importantes para a saúde humana devido a sua elevada capacidade antioxidante em quelar metais pelos grupos hidroxila (Roleira et al., 2015).

O consumo de compostos fenólicos está intimamente relacionado ao menor risco no desenvolvimento de doenças. Estudos demonstram que essas substâncias reduzem o estresse oxidativo (Dzialo et al 2016), apresentam ação quimiopreventiva contra o câncer (Owen et al., 2000; Jafari et al., 2014), antitumoral (Li et al., 2016), antiviral (Karimi et al., 2016) e antibacteriana (Fu et al., 2016).

De acordo com Dzialo et al., (2016) são conhecidos aproximadamente 8,000 mil compostos fenólicos oriundos de vegetais que são classificados em flavonoides (flavonol, flavonas, flavanonas, flavan-3-ols, isoflavonas e antocianidinas) e não flavonoides (ácidos fenólicos, lignanas, estilbenos, taninos e ligninas).

Os flavonoides constituem a maior classe dentro dos compostos fenólicos e de acordo com a sua estrutura química, podem ser divididos em seis subclasses: Flavonas (apigenina, luteolina, tangeritina), flavonol (quercetina, kaempferol, miricetina), flavononas (naringenina), flavan-3-ols (catequina e epicatequina), isoflavonas (genisteína, daidzeína e gliciteína) e antocianidinas (Dzialo et al., 2016). Esses fitoquímicos podem ser encontrados em alguns grãos, sementes, folhas, flores, frutos, bebidas (vinhos, chás, café, sucos) e cacau (Dzialo et al., 2016) e seu consumo está relacionado aos menores riscos no desenvolvimento de doenças.

Os flavonoides apresentam potente atividade antioxidante (Sharma et al., 2013), ação antibacteriana (Mishra et al., 2013, Santos et al., 2016), antiviral (Zandi et al., 2011), anticâncer (Nakachi et al., 2000) e anti-diabético (Cheriet et al., 2016). Além disso, eles inibem o estresse oxidativo (Yu et al., 2015), a peroxidação lipídica (Santos et al., 2018), apresentam ação anticoagulante e antiplaquetária *in vitro* (Chen et a., 2013).

A atividade anticâncer dos flavonoides é bem descrita na literatura. Sua ação quimiopreventiva esta relacionada ao seu potencial em interromper o processo de carcinogênese e seu efeito terapêutico em apresentar atividade citotóxica e antitumoral em várias linhagens cancerígenas.

Os flavonoides apigenina, luteolina, campferol e tangeretina estão entre mais eficazes na inibição do crescimento das células do melanoma murino B16F10 e melanoma humano SK-MEL-1 (Rodriguez et al., 2002; Kwak et al., 2009). A quercetina inibe a expressão da metaloproteinases de matriz extracelular 2 (MMP-2) em células tumorais, reduz a formação de metástase no câncer de próstata (Aalinkeel et al., 2004; Vijayababu et al., 2006) inibe o crescimento, o potencial invasivo e metastático do melanoma B16-BL6 *in vivo* (Caltagirone et al., 2000).

Os flavan-3-ols são representados pelo grupo das catequinas, tais como (+) - catequina, (+) - galocatequina, (-) - epicatequina, (-) - epigalocatequina, (-) - epicatequina 3-galato, (-) - epigalocatequina 3-galato. Os flavan-3-ols atuam como anticancerígenos através de efeitos antioxidantes (Bors et al., 2000; Cos et al., 2004), desintoxicantes (Galati e Brien, 2004), modulando o ciclo celular e induzindo a apoptose (Tan et al., 2000; Chung et al., 2001), estimulam o sistema imunológico (Sharma et al., 2005), reparam o DNA (Haza et al., 2011) e suprimem a metástase (Yance e Sagar, 2006; Guruvayoorappan e Kuttan, 2008).

As catequinas são os principais constituintes do chá verde (*Camellia Sinensis*) e descritas por apresentarem ação quimiopreventiva. Um estudo pré-clínico demonstrou que a ingestão diária de 10 xícaras (equivalente a 120 mL cada xícara) ou a ingestão de comprimidos produzidos com extrato de chá verde diminui o risco de desenvolver câncer além de não apresentar efeitos tóxicos para o ser humano (Nakachi et al., 2000; Fujiki, et al., 2012).

O potencial anticancerígeno das catequinas e das epicatequinas aumenta significativamente se esses compostos forem esterificados com ácido gálico para produzir catequina galato e epicatequina-3-galato. Neste aspecto o epigalocatequina-3-galato é a catequina mais potente na inibição do crescimento celular e na indução da apoptose (Du et al., 2012).

A epigalocatequina-3-galato é a catequina mais abundante do chá verde. Em células de melanoma humano *in vitro* (melanoma amelanótico A-375 e melanoma metastático Hs-294T) este composto apresenta efeito antiproliferativo dose-

dependente, induz a apoptose pela via mitocondrial evidenciada pela diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax e ativação das caspases 9, 7 e 3, além disso, o composto é capaz de inibir a formação de colônias e a parada do ciclo celular sem apresentar efeito citotóxico para os melanócitos normais (Nihal et al., 2005). Um estudo mais recente de Siddiqui et al. (2014) demonstra *in vivo* a eficácia da administração oral de epigallocatequina-3-galato nanoencapsulada (100 µg diluído em 100 µL de PBS/camundongo) na inibição do crescimento do tumor xenoinxerto com células de melanoma humano Mel 928 em comparação com o composto puro (1 mg/ diluído em 100 µL de PBS/camundongo). Neste estudo foi evidenciado que as proteínas chave relacionadas à indução de apoptose (Bax, Bcl-2 e PARP) e inibição do ciclo celular (ciclina e CDKs) foram eficientemente moduladas nos tumores. Estudos têm demonstrado que o epigallocatequina-3-galato apresenta efeito anti-proliferativo e potencial anti-invasivo significativamente maior em células do melanoma humano do que outras catequinas monoméricas, tais como epigallocatequina, epicatequina-3-galato, galocatequina e epicatequina (Ravindranath et al., 2009; Singh e Katiyar, 2011).

Adicionalmente, outro estudo demonstrou que epigallocatequina-3-galato diminui o potencial metastático em células do melanoma B16F10 através do aumento da rigidez celular sem causar qualquer alteração morfológica e conseqüentemente inibe a migração das células tumorais (Watanabe et al., 2012).

Outra importante classe de compostos fenólicos com potencial anticâncer bem descritos na literatura são os taninos. Os taninos são classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (Monteiro et al., 2005). O ácido gálico é um potente antioxidante dietético encontrado em várias plantas, frutas, vinhos e ervas. Possui propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, antivirais, antibacterianas e anticâncer contra várias linhagens celulares tumorais, tais como câncer de pulmão, próstata, hepático, esôfago, melanoma, leucemia, linfoma, cólon, colo do útero e mama (Subramanian et al., 2015) sem apresentar efeitos citotóxicos em células não tumorais (Sun et al., 2016). Em células de melanoma humano

A375.S2, o ácido gálico é descrito por reduzir a viabilidade celular de maneira dose-dependente e induzir a morte celular por apoptose através da elevada expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax, baixa expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, liberação do citocromo c para o citosol, ativação de caspase-9 e caspase-3, além disso, o composto promove a liberação do fator indutor de apoptose e da endonuclease G demonstrando indução da apoptose através de uma via independente de caspases (Lo et al., 2010). Adicionalmente, o ácido gálico apresenta potencial antimetastático *in vitro* através da inibição da migração e da invasão em células de melanoma humano A375.S2, mediada pela baixa expressão dos níveis das metaloproteinases de matriz 2 (MMP-2), enzimas proteolíticas que desempenham papel importante na invasão, metástase e angiogênese de células cancerígenas (Lo et al., 2011). Um estudo *in vivo* demonstrou que a aplicação tópica do ácido gálico em camundongos albinos Swiss com câncer de pele induzido com 7,12, dimetilbenz (A) antraceno (DMBA)/ óleo de Croton, foi capaz de diminuir o tamanho do tumor. Neste estudo, verificou-se que o ácido gálico inibe as fases de iniciação e progressão do tumor através da diminuição dos níveis séricos da lactato desidrogenase (LDH) e das isoenzimas da LDH, modulação do sistema enzimático antioxidante (glutathione transferase e glutathione reduzida) e redução das atividades e da expressão de MMP-2 e MMP-9 (Subramanian et al., 2014).

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Essa classe de taninos é denominada como proantocianidinas devido ao fato de os taninos condensados produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delphinidina, após degradação com ácido mineral diluído à quente. As proantocianidinas podem ser encontradas naturalmente em frutas e bebidas de origem vegetal, tais como em sementes de uvas, cacau, uvas, maçã, chás e vinhos (Pal et al., 2016). As proantocianidinas consistem em subunidades de catequinas e epicatequinas e podem ser classificadas em prodelfinidinas, procianidinas e prorobinetidina.

As prodelfinidinas são descritas na literatura por inibirem a proliferação celular e induzir a apoptose em células cancerígenas por vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas dependentes de caspases (Fu et al., 2017) e parada do

ciclo celular (Fujii et al.,2013). Já as procianidinas, classe mais abundante de proantocianidinas encontrada nas plantas (Fu et al., 2017), não apresenta efeitos tóxicos para células normais (Engelbrecht et a., 2007), porém em células cancerígenas são capazes de inibir a proliferação celular e induzir a morte por apoptose através do aumento de ERO (Kumar et al., 2017), perda do potencial de membrana mitocondrial e ativação da caspase-3 (Hsu et al., 2009).

Sementes de uva são excelentes fontes de proantocianidinas com atividade anticâncer para o melanoma. Recentemente estudos têm demonstrado que as proantocianidinas de sementes de uva, induzem a apoptose *in vitro* e apresentam potencial anti-metastático *in vivo*, pela capacidade de inibir a invasão/migração das células do melanoma humano (A375 e Hs294) pela expressão endógena da COX-2 e pela inativação da  $\beta$ -catenina, um importante componente de adesão célula-célula que regula a expressão de vários genes alvos que medeiam os processos celulares de proliferação e migração celular (Vaid et al., 2011; Vaid et al., 2015; Vaid et al., 2016). Além disso, o extrato da semente de uva é capaz de inibir 26% do número de nódulos pulmonares de melanoma metastático em ratos (Martínez et al., 2005).

## 2.6. Melanoma

O melanoma cutâneo maligno é o tipo de câncer de pele mais agressivo devido ao seu forte potencial metastático e resistência ao tratamento. O melanoma resulta da proliferação descontrolada dos melanócitos, células especializadas em produzir melanina, pigmento natural que pode ser encontrado em todo o corpo, incluindo a pele, folículos pilosos, íris, esôfago, meninges, superfícies da mucosa oral e anogenital (Gloster e Neal, 2006; Narayanan, Saladi e Fox, 2010; Schadendorf et al., 2015; Mort, Jackson e Patton, 2015).

O melanoma apresenta forte associação com a exposição à radiação ultravioleta e é mais comumente desenvolvido em superfícies expostas, tais como tronco dos homens (peitos e costas) ou, em membros inferiores (pernas) nas mulheres (Gloster e Neal, 2006; Narayanan, Saladi e Fox, 2010).

Sua incidência está aumentando cada vez mais rápido do que qualquer outro tumor sólido (Eggermont, Spatz e Robert, 2014). De acordo com a *American Cancer Society*, esta neoplasia tem aumento muito nos últimos 30 anos, com taxas 20 vezes mais comum em populações de pele branca do que em populações de pele escura. No geral, o risco para se desenvolver o melanoma é cerca de 2,5% (1 em 40) para brancos, 0,5% (1 em 200) para os hispânicos e 0,1% (1 em 1.000) para negros.

Segundo dados da *American Cancer Society*, em 2017 foi diagnosticado cerca de 87 mil novos casos de melanoma nos Estados Unidos, sendo cerca de 52 mil em homens e 35 mil em mulheres. As taxas de mortalidade estimavam aproximadamente 9 mil mortes, sendo cerca de 6 mil para homens e 3 mil para mulheres. Os estados Califórnia, Flórida e Nova York são os que apresentam maiores taxas para novos casos, cerca de 9 mil, 7 mil e 5 mil, respectivamente.

No Brasil, o número de novos casos é menor comparado aos dados dos Estados Unidos. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2018 estimam cerca de 6,260 novos casos de melanoma, sendo 2,920 novos casos para homens e 3,340 novos casos para mulheres. Desse total, os estados que apresentam maiores taxas de incidência são: Santa Catarina (6,14 casos para cada 100 mil homens e 5,33 casos para cada 100 mil mulheres), Rio Grande do Sul (5,71 casos para cada 100 mil homens e 4,74 casos para cada 100 mil mulheres), Paraná (4,86 casos para cada 100 mil homens e 4,39 casos para cada 100 mil mulheres),

Goiás (3,91 casos para cada 100 mil homens), São Paulo (3,27 casos para cada 100 mil homens e 3,17 casos para cada 100 mil mulheres), Mato Grosso do Sul (3,18 casos para cada 100 mil homens e 2,56 casos para cada 100 mil mulheres).

### **2.6.1. Fatores de risco**

Ainda não se pode afirmar com certeza a razão do aumento drástico da incidência do melanoma ao longo das últimas décadas. No entanto, os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma podem ser divididos em fatores extrínsecos e intrínsecos que incluem maior exposição à radiação ultravioleta, seja solar ou artificial, exposição a produtos químicos, medicamentos, presença de nevos, e histórico familiar (Ali, Yousaf e Larkin, 2013).

A radiação ultravioleta (UV) é o mais importante carcinógeno ambiental para o desenvolvimento do melanoma. Ela é composta por três comprimentos de onda: radiação UVA (320-400 nm), UVB (290–320 nm) e UVC (254 nm). Cada uma dessas radiações apresentam características físicas e efeitos biológicos distintos.

As radiações ultravioletas são de extrema importância para o organismo, pois converte a 7-diidrocolesterol em vitamina D, essencial para o metabolismo do cálcio no organismo e prevenção do melanoma (Merlino et al., 2016). No entanto, exposição intermitente aos raios ultravioleta apresentam efeitos nocivos através de mecanismos diretos e indiretos na pele, tais como mutações, formação de dímeros de ciclobutano pirimidina, indução da produção de espécies reativa de oxigênio, imunossupressão e produção de fatores de crescimento (Garibyan e Fisher, 2010; Pfeifer e Besaratinia, 2012; Lo e Fisher, 2014; Nikolaou e Stratigos, 2014).

Radiação UVA e UVB estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento do câncer de pele, em particular o melanoma (Setlow RB, 1974; Langford et al., 1998; Woodhead et al. 1999). UVA provoca danos diretamente no DNA por meio da geração de radicais livres altamente reativos (Baier et al., 2006). Já a radiação UVB, afeta diretamente as pirimidinas adjacentes na dupla hélice do DNA e causam uma reação fotoquímica. A radiação UVB é absorvida pelos resíduos de timina e citosina, resultando na formação de fotoprodutos mutagênicos, incluindo dímeros de ciclobutano pirimidina ou 6-4 fotoprodutos que contribuem para a malignidade.

Por outro lado, a radiação UVC não apresenta qualquer envolvimento no desenvolvimento do câncer de pele, pois é totalmente absorvida pelo oxigênio e pela



camada de ozônio da atmosfera, assim não atinge a superfície da terra e não contribui para os danos na pele em seres humanos.

Outros fatores de risco extrínsecos não tão proeminentes quanto a radiação UV são exposição a medicamentos e produtos químicos. Psoralen é um medicamento muito utilizado para o tratamento de psoríase e outras condições dermatológicas, no entanto o indivíduo em tratamento deve evitar ao máximo a exposição solar, pois a radiação UVA provoca um grau substancial de danos celulares, aumentando 10 vezes o risco de desenvolvimento do melanoma 15 anos após o tratamento (Stern, 2001).

A exposição a metais pesados e a certos produtos químicos, tais como pesticidas, hidrocarboneto policíclicos (por exemplo, indivíduos que trabalham em indústrias associadas com petróleo, impressão e eletrônica) está associada a um risco aumentado de melanoma, presumivelmente através da reação com a radiação UVA que gera radicais livres que então provoca alterações mutagênicas ao DNA dos melanócitos (Fortes e Vries, 2008).










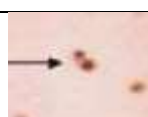
Além disso, o histórico familiar é outro fator associado com maior risco para o desenvolvimento do melanoma e corresponde cerca de 10% dos diagnósticos com dois ou mais parentes afetados (Eggermont, Spatz e Robert, 2014). Esses indivíduos apresentam maiores chances de ter alterações nos genes CDKN2A, CDK4, MC1R, BRAF, p16 / ARF provocadas por radiações ultravioleta. Essas alterações levam ao acúmulo de mutações genéticas nos melanócitos que ativam oncogenes, inativam genes supressores de tumor e prejudicam mecanismos de reparo do DNA iniciando o processo neoplásico melanoma (Schadendorf et al., 2015; Arrangoiz et al., 2016).

### **2.6.2. Diagnóstico clínico**

O diagnóstico precoce do melanoma permite que o tratamento seja realizado numa fase em que a cura pode ser facilmente alcançada através da excisão cirúrgica (Thompson, Scolyer, Kefford, 2005).

A primeira etapa do diagnóstico clínico do melanoma é realizada pelo sistema acrônimo utilizado globalmente, chamado ABCDE (Figura 5). Este sistema destaca as principais características físicas reconhecíveis do melanoma, como: assimetria (A), bordas irregulares (B), coloração variável (C), diâmetro superior a 6

mm (D) e evolução (E) (Abbasi et al., 2004). De acordo com Tuong et al (2012), cada sinal de um provável melanoma maligno apresenta uma característica distinta comparado ao nevo benigno.

Não Melanoma	Melanoma	Características clínicas do melanoma
		<b>A – Assimetria</b> – A maioria dos melanomas malignos iniciais crescem em ritmo irregular, resultando em assimetria. Esta assimetria difere das lesões pigmentadas benignas que são tipicamente redondas e simétricas.
		<b>B – Bordas irregulares</b> - A taxa de crescimento desigual normalmente faz com que os melanomas tenham uma borda irregular, ao contrário das lesões benignas pigmentadas, que tipicamente apresentam margens regulares.
		<b>C – Coloração variável</b> – Melanomas maculares apresentam cores variadas desde marrom, preto, vermelho e branco. As lesões benignas são geralmente de cor uniforme.
		<b>D – Diâmetro</b> – A maioria dos melanomas apresentam diâmetros de pelo menos 6 mm no momento do diagnóstico.
		<b>E – Evolução</b> – Os clínicos devem observar qualquer nevo evoluindo, particularmente focando mudanças na forma, tamanho, sintomas (comichão), superfície (sangramento, formação papular ou nodular) e pigmentação ao longo do tempo.

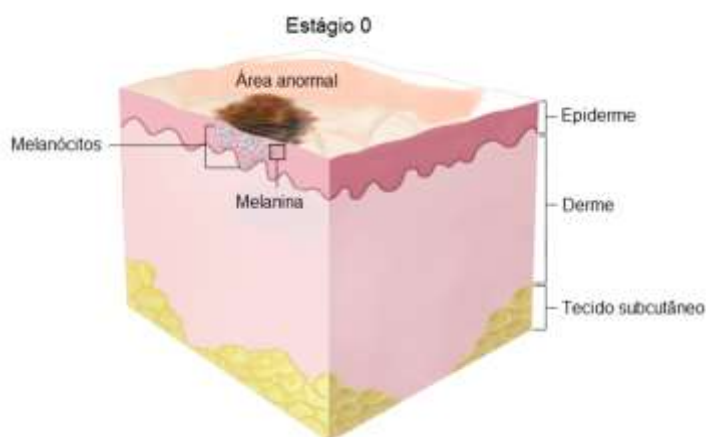
**Figura 5.** Sistema acrônimo ABCDE utilizado globalmente para detectar as principais características físicas reconhecíveis do melanoma.

Esses critérios de avaliação não fornecem um modelo abrangente de todas as características do melanoma, sendo necessária a realização de biópsias para ter um diagnóstico confiável da doença (Tsao et al., 2015).

De acordo com *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, o sistema de estadiamentos do melanoma é classificado de acordo com a extensão da doença, podendo ser classificado em estágio 0, I, II, III e IV. Pacientes diagnosticados em estágios iniciais apresentam sobrevida maior, enquanto que em estágios avançados o prognóstico de sobrevida em cinco anos é de 40 % para o estágio III e de 15 a 20 % para o estágio IV (ACS, 2016).

### Estágio 0 (melanoma *in situ*)

O termo melanoma *in situ* refere-se a uma proliferação de melanócitos com núcleos alargados que crescem num padrão irregular inteiramente dentro da epiderme (Figura 6) (Shain e Bastian, 2016). Os melanomas *in situ* podem persistir por muitos anos antes de se tornarem invasivos, indicando que o crescimento invasivo requer alterações genéticas adicionais e fatores de crescimento (Weinstock e Sober, 1987; Shain e Bastian, 2016).

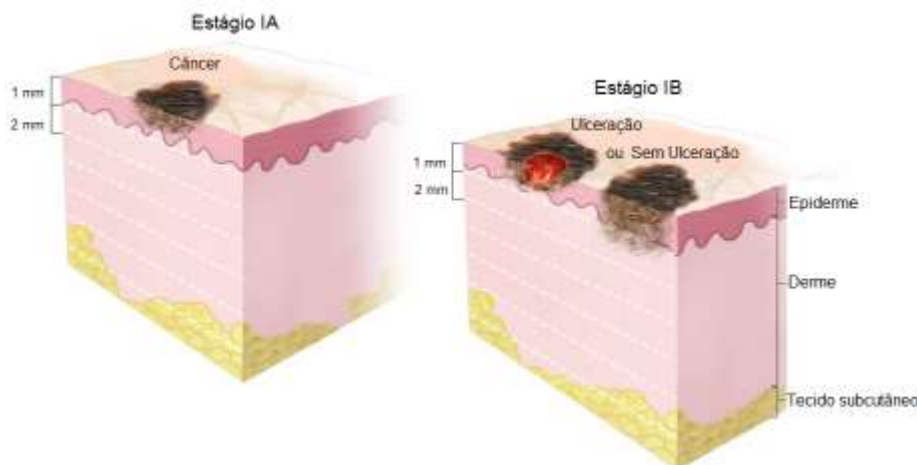


**Figura 6 – Estágio 0 do melanoma *in situ*.**

Fonte: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/#CDR0000062917\\_rl\\_884\\_1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/#CDR0000062917_rl_884_1)

### Estágio I

Neste estágio do câncer o processo neoplásico já é evidente. Esse estágio é dividido em estágio IA e IB. No estágio IA, o tumor não apresenta ulceração na pele e seu tamanho não ultrapassa mais do que 1 milímetro de espessura. Já no estágio IB, o tumor apresenta ulceração e espessura maior que 1 milímetro e menor que 2 milímetros (Figura 7).



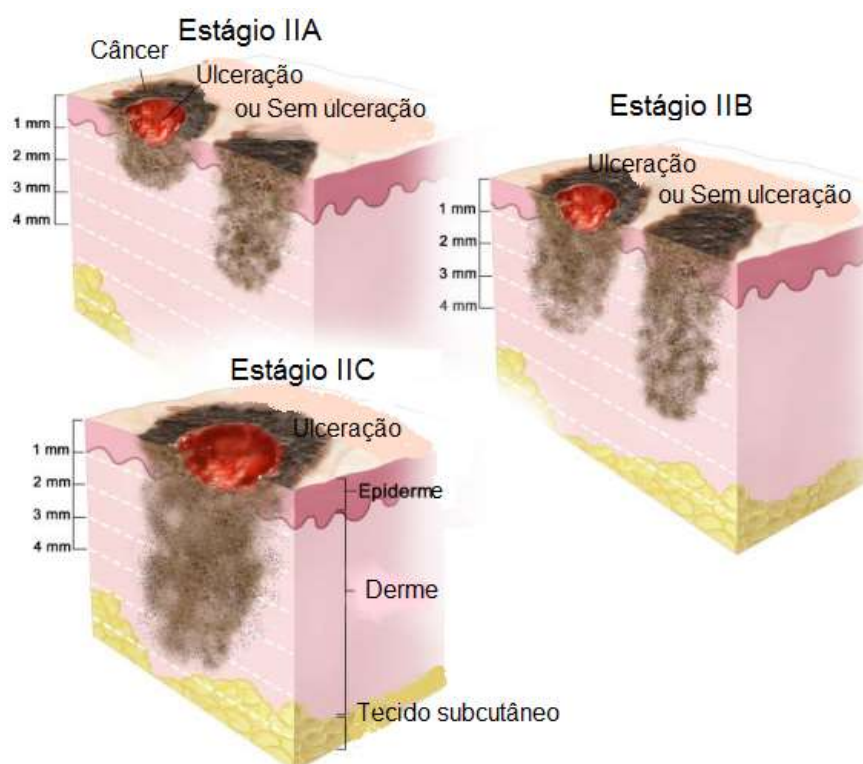
**Figura 7 – Estágio I do melanoma**

Fonte: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/#CDR0000062917\\_rl\\_884\\_1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/#CDR0000062917_rl_884_1)

## Estágio II

O estágio II do melanoma é dividido em estágios IIA, IIB, e IIC. No estágio IIA, o tumor pode apresentar de 1 à 2 milímetros de espessura, com ulceração na pele ou apresentar de 2 à 4 milímetros de espessura, sem ulceração.

No estágio IIB, o tumor apresenta de 2 à 4 milímetros de espessura, com ulceração ou apresenta mais do que 4 milímetros de espessura, sem ulceração. Já no estágio IIC, o tumor apresenta espessura maior que a ulceração (Figura 8). O risco do quadro metastático e morte correlaciona-se com a profundidade da invasão dos melanócitos. Neste aspecto uma vez que as células do melanoma deixam a epiderme e entram no tecido mesenquimal subjacente, como a derme ou subcutâneo, o melanoma se tornou invasivo (Shain e Bastian, 2016).



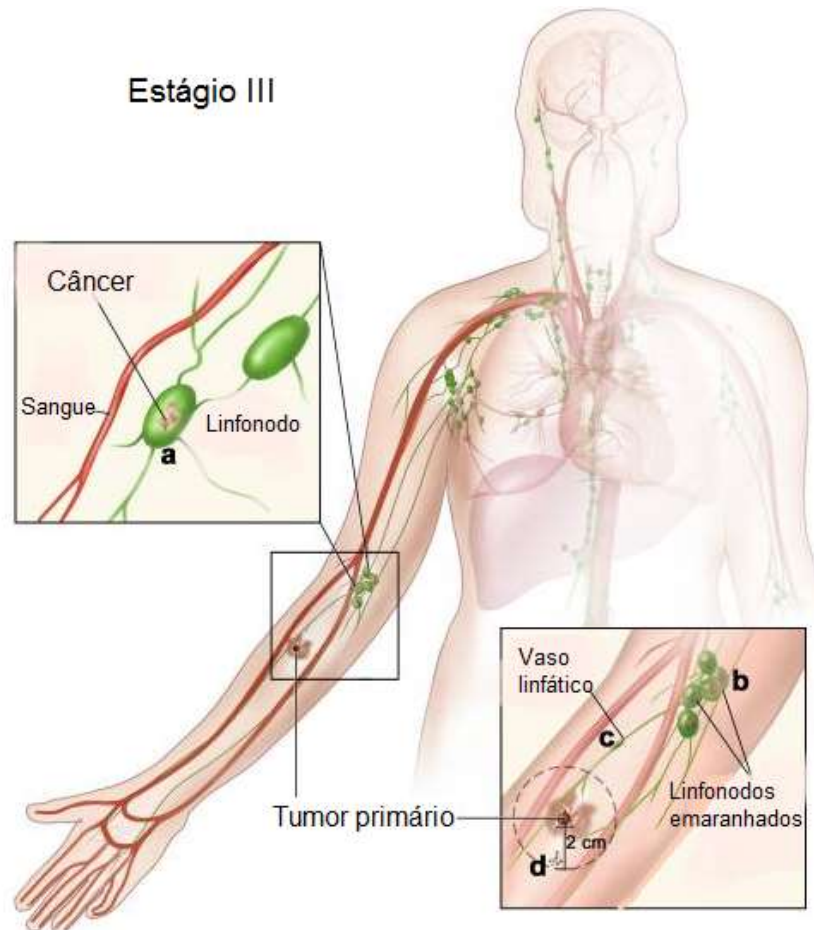
**Figura 8 – Estágio II do melanoma**

Fonte: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/#CDR0000062917\\_r1\\_884\\_1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/#CDR0000062917_r1_884_1)

## Estágio III

O tumor neste estágio pode ser de qualquer espessura, apresentando ulceração ou não. Figura 9 (a) as células cancerígenas se espalham para um ou mais nódulos linfáticos; (b) os gânglios linfáticos com câncer podem formar emaranhados; (c) o câncer podem estar num vaso linfático entre o tumor primário e

os gânglios linfáticos; e / ou (d) tumores muito pequenos podem ser encontrados sobre ou sob a pele, não mais do que 2 centímetros de distância a partir do tumor primário.

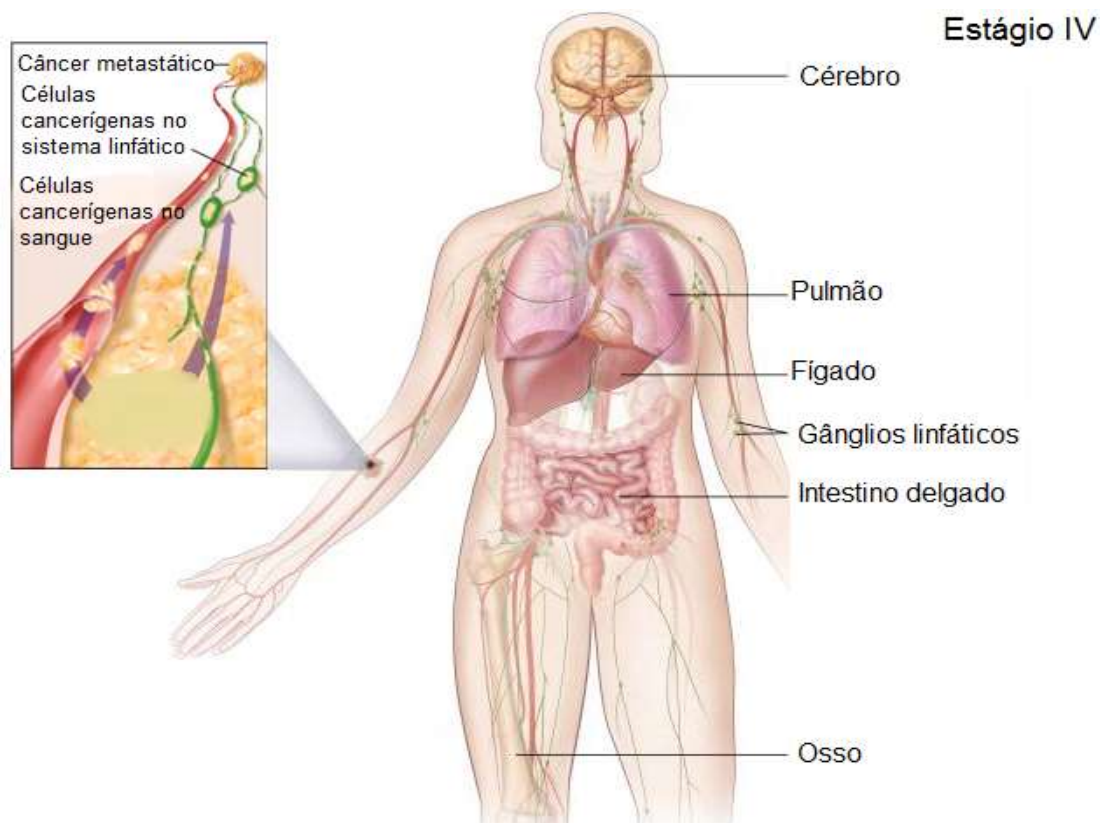


**Figura 9 – Estágio III do melanoma.**

Fonte: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/#CDR0000062917\\_rl\\_884\\_1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/#CDR0000062917_rl_884_1)

### **Estágio IV**

O estágio IV é caracterizado como melanoma metastático, ou seja, as células do tumor primário se desprendem, migram e colonizam outros órgãos (Figura 10). Semelhante a muitos tumores sólidos, a metástase do melanoma geralmente aparece primeiro nos gânglios linfáticos da área de drenagem do tumor primário, e tendem a disseminar-se para vários órgãos, tais como cérebro, pulmão, fígado, glândulas linfáticas, intestino delgado e ossos, tornando o uso das intervenções cirúrgicas limitadas (Balch et al. , 2001; Soengas e Lowe, 2003; Shain e Bastian, 2016).



**Figura 10 – Estágio IV do melanoma.**

Fonte: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/#CDR0000062917\\_rl\\_884\\_1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/#CDR0000062917_rl_884_1)

### 2.6.3. Tratamento do melanoma

A identificação e o tratamento precoce do melanoma são ferramentas clínicas essenciais para minimizar o alto índice de mortalidade. Atualmente, a cirurgia, quimioterapia, terapia de radiação, imunoterapia e a terapia-alvo são os cinco tipos de tratamento padrão utilizados em pacientes com melanoma. O método do tratamento depende da fase e da localização do tumor.

A remoção cirúrgica com margens de segurança preferencialmente dentro de 4 a 6 semanas do diagnóstico inicial é a opção de tratamento padrão ouro predominante para pacientes com melanoma cutâneo primário que têm gânglios linfáticos regionais clinicamente negativos (Schadendorf et al., 2015; Garbe et al., 2016). Em casos avançados onde a cirurgia já não é significativa, o uso da quimioterapia é essencial.

Atualmente, existem 29 drogas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do melanoma. A dacarbazina e a

temozolomida são as drogas quimioterápicas mais utilizadas, individualmente ou combinadas com outras drogas. A dacarbazina é uma droga alquilante administrada por via intravenosa que permite remissões completas apenas em 5 - 10% dos pacientes (Serrone et al., 2000; Eggermont e Kirkwood, 2004). A inibição da síntese do DNA, do RNA e de proteínas, são um dos mecanismos de ação da dacarbazina. Estes dados mostram que a dacarbazina é capaz de gerar vários metabolitos tóxicos que podem ser responsáveis pelos seus efeitos biológicos (Al-Badr e Alodhaib, 2016). A Temozolomida, um derivado da dacarbazina apresenta permeabilidade mais elevada e tem sido relatada por melhorar a resposta contra as metástases cerebrais, mas não aumenta significativamente a sobrevivência global (Soengas e Lowe, 2003).

A radioterapia é outra forma de tratamento para o melanoma. Essa terapia tem sido utilizada desde a década de 1970 em áreas onde a excisão cirúrgica teve sucesso limitado (Khan et al., 2011). Entre as principais causas de morte celular promovida pela radioterapia, destaca-se a apoptose envolvendo a via p53 e caspases efetoras (Espenel et al., 2017). Além disso, a radioterapia melhora a resposta antitumoral quando combinada com o tratamento de imunoterapia (Dewan et al., 2009; Pal et al., 2015).

Diferentemente das terapias anteriores, a imunoterapia, estimula o sistema imunológico do paciente a reconhecer e destruir células cancerosas de forma mais eficaz. O uso desta terapia é muito apreciado no tratamento do melanoma, principalmente já em estado avançado (metástase). A interleucina-2 foi o primeiro medicamento imunitário a ser aprovado para o melanoma metastático em 1998 e aprovado com bases na resposta de longa duração. No entanto, seus efeitos colaterais podem incluir sintomas semelhantes aos da gripe, tais como febre, calafrios, dores, fadiga acentuada, sonolência e baixa quantidade de células sanguíneas (ACS, 2017).

Pembrolizumabe e nivolumabe são outros medicamentos também utilizados no melanoma metastático, que melhoram a sobrevida global e sobrevida livre comparada à dacarbazina e a ipilimumabe (Moreno et al., 2015; Weber et al., 2015; Robert et al., 2015). Esses medicamentos têm como alvo principal a PD-1, uma proteína expressa na superfície das células do sistema imunológico, denominadas células T. Quando as proteínas PD-1 se ligam a PD-L1 (proteína que é expressa em

células normais e tumorais), impedem que as células T ataquem outras células do corpo. O bloqueio da ligação de PD-1 e PD-L1 aumenta a resposta imunológica do organismo contra as células do melanoma metastático (Topalian et al., 2012; Hamid et al., 2013).

A compreensão crescente das vias moleculares envolvidas no melanoma tem apresentado novas perspectivas para a cura da doença. Terapias alvo tem se tornado uma opção de tratamento para muitos pacientes. Agentes como Vemurafenib, dabrafenib e trametinib tem como alvo as vias RAS/RAF, MEK, ERK e MAPK envolvidas no melanoma. Esses agentes tiveram aprovação da FDA para o tratamento do melanoma, após demonstrarem efeitos positivos na sobrevivência de pacientes (Strickland et al., 2015). Por sua vez, assim como outros agentes utilizados para tratar o melanoma, esses inibidores também apresentam efeitos secundários no organismo e resistência ao melanoma (Strickland et al., 2015).

De maneira geral, os diferentes tipos de tratamentos visam células tumorais, no entanto, células da medula, do trato digestivo e células foliculares pilosas também são afetadas resultando em efeitos colaterais como mielossupressão (diminuição da produção de células sanguíneas), mucosite (inflamação do revestimento do aparelho digestivo), perda de cabelo, cardiotoxicidade, neurotoxicidade e imunossupressão. Outra limitação é a resistência das células tumorais as terapias disponíveis.

Neste sentido, a busca por novos agentes terapêuticos capazes de tratar o melanoma com baixo efeito colateral e nenhuma resistência ao longo do tratamento tem sido um grande desafio. Assim, a busca por novas alternativas oriundas de plantas medicinais é plausível, uma vez que estudos têm demonstrado que diversos fitoquímicos além de não serem tóxicos ou apresentarem baixa toxicidade, exibem potencial no tratamento do melanoma (Saleem et al., 2008; Bhattacharya, Darjatmoko e Polans, 2011; Harris et al., 2016; Ng et al., 2018).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar a composição química do extrato aquoso das cascas do caule de *Stryphnodendron adstringens* (EASA) e avaliar suas propriedades antioxidante e anticâncer contra células de melanoma B16F10Nex-2.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Investigar a composição química do extrato aquoso das cascas do caule de *Stryphnodendron adstringens* (EASA).

- Determinar a atividade antioxidante do EASA pelo método de captura dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico de 2,2'-azino-bis (ABTS) e 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidroclorato (AAPH).

- Avaliar o efeito anticâncer do EASA em células de melanoma murino B16F10Nex-2.

- Investigar os mecanismos de morte celular na linhagem celular B16F10Nex-2, promovidos pelo EASA.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aalinkeel R, Nair MP, Sufrin G, Mahajan SD, Chadha KC, Chawda RP, Schwartz SA. Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64:5311-5321.

Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, McCarthy WH, Osman I, Kopf AW, Polsky D. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *Jama.* 2004;292:2771-2776.

Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3:23-34.

Agra MDF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PFD, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18:472-508.

Al-Badr AA, Alodhaib MM. Chapter Four-Dacarbazine. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2016;41:323-377.

Albuquerque UP, Monteiro JM, Ramos MA, de Amorim ELC. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2007;110:76-91.

Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl.* 2013;11: 81–91.

Almeida AC, Sobrinho EM, Pinho LD, Silva PN, Martins ER, Duarte ER. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Cienc Rural.* 2009;40:200-203.

Andrade L, Castro D, Chen-Chen L. Efeito modulador do extrato de *Stryphnodendron adstringens* Mart.(barbatimão) contra danos induzidos pela mitomicina C em camundongos. *J Braz Soc Ecotoxicol.* 2006;1:127-130.

American Cancer Society (ACS). Melanoma skin cancer detailed guide. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates-for-melanoma-skin-cancer-by-stage.html>. Acesso em: 31 jul. 2016.

American Cancer Society (ACS). Immunotherapy for Melanoma Skin Cancer. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/immunotherapy.html#references>  
Acesso: 12 jan. 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: *Farmacopéia Brasileira*. volume 2. 5ª Ed. Brasília, 2010, pp. 889.

Apsen Farmacêutica. FITOSCAR *Stryphnodendron adstringens* (Mart.). Disponível em:

[http://www.apsen.com.br/novas\\_bulas/aberta2/FITOSCAR\\_Bula\\_Paciente\\_V02.pdf](http://www.apsen.com.br/novas_bulas/aberta2/FITOSCAR_Bula_Paciente_V02.pdf)

Acesso em: 22 jun. 2016.

Arrangoiz R, Dorantes J, Cordera F, Juarez MM, Paquentin EM, León, E. L. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. *J Cancer Res Ther.* 2016;4:1-15.

Aslani BC, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci.* 2016;146:163–173.

Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, Rollinger JM, Schuster D, Breuss JM, Bochkov V, Mihovilovic MD, Kopp B, Bauer R, Dirsch VM, Stuppner H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv.* 2015;33:1582-1614.

Audi EA, Toledo CM, Santos FS, Bellanda PR, Alves-Do-Prado W, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Sakuragui CM, Bersani-Amado A, Palazzo De Mello JC. Biological Activity and Quality Control of Extract and Stem Bark From *Stryphnodendron adstringens*. *Acta Farm Bonaerense.* 2004;23:328-333.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 2001;19:3622-3634.

Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Bäuml W. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophys J.* 2006;91:1452-1459.

Bailão EF, Devilla IA, da Conceição EC, Borges LL. Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. *Int J Mol Sci.* 2015;16:23760-23783.

Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1997;37:693-704.

Bardal, D. (2011). Atividade antimicrobiana de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville em agentes causadores da mastite. 181p. (Dissertação - Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG).

Bhattacharya S, Darjatmoko SR, Polans AS. Resveratrol modulates the malignant properties of cutaneous melanoma via changes in the activation and attenuation of the anti-apoptotic proto-oncogenic protein Akt/PKB. *Melanoma Res.* 2011;21:180-187.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5:9-19.

Bors W, Michel C, Stettmaier K. Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. *Arch Biochem Biophys.* 2000;374:347–355.

Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução - RDC N° 10 de 09/03/2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Brasília: ANVISA, 2010.

Bürger ME, Ahlert N, Baldisserotto B, Schirmer B, Foletto R. Investigação da atividade abortiva e/ou infertilizante de *Stryphnodendron adstringens* (Mart. Coville). *Braz J Vet Res An Sci.* 1999;36:296-299.

Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 2004;74:2157-2184.

Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer.* 2000;87:595-600.

Campos JF, de Castro DTH, Damião MJ, Vieira Torquato HF, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Estevinho LM, Souza KP, dos Santos EL. The chemical profile of *Senna velutina* leaves and their antioxidant and cytotoxic effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016.

Campos JF, Espindola PPT, Torquato HFV, Vital WD, Justo GZ, Silva DB, Carollo CA, de Picoli Souza K, Paredes-Gamero EJ, dos Santos EL. Leaf and root extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) promote apoptotic death of leukemic cells via activation of intracellular calcium and caspase-3. *Front Pharmacol.* 2017;8:466.

Casagrande JC, Macorini LFB, Antunes KA, dos Santos UP, Campos JF, Dias-Júnior NM, Sangalli A, Cardoso CAL, Vieira MDC, Rabelo LA, Paredes-Gamero EJ, dos Santos EL, Souza KP. Antioxidant and cytotoxic activity of hydroethanolic extract from *Jacaranda decurrens* leaves. *PLoS One.* 2014;9:112748.

Cheyrier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:223S-229S.

Chen XQ, Wang XB, Guan RF, Tu J, Gong ZH, Zheng N, Yang JH, Zhang YY, Ying MM. Blood anticoagulation and antiplatelet activity of green tea (-)-epigallocatechin (EGC) in mice. *Food Funct.* 2013;4:1521-1525.

Cheriet T, Hanfer M, Boudjelal A, Baali N, Mancini I, Seghiri R, Ameddah S, Menad A, Benayache F, Benayache S. Glycosyl flavonoid profile, in vivo antidiabetic and in

vitro antioxidant properties of *Linaria reflexa* Desf. *Nat Prod Res.* 2016;31:2042-2048.

Chinembiri TN, Du Plessis LH, Gerber M, Hamman JH, Du Plessis J. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules.* 2014;19:11679-11721.

Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest.* 2015;115:813-824.

Chung L, Cheung T, Kong S, Fung K, Choy Y, Chan Z, Kwok T. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci.* 2001;68:1207–1214.

Coelho JM, Antonioli AB, Nunes e Silva D, Carvalho TMMB, Pontes ERJC, Odashiro AN. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Rev Col Bras Cir.* 2010;37:45-51.

Cos P, Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe DV, Vlietinck A. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem.* 2004;11:1345–1359.

Costa MA, Ishida K, Kaplum V, Koslyk ED, de Mello JC, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) for use as a pharmacological agent. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010;58:330-335.

Coutinho H. (2004). Ação cicatrizante experimental do *Stryphnodendron Adstringens* (Barbatimão) em estudo comparativo com o gluconato de clorexidina a 0,12% com definição de dosagem. 136p. (Tese - Universidade de Brasília, UNB).

de Freitas ALD, Kaplum V, Rossi DCP, da Silva LBR, Melhem MSC, Taborda CP, de Mello JCP, Nakamura CV, Ishida K. Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against *Candida spp.* isolates and for vaginal candidiasis treatment. *J Ethnopharmacol.* 2018;216:184-190.

Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, Dewyngaert JK, Babb JS, Formenti SC, Demaria S. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin Cancer Res.* 2009;15:5379-5388.

Dias MI, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira IC. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Ind Crops Prod.* 2016;82:9-22.

Diouf PN, Stevanovic T, Cloutier A. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Piceamariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chem.* 2009;113:897-902.

Dzialo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *Int J Mol Sci.* 2016;17:160.

Du GJ, Zhang Z, Wen XD, Yu C, Calway T, Yuan CS, Wang CZ. Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients*. 2012;4:1679-1691.

Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schüz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, Bray F. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk?. *Int J Cancer*, v. 132, n. 2, p. 385-400, 2013.

Eggermont AM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer*. 2004;40:1825-36.

Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2014;383:816-827.

Espenel S, Vallard A, Rancoule C, Garcia MA, Guy JB, Chargari C, Deutsch E, Magné N. Melanoma: Last call for radiotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;110:13-19.

Faião-Flores F, Quincoces Suarez JA, Fruet AC, Maria-Engler SS, Pardi PC, Maria DA. Curcumin analog DM-1 in monotherapy or combinatory treatment with dacarbazine as a strategy to inhibit in vivo melanoma progression. *PloS one*. 2015;10:e0118702.

Fank-de-Carvalho, S.M.; Somavilla, N.S.; Marchioretto, M.S.; Bão, S.N. Plant structure in the Brazilian neotropical savannah species. In book: Biodiversity in Ecosystems—Linking Structure and Function; Lo, Y., Blanco, J.A., Roy, S., Eds.; InTech: Rijeka, Croatia, 2015;425–459.

Felipe AM, Rincão VP, Benati FJ, Linhares RE, Galina KJ, de Toledo CE, Lopes GC, de Mello JC, Nozawa C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. *Biol Pharm Bull*. 2006;29:1092-1095.

Ferrão BH, Oliveira HB, Molinari RF, Teixeira M, Fontes GG, Amaros MOF, Rosa MB, Carvalho CA. Importância do conhecimento tradicional no uso de plantas medicinais em Buritis, MG, Brasil. *CeN*. 2014;36:321-334.

Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011;194:7-15.

Formagio AS, Vieira Mdo C, Dos Santos LA, Cardoso CA, Foglio MA, de Carvalho JE, Andrade-Silva M, Kassuya CA. Composition and evaluation of the anti-inflammatory and anticancer activities of the essential oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. *J Med Food*. 2013;16:20-25.

Formagio AS, Kassuya CA, Neto FF, Volobuff CR, Iriguchi EK, do C Vieira M, Foglio MA. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. *BMC Complement Altern Med*. 2013;14.

Fortes C, Vries E. Nonsolar occupational risk factors for cutaneous melanoma. *Int J Dermatol*. 2008;47:319-328.

Fraunberger EA, Scola G, Laliberté VLM, Duong A, Andreazza AC. Redox modulations, antioxidants, and neuropsychiatric disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1-14.

Fu Y, Ye X, Lee M, Rankin G, Chen YC. Prodelphinidins isolated from Chinese bayberry leaves induces apoptosis via the p53-dependent signaling pathways in OVCAR-3 human ovarian cancer cells. *Oncol Lett*. 2017;13:3210-3218.

Fujii W, Toda K, Kawaguchi K, Kawahara SI, Katoh M, Hattori Y, Fujii H, Makabe H. Syntheses of prodelphinidin B3 and C2, and their antitumor activities through cell cycle arrest and caspase-3 activation. *Tetrahedron*. 2013;69:3543-3550.

Fujiki H, Imai K, Nakachi K, Shimizu M, Moriwaki H, Suganuma M. Challenging the effectiveness of green tea in primary and tertiary cancer prevention. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138:1259-1270.

Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:287-303.

Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, Grob JJ, Malvehy J, Newton-Bishop J, Stratigos AJ, Pehamberger H, Eggermont AM. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline—Update 2016. *Eur J Cancer*. 2016;63:201-217.

Gariyban L, Fisher DE. How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep*. 2010;12:319-326.

George BPA, Abrahamse H, Hemmaragala NM. Caspase dependent apoptotic inhibition of melanoma and lung cancer cells by tropical Rubus extracts. *Biomed Pharmacother*. 2016;80:193-199.

Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem*. 2002;383:375-388.

GLOBOCAN 2012, Population Fact Sheets. Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx). Acesso em: 20 jul. 2016.

Gorantla VC, Kirkwood JM. State of melanoma: an historic overview of a field in transition. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28:415-435.

Gloster HM, Neal K. Skin cancer in skin of color. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55:741-760.

Guruvayoorappan C, Kuttan G. (+)-Catechin inhibits tumour angiogenesis and regulates the production of nitric oxide and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated macrophages. *J Innate Immun.* 2008;14:160–174.

Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Wolchok JD, Hersey P, Joseph RW, Weber JS, Dronca R, Gangadhar TC, Patnaik A, Zarour H, Joshua AM, Gergich K, Elassaiss-Schaap J, Algazi A, Mateus C, Boasberg P, Tumei PC, Chmielowski B, Ebbinghaus SW, Li XN, Kang SP, Ribas A. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med.* 2013;69:134-144.

Harris Z, Donovan MG, Branco, GM, Limesand, KH, Burd R. Quercetin as an emerging Anti-Melanoma Agent: A Four-Focus area therapeutic development strategy. *Front Nutr.* 2016;3:48.

Haza AI, Morales P. Effects of (+) catechin and (–) epicatechin on heterocyclic amines-induced oxidative DNA damage. *J App Toxicol.* 2011;31:53–62.

Henriques BO, Corrêa O, Azevedo EPC, Pádua RM, Oliveira VLS, Oliveira THC, Boff D, Dias ACF, Souza DG, Amaral FA, Teixeira MM, Castilho RO, Braga FC. *In vitro* TNF- $\alpha$  inhibitory activity of brazilian plants and anti-inflammatory effect of *Stryphnodendron adstringens* in an acute arthritis model. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2016;2016.

Hernandes L, Pereira LMDS, Palazzo F, Mello JCPD. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Braz J Pharm Sci.* 2010;46:431-436.

Herzog-Soares JD, Alves RK, Isac E, Bezerra JCB, Gomes MH, Santos SC, Ferri PH. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Rev Bras Farmacog.* 2002;12:1-2.

Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med.* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

Iqbal J, Abbasi BA, Mahmood T, Kanwal S, Ali B, Shah SA, Khalil AT. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2017;7:1129-1150.

Ishida K, de Mello JC, Cortez DA, Filho BP, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:942-949.

Jafari S, Saeidnia S, Abdollahi M. Mohammad. Role of natural phenolic compounds in cancer chemoprevention via regulation of the cell cycle. *Curr Pharm Biotechnol.* 2014;15:409-421.



Jin ML, Park SY, Kim YH, Park G, Lee SJ. Halofuginone induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits migration via downregulation of matrix metalloproteinase-9. *Int J Oncol*. 2014;44:309-318.

Jones DP: Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1865–1879.

Kaplum V, Ramos AC, Consolaro MEL, Fernandez MA, Ueda-Nakamura T, Dias BP, Silva SD, de Mello JCP, Nakamura CV. Proanthocyanidin polymer-rich fraction of *Stryphnodendron adstringens* promotes *in vitro* and *in vivo* cancer cell death via oxidative stress. *Front Pharmacol*. 2018;9:694.

Karimi A, Moradi MT, Alidadi S, Hashemi L. Anti-adenovirus activity, antioxidant potential, and phenolic content of black tea (*Camellia sinensis* Kuntze) extract. *J Complement Integr Med*. 2016;13:357-363.

Kaur V, Kumar M, Kumar A, Kaur K, Dhillon VS, Kaur S. Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: Implications in cancer chemoprevention and future perspectives. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:564-586.

Kaushik SB, Kaushik N. Non-coding RNAs in skin cancers: An update. *Non-cod RNA Res*. 2016;1:83-86.

Kee D, McArthur G. Immunotherapy of melanoma. *Eur J Surg Oncol*. 2016;43:594-603.

Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis*. 1997;135:93-102.

Khan MK, Khan N, Almasan A, Macklis R. Future of radiation therapy for malignant melanoma in an era of newer, more effective biological agents. *Onco Targets Ther*. 2011;4:137-148.

Kumar, R.; Deep, G.; Wempe, M.F.; Surek, J.; Kumar, A.; Agarwal, R.; Agarwal, C. Procyanidin B2 3,3'-di-O-gallate induces oxidative stress-mediated cell death in prostate cancer cells via inhibiting MAP kinase phosphatase activity and activating ERK1/2 and AMPK. *Mol. Carcinog*. 2017;57:57-69.

Kwak JH, Kang MW, Roh JH, Choi SU, Zee OP. Cytotoxic phenolic compounds from *Chionanthus retusus*. *Arch Pharm Res*. 2009;32:1681-1687.

Kwon SJ, Lee JH, Moon KD, Jeong IY, Ahn DU, Lee MK, Seo KI. Induction of apoptosis by isoegomaketone from *Perilla frutescens* L. in B16 melanoma cells is mediated through ROS generation and mitochondrial-dependent,-independent pathway. *Food Chem Toxicol*. 2014;65:97-104.

Langford IH, Bentham G, McDonald AL. Multi-level modelling of geographically aggregated health data: a case study on malignant melanoma mortality and UV exposure in the European Community. *Stat Med*. 1998;17:41-57.

Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.* 2005;91:131-137.

Lefaki M, Papaevgeniou N, Chondrogianni N. Redox regulation of proteasome function. *Redox Biol.* 2017;13:452–458.

Li FS, Weng JK. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nat Plants.* 2017;3:17109.

Li XM, Cai JL, Wang L, Wang WX, Ai HL, Mao ZC. Two new phenolic compounds and antitumor activities of asparinin A from *Asparagus officinalis*. *J Asian Nat Prod Res.* 2017;19:164-171.

Lima JCS, Martins DTO, De Souza PT. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother Res.* 1998;12:218-220.

Lo C, Lai TY, Yang JH, Yang JS, Ma YS, Weng SW, Chen YY, Lin JG, Chung JG. Gallic acid induces apoptosis in A375.S2 human melanoma cells through caspase-dependent and -independent pathways. *Int. J. Oncol.* 2010;37:377-385.

Lo C, Lai TY, Yang JS, Yang JH, Ma YS, Weng SW, Lin HY, Chen HY, Lin JG, Chung JG. Gallic acid inhibits the migration and invasion of A375.S2 human melanoma cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and Ras. *Melanoma Res.* 2011;21:267-273.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4:118-126.

Lopes GC, Machado FAV, de Toledo CEM, Sakuragui CM, de Mello JCP. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. *Biochem Syst Ecol.* 2009;36:925-931.

Lopes, CVG (2010). O conhecimento etnobotânico da comunidade quilombola do varzeão, dr. Ulysses (pr): no contexto do desenvolvimento rural sustentável. 159p. (Tese. Universidade Federal do Paraná, UFP).

Lorenzi Harri. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, vol.1 / Harri Lorenzi. – 5. Ed. – Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science.* 2014;346:945-949.

Lü S, Wang J. Homoharringtonine and omacetaxine for myeloid hematological malignancies. *J Hematol Oncol.* 2014;7:2.

Luiz RL, Vila TV, de Mello JC, Nakamura CV, Rozental S, Ishida K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:68.

Luize PS, Tiunan TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Cortez DAG, Mello JCP, Nakamura CV. Efeito de extratos de plantas medicinais no crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Cienc Farma*. 2005;41:85-94.

Martínez Conesa C, Vicente Ortega V, Yáñez Gascón MJ, García Reverte JM, Canteras Jordana M, Alcaraz Baños M. Experimental model for treating pulmonary metastatic melanoma using grape-seed extract, red wine and ethanol. *Clin Transl Oncol*. 2005;7:115-121.

Martino E, Della Volpe S, Terribile E, Benetti E, Sakaj M, Centamore A, Sala A, Collina S. The long story of camptothecin: *From traditional medicine to drugs*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27:701-707.

Mello JCP, Petereit F, Nahrstedt A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*. 1996;42:857-862.

Mello JCP, Petereit F, Nahrstedt A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*. 1999;51:1105-1107.

Merlino G, Herlyn M, Fisher DE, Bastian BC, Flaherty KT, Davies MA, Wargo JA, Curiel-Lewandrowski C, Weber MJ, Leachman SA, Soengas MS, McMahon M, Harbour JW, Swetter SM, Aplin AE, Atkins MB, Bosenberg MW, Dummer R, Gershenwald JE, Halpern AC, Herlyn D, Karakousis GC, Kirkwood JM, Krauthammer M, Lo RS, Long GV, McArthur G, Ribas A, Schuchter L, Sosman JA, Smalley KS, Steeg P, Thomas NE, Tsao H, Tueting T, Weeraratna A, Xu G, Lomax R, Martin A, Silverstein S, Turnham T, Ronai ZA. The state of melanoma: challenges and opportunities. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29:404-416.

Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2009;123:439-445.

Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*. 2018; 63:68-78.

Mishra A, Sharma AK, Kumar S, Saxena AK, Pandey AK. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *BioMed Res Int*. 2013, 2013:1-10.

Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova*. 2005;28:892-896.

Moreno BH, Ribas A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *Br J Cancer*. 2015;112:1421-1427.

Morey AT, de Souza FC, Santos JP, Pereira CA, Cardoso JD, de Almeida RS, Costa MA, de Mello JC, Nakamura CV, Pinge-Filho P, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. *Curr Pharma Biotechnol*. 2016;17:365-375.

Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. *Development*. 2015;142:620-632.

Mut-Salud N, Álvarez PJ, Garrido JM, Carrasco E, Aránega A, Rodríguez-Serrano F. Antioxidant intake and antitumor therapy: toward nutritional recommendations for optimal results. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; ID 6719534:1-19.

Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors*. 2000;13:49-54.

Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*. 2010;49:978-986.

Nascimento, AM. (2008) Avaliação da qualidade de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. 159p. (Dissertação - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG).

Nascimento AM, Guedes PT, Castilho RO, Vianna-Soares CD. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) proanthocyanidins quantitation by RP-HPLC. *Braz. J. Pharm. Sci*. 2013;49:549–558.

NCI - National Cancer Institute. General Information About Melanoma. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq>. Acesso em: 08 dez. 2016.

NCI - National Cancer Institute. What Is Cancer? Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 13 Fev 2017.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016;79:629–661.

Ng CY, Yen H, Hsiao HY, Su SC. Phytochemicals in skin cancer prevention and treatment: An Updated Review. *Int J Mol Sci*. 2018;19:941.

Nihal M, Ahmad N, Mukhtar H, Wood GS. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: Possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int J Cancer*. 2005;114:513-521.

Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol.* 2014;170:11-19.

Oliveira DG, Prince KA, Higuchi CT, Santos ACB, Lopes LMX, Simões MJS, Leite CQF. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2007;28:165-169.

Oliveira JR, de Castro VC, Vilela PDGF, Camargo SEA, Carvalho CAT, Jorge AOC, de Oliveira, LD. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:208.

Orlando SC. (2005). Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (barbatimão). 89p. (Tese- Universidade de Franca, UNIFRSN).

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer.* 2000;36:1235-1247.

Padumadasa C, Dharmadana D, Abeysekera A, Thammitiyagodage M. *In vitro* antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of ethyl acetate soluble proanthocyanidins of the inflorescence of *Cocos nucifera* L. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16:345.

Pal HC, Hunt KM, Diamond A, Elmets CA, Afaq F. Phytochemicals for the management of melanoma. *Mini Rev Med Chem.* 2016;16:953-979.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2:270-278.

Panizza S, Rocha AB, Gecchi R, Souza e Silva RAP. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor em tannino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Rev. Ciênc. Farm.* 1988;10:101-106.

Pascoal ACRF. (2015). *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia guaviroba*: fitoquímica e estudo *in vitro* e *in vivo* visando à determinação da atividade biológica e toxicidade. 197p. (Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP).

Pascoal AC, Ehrenfried CA, Lopez BG, de Araujo TM, Pascoal VD, Gilioli R, Anê GF, Ruiz AL, Carvalho JE, Stefanello ME, Salvador MJ. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules.* 2014;19:1843-5.

Pereira ZV, Mussury RM, Almeida AB, Sangalli A. Medicinal plants used by Ponta Porã community, Mato Grosso do Sul. *Acta Sci Biol Sci.* 2009;31:293-299.

Pfeifer GP, Besaratinia A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol Sci.* 2012;11:90-97.

Pinho L, Souza PNS, Sobrinho EM, Almeida AC, Martins ER. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da cassa de pequi. *Cienc Rural.* 2012;42:326-331.

Pinto SC, Bueno FG, Panizzon GP, Morais G, Dos Santos PV, Baesso ML, Leite-Mello EV, de Mello JC. *Stryphnodendron adstringens*: clarifying wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med.* 2015;81:1090-1096.

Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74.

Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 2017;387:95-105.

Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int.* 2014;2014. ID 761264.

Ravindranath MH, Ramasamy V, Moon S, Ruiz C, Muthugounder S. Differential growth suppression of human melanoma cells by tea (*Camellia sinensis*) epicatechins (ECG, EGC and EGCG). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009;6:523-530.

Rebecca MA, Ishii-Iwamoto EL, Grespan R, Cuman RKN, Caparroz-Assef SM, Mello JCP, Bersani-Amado CA. *Stryphnodendron adstringens*. *J Ethnopharmacol.* 2002;83:101-104..

RENISUS. Lista de Plantas Medicinais do SUS, 2014. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/06/renisus.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2017.

Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil C, Lotem M, Larkin J, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Hamid O, Mateus C, Shapira-Frommer R, Kosh M, Zhou H, Ibrahim N, Ebbinghaus S, Ribas A. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372:2521-2532.

Rodrigues VEG, Carvalho DD. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. *Cienc Agrotec.* 2001;25:102-123.

Rodriguez J, Yáñez J, Vicente V, Alcaraz M, Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Lozano JA. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines: relationship between structure and activity. *Melanoma Res.* 2002;12:99-107.

Roleira FM, Tavares-da-Silva EJ, Varela CL, Costa SC, Silva T, Garrido J, Borges F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chem.* 2015;183:235-258.

Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (Taxol). *N Engl J Med.* 1995;332:1004–1014.

Sabino APL, Eustaquio LMS, Miranda ACF, Biojone C, Mariosa TN, Gouvea CMCP. *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) leaf fraction: Chemical characterization, antioxidant activity, and cytotoxicity towards human breast cancer cell lines. *App Biochem Biotechnol.* 2017;184:1375-1389.

Saleem, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.* 2009;285:109-115.

Santana BF, Voeks RA, Funch LS. Ethnomedicinal survey of a maroon community in Brazil's Atlantic tropical forest. *J Ethnopharmacol.* 2016;181:37-49.

Santos SC, Costa WF, Ribeiro JP, Guimaraes DO, Ferri PH, Ferreira HD, Seraphin JC. Tannin composition of barbatimao species. *Fitoterapia.* 2002; 73:292–299.

Santos UP, Campos JF, Torquato HF, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Estevinho LM, de Picoli Souza K, Dos Santos EL. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. *PLoS one.* 2016;11:e0167531.

Physicochemical Characterization, Microbiological Quality and Safety, and Pharmacological Potential of *Hancornia speciosa* Gomes. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018: 2976985.

Scalon VR (2015). *Stryphnodendron* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB19133>. Acesso em: 14 Jul. 2016.

Schadendorf D, Fisher, DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob, JJ, Halpern A, Herlyn M, Marchetti MA, McArthur G, Ribas A, Roesch A. Melanoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15055.

Sharma SD, Katiyar SK. Dietary grape-seed proanthocyanidin inhibition of ultraviolet B-induced immune suppression is associated with induction of IL-12. *Carcinogenesis.* 2005;27:95–102.

Seca AML, Pinto DCGA. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *In J Mol Sci.* 2018;19:263.

Serrone L, Zeuli M, Segal FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res*. 2000;19:21-34.

Setlow RB. The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 71, n. 9, p. 3363-3366, 1974.

Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:345-358.

Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013;22:1063-1079.

Siddiqui IA, Bharali DJ, Nihal M, Adhami VM, Khan N, Chamcheu JC, Khan MI, Shabana S, Mousa SA, Mukhtar H. Excellent anti-proliferative and pro-apoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate encapsulated in chitosan nanoparticles on human melanoma cell growth both *in vitro* and *in vivo*. *Nanomedicine*. 2014;10:1619-1626.

Sies H, Jones DP. 2007. Oxidative stress. In *Encyclopedia of Stress*, Vol. 3, ed. G Fink, pp. 45–48. Amsterdam: Elsevier. 2nd ed.

Sies H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr Opin Toxicol*. 2018;7:122-126.

Simões MCF, Sousa JJS, Pais AACC. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Lett*. 2015;357:8-42.

Singh T, Katiyar SK. Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE-2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2011;6:e25224.

Soengas, MS, Scott SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 2003;22:3138-3151.

Sousa NC, Carvalho S, Spanó MA, Graf U. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen*. 2003;41:293-299.

Souza MD, Fernandes RR, Corette-Pasa M. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de São Gonçalo Beira Rio, Cuiabá, MT. *Rev Biodiversidade*. 2010;9:91-100.

Souza PM, Sales PM, Simeoni LA, Silva EC, Silveira D, Magalhães Pde O. Inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta Med*. 2012;78:393-399.



Souza-Moreira TM, Queiroz-Fernandes GM, Pietro RCLR. *Stryphnodendron* Species Known as "Barbatimão": A Comprehensive Report. *Molecules*. 2018;23:1-25.

Stanton RA, Gernert KM, Nettles JH, Aneja R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med Res Rev*. 2011;31:443-481.

Stern RS, Study UP, Puva F. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44:755-761.

Strickland LR, Pal HC, Elmets CA, Afaq F. Targeting drivers of melanoma with synthetic small molecules and phytochemicals. *Cancer Lett*. 2015;359:20-35.

Subramanian V, Venkatesan B, Tumala A, Vellaichamy E. Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice. *Food Chem Toxicol*. 2014;66:44-55.

Subramanian AP, John AA, Vellayappan MV, Balaji A, Jaganathan SK, Supriyanto E, Yusof M. Gallic acid: prospects and molecular mechanisms of its anticancer activity. *RSC Advances*. 2015;5:35608-35621.

Sznarkowska A, Kostecka A, Meller K, Bielawski KP. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget*. 2017;8:15996–16016.

Tan X, Hu D, Li S, Han Y, Zhang Y, Zhou D. Differences of four catechins in cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells. *Cancer Lett*. 2000;158:1–16.

The plant list. A working list all plant species (2013). Disponível em: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Stryphnodendron> Acesso em: 04 de julho de 2018.

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2005;365:687-701.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:2443-2454.

Toledo CEM. (2002). Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae.. 92p. (Dissertação – Universidade Estadual Paulista, UNESP).

Tsao H, Olazagasti JM, Cordero KM, Brewer JD, Taylor SC, Bordeaux JS, Chren MM, Sober AJ, Tegeler C, Bhushan R, Begolka WS. Early detection of melanoma: reviewing the ABCDEs. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72:717-723.

Tuong W, Cheng LS, Armstrong AW. Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. *Dermatol Clin*. 2012;30:113-124.

Vaid M, Singh T, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit melanoma cell invasiveness by reduction of PGE-2 synthesis and reversal of epithelial-to-mesenchymal transition. *PloS One*. 2011;6:e21539.

Vaid M, Singh T, Prasad R, Kappes JC, Katiyar SK. Therapeutic intervention of proanthocyanidins on the migration capacity of melanoma cells is mediated through PGE-2 receptors and  $\beta$ -catenin signaling molecules. *Ame J Cancer Res*. 2015;11:3325-3338.

Vaid M, Singh T, Prasad R, Katiyar SK. Bioactive proanthocyanidins inhibit growth and induce apoptosis in human melanoma cells by decreasing the accumulation of  $\beta$ -catenin. *Int J Oncol*. 2016;48:624-634.

Venditto VJ, Simanek EE. Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the *in vivo* literature. *Mol Pharm*. 2010;7:307-349.

Vidal N, Cavaille JP, Graziani F, Robin M, Ouari O, Pietri S, Stocker P. High throughput assay for evaluation of reactive carbonyl scavenging capacity. *Redox Biol*. 2014;2:590–598.

Vijayababu MR, Arunkumar A, Kanagaraj P, Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Mol Cell Biochem*. 2006;287:109-116.

Violante IM, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, Garcez FR. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Braz J Microbiol*. 2012;43:1302-1308.

Wang h, Khor TO, Shu L, Su Z, Fuentes F, Lee J-H, Kong A-NT. Plants against cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12:1281–1305.

Watanabe T, Kuramochi H, Takahashi A, Imai K, Katsuta N, Nakayama T, Fujiki H, Suganuma M. Higher cell stiffness indicating lower metastatic potential in B16 melanoma cell variants and in (-)-epigallocatechin gallate-treated cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138:859-866.

Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, Hoeller C, Khushalani NI, Miller WH Jr, Lao CD, Linette GP, Thomas L, Lorigan P, Grossmann KF, Hassel JC, Maio M, Sznol M, Ascierto PA, Mohr P, Chmielowski B, Bryce A, Svane IM, Grob JJ, Krackhardt AM, Horak C, Lambert A, Yang AS, Larkin J. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:375-384.

Weinstock MA, Sober AJ. The risk of progression of lentigo maligna to lentigo maligna melanoma. *Br J Dermatol*. 1987;116:303-310.

Wilhelm J, Vytášek R, Uhlík J, Vajner L. Oxidative Stress in the Developing Rat Brain due to Production of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1-12.

Woodhead AD, Setlow RB, Tanaka M. Environmental factors in nonmelanoma and melanoma skin cancer. *J Epidemiol*. 1999;9:102-114.

WHO (World Health Organization) (2011) The World Traditional Medicines Situation, in Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges. Geneva 3:1–14. Disponível em: <http://digicollection.org/hss/en/m/abstract/Js18063en/>. Acesso: 23 de junho de 2018.

Yance DR, Sagar SM. Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr Cancer Ther*. 2006;5:9–29.

Yu XL, Li YN, Zhang H, Su YJ, Zhou WW, Zhang ZP, Wang SW, Xu PX, Wang YJ, Liu RT. Rutin inhibits amylin-induced neurocytotoxicity and oxidative stress. *Food Funct*. 2015;6:3296-3306.

Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, Abubakar S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virolog J*. 2011;8:560.

Zou Z, Chang H, Li H, Wang S. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis*. 2017;11:1321-1335.

## **5. APÊNDICE**

### **5.1. Artigo publicado na revista “International Journal of Molecular Sciences”**

**Título do artigo:** Evaluation of in vitro antioxidant and anticancer properties of the aqueous extract from the stem bark of *Stryphnodendron adstringens*

**Fator de impacto da revista:** 3,687

**Qualis para Biotecnologia e Biodiversidade:** B1

**Link para acesso do artigo:** <https://doi.org/10.3390/ijms19082432>



Article

# Avaliação das propriedades antioxidante e anticâncer *in vitro* do extrato aquoso da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens*

Débora da Silva Baldivia <sup>1</sup>, Daniel Ferreira Leite <sup>1</sup>, David Tsuyoshi de Castro <sup>1</sup>, Jaqueline Ferreira Campos <sup>1</sup>, Uilson Pereira dos Santos <sup>1</sup>, Edgar Julian Paredes-Gamero <sup>2</sup>, Carlos Alexandre Carollo <sup>3</sup>, Denise Brentan Silva <sup>3</sup>, Kely de Picoli Souza <sup>1</sup>, Edson Lucas dos Santos <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Grupo de pesquisa em biotecnologia e bioprospecção aplicado ao metabolismo (GEBBAM), Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados Itahum, Km 12, CEP: 79.804-970, Dourados, MS, Brasil; deborabaldivia@outlook.com.br (D.d.S.B); leitefd2@gmail.com (D.F.L); david\_hiramatsu@hotmail.com (D.T.d.C); jcampos\_bio@yahoo.com.br (J.F.C); uilsanto@hotmail.com (U.P.d.S); kelypicoli@gmail.com (K.d.P.S)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade universitária, s/n, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil; paredes.gamero@gmail.com (E.J.P.G)

<sup>3</sup> Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Cidade universitária, s/n, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil; carloscarollo@gmail.com (C.A.C.); denisebrentan@gmail.com (D.B.S)

\* Autor Correspondente: edsonsantosphd@gmail.com; Tel.: +55-67-3410-2210

**Abstract:** *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro conhecida como barbatimão. Na medicina tradicional, decocções ou infusões da casca do caule desta planta são utilizadas no tratamento de várias doenças. O objetivo deste estudo foi analisar a composição química do extrato aquoso preparado a partir da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens* (EASA), sua atividade antioxidante e efeitos anticâncer, bem como caracterizar mecanismos de morte celular contra células de melanoma murino B16F10Nex-2. Foram identificados no EASA ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, proantocianidinas diméricas e triméricas principalmente compostas de unidades de prodelfidina e as cromonas isoméricas C-hexosil- e O-pentosil-5,7-di-hidroxicromona. O EASA demonstrou a atividade antioxidante através da eliminação direta de radicais livres, bem como através da inibição da hemólise oxidativa e da peroxidação lipídica em eritrócitos humanos. Além disso, o EASA promoveu morte celular induzida por apoptose nas células de melanoma, via aumento dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO), disfunção do potencial de membrana mitocondrial e ativação da caspase-3. Juntos, esses dados mostram os efeitos antioxidante e anticâncer de *Stryphnodendron adstringens*. Estes resultados abrem novas perspectivas para estudos contra outras linhas celulares tumorais e em modelos *in vivo*, bem como para a identificação e isolamento dos constituintes químicos responsáveis por estes efeitos.

**Palavras-chave:** Cerrado; plantas medicinais; LC-DAD-MS; estresse oxidativo; ERO; melanoma; caspase-3; apoptose.

## 1. Introdução

A biodiversidade brasileira apresenta inúmeras espécies vegetais que apresentam entre seus constituintes compostos bioativos com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Dentre estas, o *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae), árvore nativa do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como barbatimão ou casca-da-mocidade. Na medicina popular, a decocção ou infusão das cascas do caule desta planta são utilizadas no tratamento de problemas na próstata, doenças hepáticas, doenças da pele, má circulação, cicatrização de feridas, infecções fúngicas, inflamação dentária, gastrite e diabetes [1,2]. Alguns destes efeitos já foram comprovados cientificamente, sendo descritas suas atividades cicatrizante [3], anti-inflamatória [4,5], antifúngica [6,7]. No entanto, outras propriedades biológicas ainda podem ser caracterizadas.

Estudos químicos mostram que as cascas do caule de *S. adstringens* apresentam elevadas concentrações de taninos condensados (proantocianidinas) e monômeros de flavan-3-ols [8,9], os quais são descritos na literatura por apresentarem atividades antioxidantes e propriedades anticancerígenas [10,11].

A busca por plantas medicinais que apresentam propriedades antioxidantes, têm se intensificado nos últimos anos [12,13,14,15,16]. Antioxidantes naturais são moléculas que conferem ao organismo proteção contra os danos celulares promovidos pelo excesso de radicais livres, responsáveis pela indução do estresse oxidativo [17]. O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e agentes antioxidantes endógenos, podendo ocasionar oxidação de biomoléculas presentes nas células tais como: ácidos nucleicos, proteínas e lipídios [13]. Essa condição biológica está fortemente relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças, entre elas o câncer [18].

O melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele, pois apresenta elevada capacidade metastática para outros órgãos. Originam-se nos melanócitos, células responsáveis pela produção da melanina, o pigmento que dá cor a pele [19]. Apesar do melanoma ter origem multifatorial, a exposição excessiva aos raios ultravioleta está entre os principais fatores de risco [20]. Sua incidência mundial é crescente, com taxas anuais de aproximadamente 132.000 novos casos [21]. As chances de cura estão relacionadas à detecção e tratamento cirúrgico nos estágios iniciais da doença. Nos estágios mais avançados o prognóstico de sobrevivência é de 5 anos em aproximadamente 15 a 20% dos casos [22]. Atualmente, não existe um tratamento totalmente eficaz contra o melanoma metastático. No entanto, diferentes drogas quimioterápicas estão entre as principais opções para o tratamento do melanoma [23,24].

Apesar dos benefícios no tratamento farmacológico do melanoma, a resistência a drogas quimioterápicas e a alta toxicidade são os principais problemas identificados. Diante disso, a identificação de compostos e moléculas anticâncer, eficazes e com alta seletividade às células-alvo, são de grande interesse farmacológico. Aproximadamente 49% dos agentes terapêuticos anticâncer aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) são oriundos de produtos naturais ou de seus derivados [25]. Dentre estes quimioterápicos de origem vegetal utilizados no tratamento do câncer estão a vincristina, vimblastina e o taxol [26]. Assim, a identificação de compostos oriundos de plantas medicinais, aliados a estratégias de tratamentos do câncer, são cruciais para o desenvolvimento de terapias eficazes contra o melanoma.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram investigar a composição química do extrato aquoso das cascas do caule de *S. adstringens*, bem como avaliar sua atividade antioxidante e anticâncer e os mecanismos de morte promovidos contra células de melanoma B16F10Nex-2 *in vitro*.

## 2. Resultados

### 2.1. Identificação dos constituintes do EASA por LC-DAD-MS / MS

Os constituintes químicos do EADA foram identificados com base em UV, dados precisos de MS e MS / MS em comparação com dados espectrais relatados na literatura, e alguns compostos puderam ser confirmados por análises de padrões autênticos. Todos os compostos identificados e dados espectrais estão resumidos na Tabela 1.

Os picos cromatográficos (Figura 1) **1-9** e **12-13** mostraram uma banda intensa a  $\approx 280$  nm ( $\lambda_{max}$ ) no espectro de UV, que são atribuíveis às unidades de ácido gálico e flavan-3-ol, incluindo as proantocianidinas (taninos condensados). (Figura 2). Os compostos **2**, **6** e **8** exibiram íons desprotonados em  $m/z$  169.0140, 305.0673 e 305.0673, respectivamente, compatíveis com as fórmulas moleculares  $C_7H_6O_5$  e  $C_{15}H_{14}O_7$ , e estes compostos foram confirmados como ácido gálico, galocatequina e epigalocatequina pela injeção de padrões. Seus perfis de fragmentação são compatíveis com dados publicados [27], e eles já haviam sido relatados em *S. adstringens* [28,8].

Os metabólitos **1**, **3-5**, **7**, **9** e **12** exibiram íons a  $m/z$  609 e 593, que correspondem a  $C_{30}H_{26}O_{14}$  e  $C_{30}H_{26}O_{13}$ , caracterizando proantocianinas diméricas. Todos os metabólitos apresentaram íons fragmentos a  $m/z$  305 que são produzidos a partir de reações de quinonas de metano com perdas de 304 e 288 u, confirmando assim prodelfinidina (PDE) e procianidina (PCY) / prorobinetidina (PRO). As perdas comuns pelas reações de Diels Alder (RDA) de 168 e 152 u sugerem a presença de prodelfinidina / prorobinetidina e procianidina, respectivamente. Por exemplo, o produto ião  $m/z$  423 [MH-168-H<sub>2</sub>O] - é observado para os metabólitos **1**, **3-5** e **7**, o ião  $m/z$  423 [MH-152-H<sub>2</sub>O] - é observado para **12** e o ião  $m/z$  425 [MH-168] - de **9** unidades sugeridas de prodelfinidina (PDE), procianidina (PCY) e prorobinetidina (PRO). Assim, os dímeros PDE-PDE, PCY-PDE e PRO-PDE puderam ser identificados no extrato, e seus dados espectrais são compatíveis com os dados publicados [27]. Da mesma forma, o trímeros de prodelfinidina (**1**) e o dímero de hidroxibenzoila da prodelfinidina, que já foram isolados de *S. adstringens* [8], foram identificados.

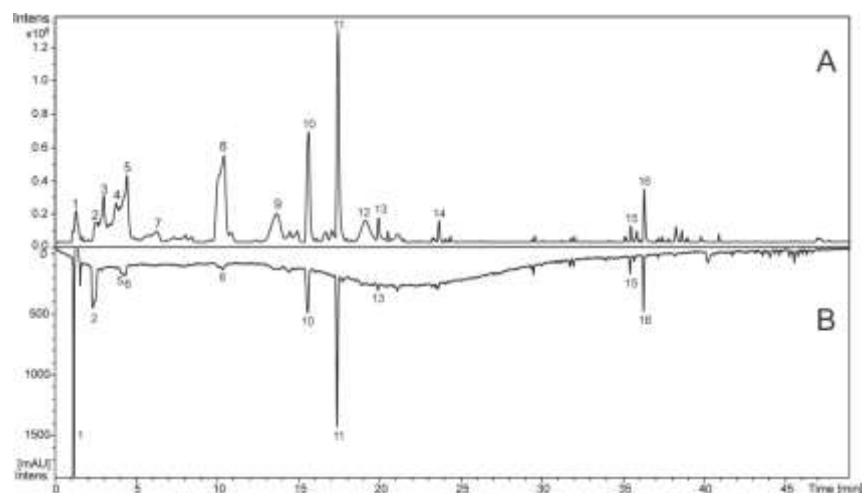
Os compostos **10** e **11** mostraram espectros UV semelhantes com bandas com comprimentos de onda de aproximadamente 257, 290 e 325 nm (ombro), que são compatíveis com compostos de cromona [29]. Apresentaram massas precisas ( $m/z$  485.1312 e 485.1317 [M-H] -) que correspondem à fórmula molecular  $C_{21}H_{26}O_{13}$ . A fragmentação de iões a  $m/z$  485 produziu iões a  $m/z$  353 [M-H-132] -, sugerindo um substituinte de O-pentosilo na estrutura. Além disso, os íons de produto  $m/z$  263 [MH-90] -, 245 [MH-90-H<sub>2</sub>O] -, 233 [MH-120] - e 215 [MH-120-H<sub>2</sub>O] - resultam de perdas de  $C_4H_8O_4$  (120 u),  $C_3H_6O_3$  (90%) e moléculas de água (18%). As perdas de 120 e 90 u são produzidas a partir da fragmentação do anel de açúcar e sugerem um grupo C-hexosídeo. Todas essas perdas foram confirmadas pelo cálculo das massas precisas de íons de produto. Assim, as substâncias **10** e **11** foram putativamente identificadas como C-hexosil- e O-pentosil-5,7-di-hidroxicromona, e os seus dados espectrais são semelhantes aos seus dados reportados [30,31].

Tabela 1. Identificação dos constituintes do extrato aquoso de *S. adstringens* por LC-DAD-MS / MS.

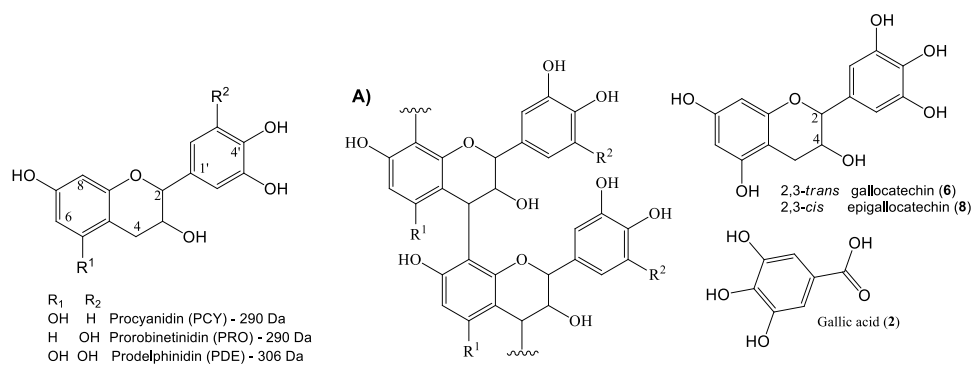
Picos	RT (min)	Compostos	UV (nm)	FM	Modo Negativo -m/z		Modo Positivo - m/z	
					MS [M-H] <sup>-</sup> (*)	MS/MS	MS [M+H] <sup>+</sup> (*)	MS/MS
1	1.2	PDE-PDE (B type)	275	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1250 (2.5)	423, 305, 177	611.1411 (2.6)	287, 263, 179
		PDE-PDE-PDE (B type)		C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>21</sub>	913.1803 (3.3)	423, 305, 261, 243, 177	915.1955 (2.5)	-
		di-hexoside		C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	341.1093 (1.0)	-	365.1051 (0.9)	-
2	2.4	Ácido gálico <sup>st</sup>	270	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	169.0140 (1.7)	-	171.0291 (1.9)	-
3	2.9	PDE-PDE (B type)	275	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1280 (4.9)	423, 305, 177, 165	611.1392 (0.6)	425, 299, 287, 275, 263, 179
4	3.6	PDE-PDE (B type)	276	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1254 (0.8)	423, 305, 177, 165	611.1395 (1.6)	425, 299, 287, 263, 179
5	4.2	PDE-PDE (B type)	275	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1259 (1.6)	423, 305, 177, 165	611.1400 (0.7)	425, 299, 287, 275, 263, 245, 179
6	4.3	Galocatquina <sup>st</sup>	275	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	305.0673 (2.0)	179	307.0812 (3.2)	163, 159
7	6.1	PDE-PDE (B type)	275	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1245 (0.8)	-	611.1422 (4.3)	-
8	10.3	Epigalocatequina <sup>st</sup>	274	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	305.0673 (1.9)	167	307.0823 (3.4)	195, 177, 163, 159
9	13.5	PRO-PDE (B type)	280	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	593.1312 (1.9)	305, 177	595.1446 (0.1)	427
10	15.5	C-hexosyl O-pentosyl 5,7-dihydroxychromone	257, 285, 327 <sup>sh</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	485.1312 (2.4)	353, 335, 245, 233, 215, 205	487.1460 (2.9)	355, 337, 319, 289, 259, 235, 205
11	17.3	C-hexosyl O-pentosyl 5,7-dihydroxychromone	257, 295, 325 <sup>sh</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	485.1317 (3.3)	365, 353, 335, 263, 245, 263, 233, 215, 205	487.1452 (1.0)	319, 301, 283, 259, 235, 205
12	19.0	PCY-PDE (B type)	278	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	593.1308 (1.3)	305	595.1453 (1.1)	427, 307, 289
13	19.8	PDE-PDE benzoate (B type)	278	C <sub>37</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	729.1461 (3.5)	423, 305, 287, 261, 177	731.1611 (0.6)	425, 407, 299, 287, 275, 263
14	23.5	NI	280	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	535.1840 (3.6)	-	537.1981 (2.7)	-
15	35.4	NI	290, 330	C <sub>32</sub> H <sub>36</sub> O <sub>16</sub>	675.1946 (2.2)	245, 233, 215, 207	677.2088 (1.8)	235, 191, 163
16	36.2	NI	300	C <sub>33</sub> H <sub>38</sub> O <sub>17</sub>	705.2068 (4.5)	573, 467, 365, 335, 317, 245, 237, 233, 215	707.2193 (1.6)	325, 221, 191

\* erro em ppm; st: confirmado pelo padrão autêntico; sh: ombro; NI: não identificado; PDE: prodelfinidina, PRO: prorobinetidina; PCY: procianidina.





**Figura 1.** Cromatograma de íons totais no modo de íons negativos (A) e cromatograma em comprimentos de onda de 270-330 nm (B) do EASA.



**Figura 2.** Monômeros de Flavan-3-ol compuseram as proantocianidinas de *S. adstringens*, um tipo linear típico B (A) e alguns compostos químicos que foram identificados.

## 2.2. Composição química

A concentração de fenóis totais foi de  $195,16 \pm 0,94$  mg EAG / g de EASA, e a concentração de flavonóides foi  $2,87 \pm 0,08$  mg EQ / g de EASA.

## 2.3. Atividade antioxidante

### 2.3.1. Eliminação dos radicais livres DPPH e ABTS

A concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) dos radicais livres ABTS e DPPH, bem como a atividade máxima do EASA estão descritas na Tabela 2. O EASA apresentou resultados de IC<sub>50</sub> semelhantes ao controle antioxidante ácido ascórbico, em ambos os ensaios. Já as concentrações necessárias para atingir a inibição máxima dos radicais livres foram 2 e 5 vezes maiores em relação ao ácido ascórbico nos ensaios de ABTS e DPPH, respectivamente.

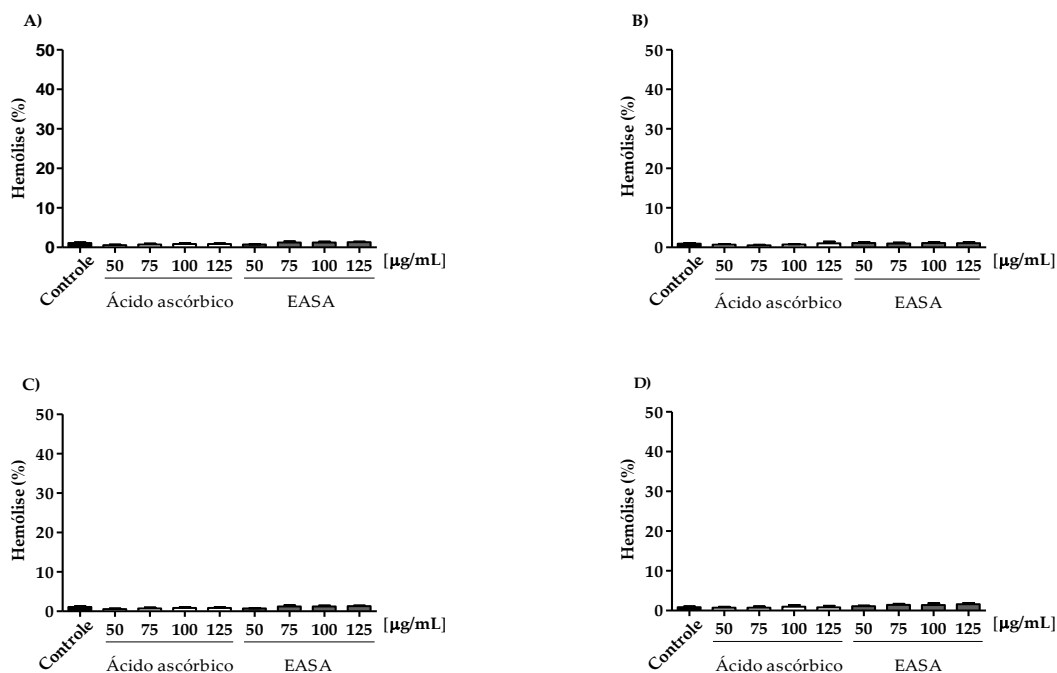
**Tabela 2** – IC<sub>50</sub> e atividade máxima do antioxidante padrão e do EASA na captura dos radicais livres ABTS e DPPH.

Métodos	Tratamento					
	Ácido ascórbico			EASA		
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Inibição Máxima %	Inibição Máxima µg/mL	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Inibição Máxima %	Inibição Máxima µg/mL
<b>ABTS</b>	$1,34 \pm 0,01$	$99,67 \pm 0,04$	5	$1,83 \pm 0,15$	$99,68 \pm 0,08$	10
<b>DPPH</b>	$2,65 \pm 0,03$	$87,44 \pm 2,13$	10	$3,81 \pm 0,02$	$89,92 \pm 1,36$	50

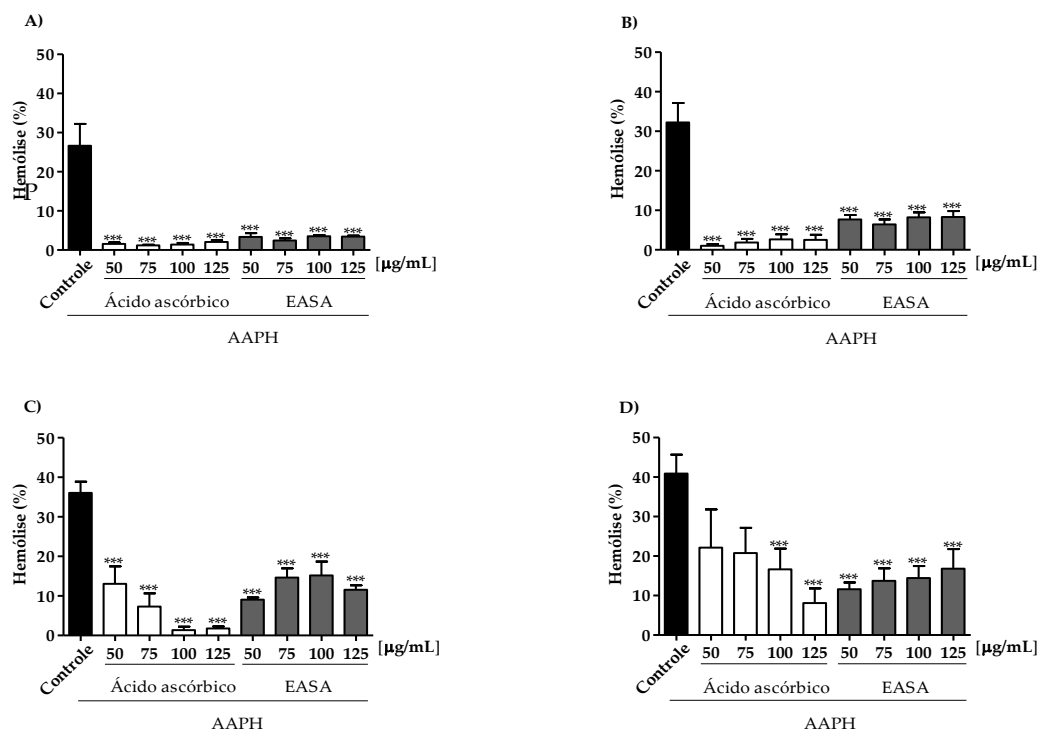
Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM (n=3).

### 2.3.2. Efeito protetor do EASA contra a hemólise oxidativa

Ao longo de todo o período experimental, o EASA não apresentou atividade hemolítica em eritrócitos humanos, em nenhum dos tempos e concentrações avaliadas (Figura 3A–D). Quando em contato com o agente oxidante AAPH, todas as concentrações testadas do EASA foram capazes de proteger os eritrócitos contra a hemólise durante os 240 min de incubação, de forma concentração e tempo dependente (Figura 4A–D). Este resultado foi superior ao controle antioxidante ácido ascórbico, que perdeu sua atividade anti-hemolítica nas concentrações de 50 e 75 µg/mL aos 240 min de incubação (Figura 4D).



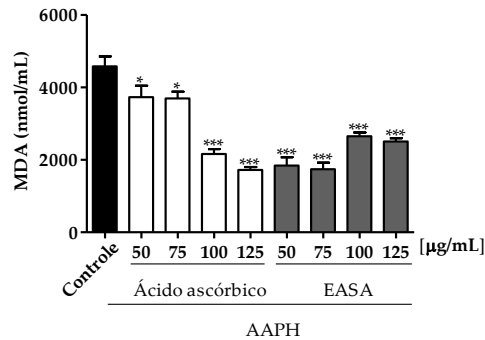
**Figura 3.** Avaliação da hemólise em eritrócitos humanos incubados durante (A) 60, (B) 120, (C) 180 e (D) 240 min com diferentes concentrações de ácido ascórbico e EASA (50-125 µg/ml). Os dados são expressos em média ± EPM (n=3) em duplicata.



**Figura 4.** Avaliação da hemólise em eritrócitos humanos incubados durante (A) 60, (B) 120, (C) 180 e (D) 240 min com o agente oxidante AAPH com diferentes concentrações de ácido ascórbico e EASA (50-125 µg/mL). Os dados são expressos em média ± EPM (n=3) em duplicata. \*\*\*p < 0,0001 comparado com o grupo controle AAPH.

### 2.3.3. Dosagem do Malonaldeído (MDA)

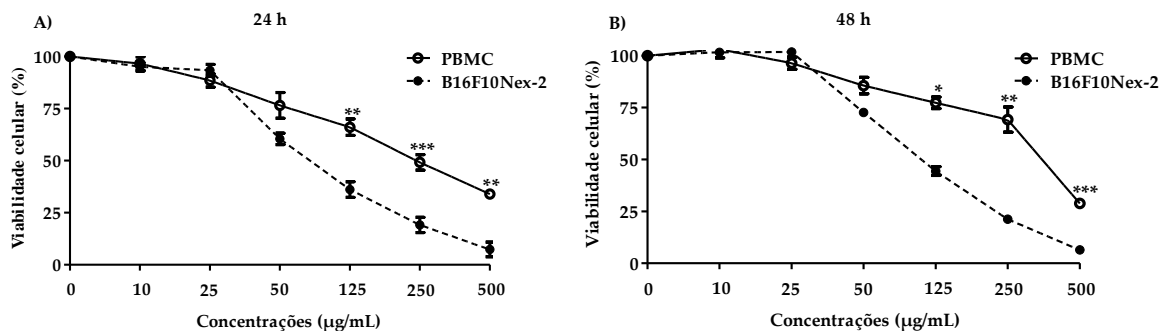
A capacidade do EASA em proteger contra a peroxidação lipídica os eritrócitos incubados com o agente oxidante AAPH foi avaliada pela dosagem do conteúdo de MDA. Todas as concentrações do EASA foram capazes de reduzir os níveis de MDA após 240 min de incubação. O tratamento dos eritrócitos com EASA nas concentrações de 50 e 75  $\mu\text{g/mL}$  reduziu os níveis de MDA em 59,9 % e 62,0% em relação ao controle AAPH, respectivamente. Estes resultados foram melhores, comparado ao controle ácido ascórbico, o qual apresentou reduções semelhantes (52,8% e 62,3%) apenas nas concentrações de 100 e 125  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Figura 5). As doses mais altas do EASA não foram tão eficazes e provavelmente ocorreu um efeito pró-oxidante.



**Figura 5.** Concentração de malonaldeído (MDA) após adição do agente oxidante AAPH em eritrócitos incubados por 240 min com diferentes concentrações (50-125  $\mu\text{g/mL}$ ) de ácido ascórbico e do EASA. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM (n=3) em duplicata. \*p < 0,05 e \*\*\*p < 0,0001 comparado com o grupo controle AAPH.

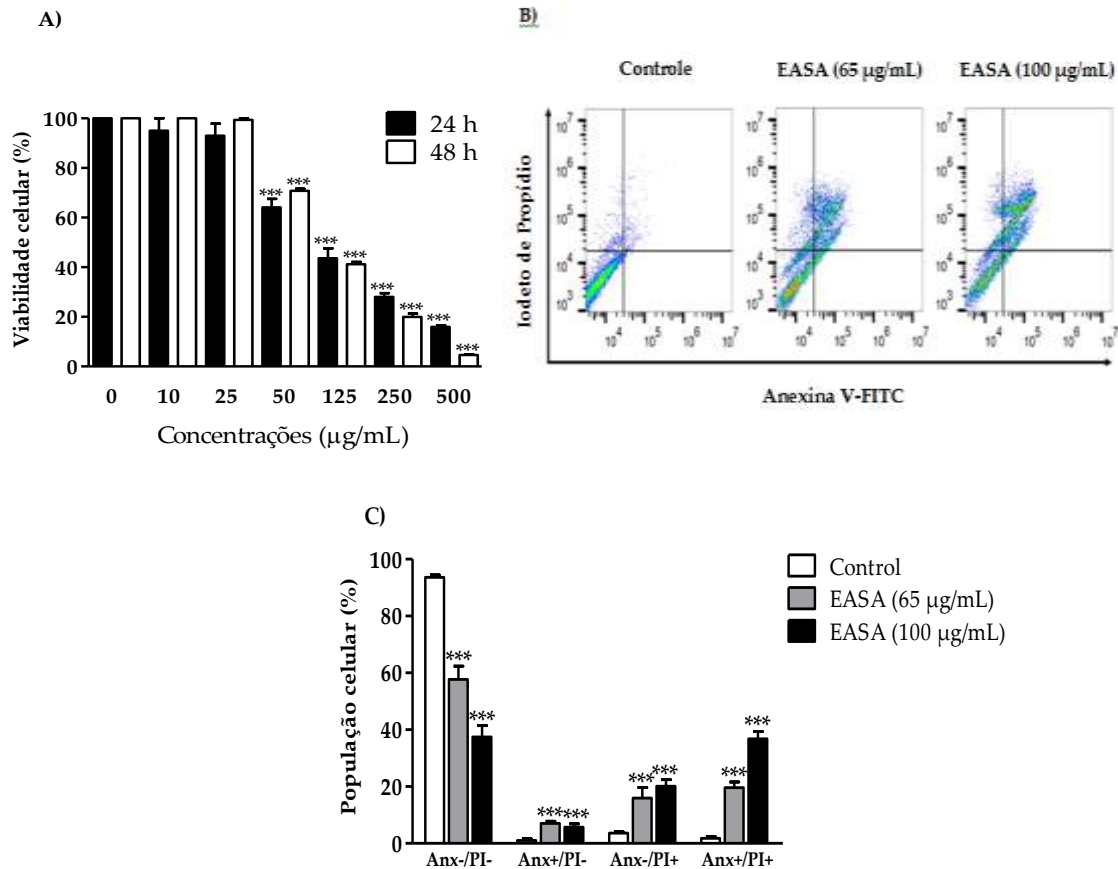
### 2.4. Atividade citotóxica e perfil de morte celular

B16F10Nex-2 cells foram tratadas com AESA por 24 e 48 h para avaliar a citotoxicidade celular. Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram utilizadas como controle. As figuras 6A e B mostram que em ambos os períodos de tratamento o extrato apresentou menor citotoxicidade contra as peripheral blood mononuclear ( $\text{IC}_{50} = 238,5 \pm 32,1 \mu\text{g/mL}$  e  $\text{IC}_{50} = 257,7 \pm 82,7 \mu\text{g/mL}$ ) do que contra a células B16F10Nex-2 ( $\text{IC}_{50} = 65,0 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$  e  $\text{IC}_{50} = 65,0 \pm 5,6 \mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 6.** Curva de viabilidade em células PBMC e B16F10Nex-2. As células foram tratadas com diferentes concentrações de EASA em (A) 24 h ou (B) 48 h. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM (n = 3) em triplicata. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,0001 comparado com as células B16F10Nex-2.

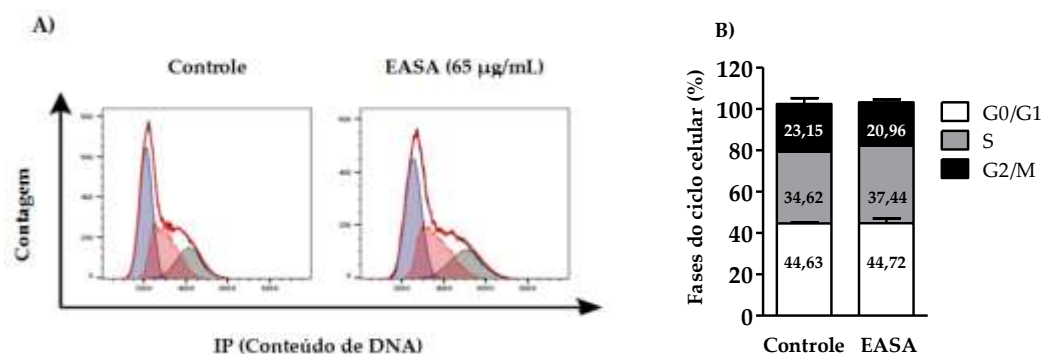
O EASA apresentou atividade citotóxica contra as células B16F10Nex-2 de forma concentração dependente (Figura 7A). Após o tratamento de 24 e 48 h, a concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) observada foi de 65  $\mu\text{g/mL}$ . Os tratamentos com EASA nas concentrações de 65 e 100  $\mu\text{g/mL}$  promoveram dupla marcação (anexina  $V^+$ / $PI^+$ ), evidenciando morte celular por apoptose tardia em aproximadamente 19,6 e 36,7 % das células, respectivamente (Figura 7B-C).



**Figura 7.** Viabilidade e perfil de morte celular da linhagem melanoma B16F10Nex-2 após tratamento com diferentes concentrações de EASA. (A) Viabilidade celular concentração-resposta (10 - 500  $\mu\text{g/mL}$ ) após 24 e 48 h de tratamento. (B) Representação do diagrama obtido por citometria de fluxo das células coradas com Anexina V-FITC e PI após tratamento de 24 h com EASA (65 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Quadrante inferior esquerdo (Anx $^-$ /PI $^-$ ) representa células viáveis; quadrante inferior direito (Anx $^+$ /PI $^-$ ) representa as células apoptóticas; quadrante superior esquerdo (Anx $^-$ /PI $^+$ ) representa células em necrose; e quadrante superior direito (Anx $^+$ /PI $^+$ ) representa células em apoptose tardia. (C) Porcentagem de células mortas, obtidas do diagrama correspondente as concentrações de 65 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM (n=3) em duplicata. \*\*\*p < 0,0001, comparado com o grupo controle não tratado.

#### 2.4.1. Fase do ciclo celular

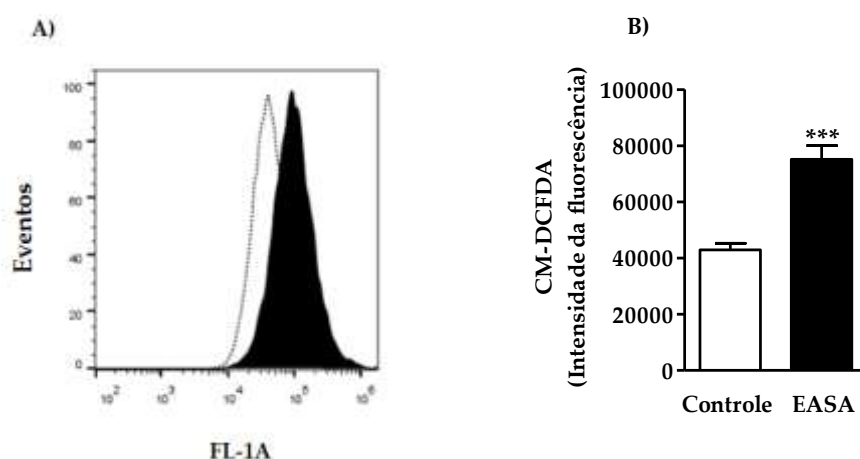
O histograma mostra a distribuição das fases do ciclo das células B16F10Nex-2 controle (sem tratamento) e tratadas (65  $\mu\text{g/mL}$  de EASA por 24 h) (Figura 8A). Não foram observadas diferenças entre as células do grupo controle e tratadas com EASA, evidenciando que o tratamento com EASA não alterou a distribuição do ciclo celular desta linhagem celular (Figura 8B).



**Figura 8.** (A) Histograma e (B) representação gráfica da porcentagem de células na fase G0/G1, S e G2/M após tratamento com EASA (65 µg/mL) por 24 h. Os dados são expressos em média ± EPM (n=3) em duplicata.

#### 2.4.2. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO)

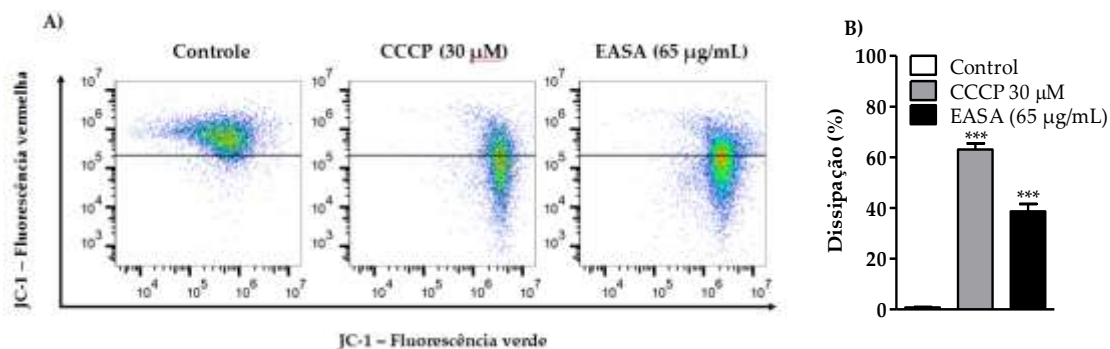
As células tratadas com EASA (65 µg/mL) apresentaram aumento dos níveis de ERO, demonstrado pelo deslocamento dos níveis de fluorescência para a direita do histograma (Figura 9A). Os níveis de ERO aumentaram em aproximadamente 75% nas células B16F10Nex-2 tratadas com AESA em comparação às células não tratadas (Figura 9B).



**Figura 9.** (A) Histograma e (B) representação gráfica da intensidade de fluorescência dos níveis de ERO das células B16F10Nex-2 tratadas com EASA (65 µg/mL). Os dados são expressos em média ± EPM (n=3) em duplicata. \*\*\*p < 0,0001 comparado com o grupo controle não tratado.

#### 2.4.3. Potencial de membrana mitocondrial

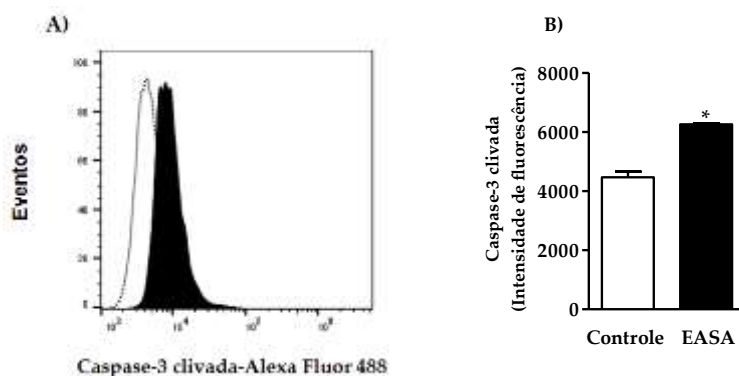
As células B16F10Nex-2 tratadas com o EASA demonstraram redução do potencial de membrana mitocondrial após 24 h de tratamento (Figura 10A). O potencial de membrana mitocondrial das células tratadas com o controle positivo CCCP (30 µM) e com EASA (65 µg/mL) foi reduzido em  $63,1 \pm 2,4$  % e  $38,7 \pm 2,9$ %, respectivamente, em relação às células controle não tratadas (Figura 10B).



**Figura 10.** (A) Gráfico de densidade e (B) representação gráfica da porcentagem da alteração do potencial de membrana mitocondrial das células de melanoma B16F10Nex-2 controle, tratadas com CCCP (30 µM) e com EASA (65 µg/mL). Os dados são expressos em média ± EPM (n=3) em duplicata. \*\*\*p < 0,0001 comparado com o grupo controle não tratado.

#### 2.4.4. Ativação da caspase-3

Ao investigar os efeitos do EASA sobre a caspase-3 em células B16F10Nex-2, foi observado deslocamento dos níveis de fluorescência para a direita do histograma (Figura 11A), com aumento de aproximadamente 40 % na intensidade da marcação da caspase-3 clivada em relação às células controle não tratadas (Figura 11B).



**Figura 11.** (A) Histograma e (B) representação gráfica da ativação da caspase-3 em células B16F10Nex-2 tratadas com EASA (65 µg/mL). Os dados são expressos em média ± EPM (n=3) em duplicata. \*p < 0,05 comparado com o grupo controle não tratado.

### 3. Discussão

As plantas medicinais são utilizadas há séculos pela humanidade na prevenção e tratamento de diversas doenças. No entanto, ainda hoje existe uma grande variedade de plantas endêmicas de biomas ainda pouco estudados que precisam ter seus constituintes químicos identificados e suas propriedades biológicas caracterizadas.

Nessa perspectiva, o Brasil vem se destacando por apresentar uma rica biodiversidade vegetal com potencial para o desenvolvimento de novas drogas antioxidantes e antitumorais, importantes na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e diferentes tipos de câncer [13].

*Stryphnodendron adstringens* é uma das espécies encontradas no Cerrado brasileiro, que demonstra potencial para desenvolvimento de novas drogas, tendo em vista sua composição química e atividades biológicas já descritas na literatura [3,5,6]. Estudos fitoquímicos prévios demonstram que as cascas do caule de *S. adstringens* apresentam proantocianidinas [32,7],

chalconas e compostos triterpênicos [4]. Esses compostos são descritos por apresentarem atividades antioxidantes e anticancerígenas [33,34,35,36].

Em nosso estudo, foram identificados ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e proantocianidinas diméricas e triméricas (taninos condensados), compostos principalmente de prodelfidina, procianidina e prorobinetidina. Essas substâncias são comumente relatadas para de *S. adstringens* [8,9]. No entanto, os metabólitos de cromona foram apenas reportados na família Fabaceae [37]. Assim, os compostos isoméricos C-hexosil- e O-pentosil-5,7-dihidroxicromona são descobertos recentemente a partir do gênero *Stryphnodendron*.

Nos últimos anos, os antioxidantes naturais têm ganhado importância pelo seu potencial profilático e terapêutico para muitas doenças, sendo uma ferramenta eficaz na eliminação de espécies reativas, responsáveis pela indução do estresse oxidativo [17,14,38]. O extrato aquoso das cascas de *S. adstringens* (EASA) demonstrou atividade antioxidante, atuando na captura dos radicais livres ABTS e DPPH. Esta propriedade está relacionada à concentração de compostos fenólicos presentes no EASA, os quais são considerados excelentes antioxidantes naturais. A ação destes compostos é descrita principalmente por sua atividade redox, atuando como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete [39], o que resulta na prevenção de várias doenças associadas ao estresse oxidativo [40]. Dentre os compostos fenólicos identificados no EASA, os taninos são descritos como importantes agentes antioxidantes [41]. Além disso, Luiz et al. [7] identificaram na casca do caule de *S. adstringens* a presença de proantocianidinas, classe de polifenóis também conhecidos como taninos condensados. As procianidinas diméricas são os compostos mais ativos da classe das proantocianidinas, atuando na eliminação de radicais livres por apresentar elevado peso molecular e alto grau de hidroxilação no anel aromático [41].

Além da ação direta na captura de radicais livres, o EASA também atuou na proteção de eritrócitos humanos contra os danos gerados pelo agente oxidante AAPH, resultando na inibição da hemólise oxidativa e redução dos níveis de MDA. Avaliações da atividade antioxidante em modelos celulares são de grande importância para investigar os mecanismos de ação de diferentes compostos, incluindo produtos naturais. A propriedade antioxidante observada nos eritrócitos não foi decorrente da regulação de expressão de genes, pois este modelo celular é anuclear, no entanto, pode ocorrer via a permeação dos compostos na membrana celular, bem como a interação com os sistemas antioxidantes endógenos [42].

As ERO atuam como indutores de oxidação dos lipídios na membrana celular, processo metabólico que resulta na liberação de diversos subprodutos, como o malondialdeído, que promove danos no DNA e pode contribuir de forma significativa para o desenvolvimento do câncer [43].

A capacidade antioxidante observada nos eritrócitos pode estar relacionada aos compostos químicos identificados no EASA. Dentre os compostos identificados, o ácido gálico é um composto fenólico bem descrito por apresentar atividades antioxidantes e anti-hemolítica em eritrócitos humano [14,44]. As procianidinas também são excelentes antioxidantes [45], capazes de proteger eritrócitos da hemólise oxidativa e da peroxidação lipídica induzida por AAPH [46,47]. Além disso, os flavonoides conhecidos como catequinas, estão entre os mais abundantes e importantes constituintes químicos do chá verde [48,49], e de outras espécies vegetais [13], descritos como inibidores da peroxidação lipídica [50].

Diversos estudos têm mostrado que extratos oriundos de produtos naturais, com elevada concentração de compostos fenólicos, inibem a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos, resultando em menor produção de malondialdeído [14,15], além de apresentarem efeitos citotóxico contra células tumorais [12,16,51].

A crescente busca por produtos naturais com propriedades antioxidantes e efeitos citotóxicos seletivos para células tumorais, estão entre as estratégias para descoberta de novos fármacos anti-câncer. Neste sentido, este estudo buscou investigar a atividade citotóxica do EASA contra a linhagem de melanoma B16F10Nex-2, bem como identificar seus mecanismos de



ação. O EASA apresentou efeito citotóxico contra as células de melanoma, com indução de morte celular por apoptose. Esses efeitos observados podem ser atribuídos à composição fenólica do EASA, uma vez que estes compostos já foram descritos por apresentarem efeitos citotóxicos em outras linhagens de células tumorais [52,54]. Modelos *in vitro* estão prontamente disponíveis e economicamente práticos. Além disso, eles têm sido amplamente aplicados, incluindo estudos relacionados à descoberta, eficácia terapêutica e identificação de mecanismos moleculares, otimizando a obtenção de resultados. Apesar do uso benéfico da linhagem B16, as células de melanoma isoladas de doadores humanos também são importantes para revelar a real relevância clínica dos compostos antitumorais [54].

O melanoma está entre os tipos de câncer descritos por apresentar quimiorresistência a agentes antitumorais [55,56]. A busca por derivados de produtos naturais tem apresentado resultados promissores para terapia deste tipo de câncer. Dentre estes, a fração clorofórmica das sementes dos frutos de *Anthelminticum centratherum* [57] e lectinas extraídas de rizomas de *Polygonatum curtonema* [58] apresentaram efeitos citotóxicos via apoptose em células do melanoma A375 resultante do aumento da produção de ERO, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, liberação do citocromo-C e ativação de caspases.

A apoptose é o processo de morte celular programada, essencial para a manutenção da homeostase, no entanto, este é o mecanismo pelo qual atuam algumas drogas antitumorais, tais como doxorubicina [59], cisplatina [60] e vimblastina [61]. Esse mecanismo é caracterizado por uma série de alterações bioquímicas e morfológicas, dentre elas, o aumento no nível de ERO [62], ativação de caspases [63], encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos [64]. ERO são moléculas quimicamente reativas produzidas nas mitocôndrias e que apresentam funções essenciais na respiração celular, atuando na manutenção da homeostase em células normais. Em células tumorais, o desequilíbrio da produção de ERO pode ser irreversível, tornando a célula vulnerável ao aumento do estresse oxidativo promovendo apoptose celular [65]. Agentes como procarbazina [66] e diversos compostos fitoquímicos têm apresentado efeito citotóxico em células tumorais através do aumento da produção de ERO intracelular [57,58,67]. O aumento de ERO promove a disfunção mitocondrial, resultando na perda do potencial de membrana mitocondrial [68]. Neste estudo, o AESA promoveu aumento da produção de ERO, o que possivelmente influenciou na disfunção do potencial de membrana mitocondrial e morte por apoptose observada nas células de melanoma. Singh et al. [69] demonstrou que proantocianidinas obtidas da fruta cramberry apresenta efeito citotóxico em células de neuroblastoma, via aumento da geração de ERO e despolarização do potencial de membrana mitocondrial. Adicionalmente, outros extratos e compostos de origem natural já foram descritos como promissores no tratamento do câncer por apresentarem aumento das ERO e despolarização do potencial de membrana mitocondrial [70,71,72,73]. A produção excessiva de ERO contribui para a morte celular apoptótica através da liberação de fatores pro apoptóticos, incluindo as caspases [74]. O AESA aumentou a atividade da caspase-3, evidenciando que a ativação desta enzima está diretamente envolvida na apoptose das células de melanoma B16F10Nex-2.

As caspases são uma família de proteases consideradas reguladores centrais da apoptose [75]. Elas atuam como um importante fator de sinalização apoptótica, desencadeada por expressão das proteínas da família Bcl-2 e pela liberação do citocromo-C a partir da membrana mitocondrial interna para o citosol [76]. As caspases podem ser ativadas através de duas vias, a extrínseca e a via intrínseca [77]. A via extrínseca inicia-se após sinalização extracelular com receptores de morte [78], já a via intrínseca é iniciada por estímulos intracelulares que desencadeiam a permeabilização da membrana mitocondrial, liberando o citocromo-C para o citosol, com a subsequente ativação da caspase-9 que ativa a caspase-3, enzima chave para a apoptose [77,79,80].

Dentre os compostos identificados, o ácido gálico apresenta efeitos citotóxicos contra diversas linhagens de células tumorais, tais como mama [81], pulmão [82], carcinoma de células

escamosas orais [83] e hepatocelular, sem apresentar efeitos citotóxicos em células normais [84]. Em células de melanoma murino B16F10, este composto é descrito por induzir a apoptose pela via mitocondrial promovendo a overexpressions das enzimas caspase-3, caspase-9, PARP-1, proteínas pró-apoptóticas Bax e Bad e underexpression das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL [85]. Nas células de melanoma humano (A375.S2), além do envolvimento das caspases e proteínas pró- e anti-apoptóticas é observado o aumento da produção de ERO e diminuição do potencial da membrana mitocondrial [86]. No entanto, Badhanie et al. [87] descrevem que o potencial anticancerígeno do ácido gálico não está relacionado à sua ação antioxidante e sim à sua atividade pró-oxidante.

As prodelphinidinas, que apresentam entre suas subunidades a galocatequina e epigalocatequina, são descritas por inibirem a proliferação celular e induzir a apoptose em células cancerígenas por vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas dependentes de caspases [88] e parada do ciclo celular [89]. Procianidinas, classe mais abundante de proantocianidinas encontrada nas plantas [88], não apresenta efeitos tóxicos para células normais [90], porém em células cancerígenas são capazes de inibir a proliferação celular e induz a morte por apoptose através do aumento de EROS [91], perda do potencial de membrana mitocondrial e ativação da caspase-3 [92]. As cromonas e seus derivados são compostos heterocíclicos distribuídos no reino vegetal [93] conhecidos por apresentarem diversas atividades farmacológicas, entre elas atividade antioxidante e anti-câncer, especialmente contra linhagens tumorais resistentes a múltiplos fármacos [94,95].

#### 4. Material e Métodos

##### 4.1. Coleta do material botânico

Cascas de *Stryphnodendron adstringens* foram coletadas em Outubro de 2014 e de 2015 no estado no Mato Grosso do Sul, Brasil, sob as coordenadas S 22° 05' 545, W 055° 20' 746, mediante autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), nº 37931-3.

A identificação do material vegetal foi realizada por um botânico da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA, UFGD), Dourados, MS, Brasil. Uma exsiccata da espécie foi depositada no Herbário DDMS sob o registro nº 4815.

##### 4.2. Preparo do extrato aquoso

Aproximadamente 300 g de casca fresca foram submetidas à maceração com água destilada (2 L) durante 48 h à temperatura ambiente. O macerado foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1, seguido de congelamento a -20 °C e posteriormente liofilizado para obter o extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (EASA). O rendimento do extrato seco foi de 2,3%, calculado usando a seguinte fórmula: rendimento da extração (%) =  $(P_{ES} / P_{CF}) \times 100$ ; onde:  $P_{ES}$  = peso do extrato seco (g) e  $P_{CF}$  = peso das cascas frescas (g). O EASA foi armazenado a -20 °C, protegido da luz.

##### 4.3. Análises químicas

###### 4.3.1. Identificação dos constituintes por LC-DAD-MS

Um sistema cromatográfico UFLC Shimadzu Prominence acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e um espectrômetro de massas foi utilizado para analisar e identificar os compostos do extrato EASA. O espectrômetro de massa foi um MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), que tinha fonte de ionização por electrospray e analisadores de tempo de voo quadrupolo. As análises de MS foram realizadas em modo negativo e positivo. Os parâmetros cromatográficos e espectrométricos de massa aplicados foram os mesmos

descritos por Nocchi et al. [27]. O extrato EASA foi solubilizado em metanol e água ultrapura (6:4, v / v) a 1 mg / mL, filtrado (membrana de PTFE, 0,22 µm, Millex® , Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) e 2 µL foram injetados na coluna cromatográfica.

#### 4.3.2. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais

##### 4.3.2.1. Compostos fenólicos

Para determinar a concentração de compostos fenólicos presentes no EASA foi realizado o método colorimétrico Folin-Ciocalteu [96]. Assim, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 1:10, v/v em água destilada) foram adicionados à 0,5 mL do EASA (na concentração de 200 µg/mL). Esta solução foi incubada no escuro durante 5 min. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 14% e incubados à temperatura ambiente durante 120 min, protegido da luz. A absorbância foi mensurada a 760 nm utilizando um espectrofotômetro T 70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). Para construir uma curva de calibração foi utilizado como padrão o ácido gálico (0,04 – 200 µg/mL). A concentração de compostos fenólicos presente no EASA foi expressa em mg equivalente ao ácido gálico (EAG) / g de EASA. O ensaio foi realizado em triplicata.

##### 4.3.2.2. Flavonoides totais

A concentração de flavonoides totais no EASA foi determinada conforme descrito por Libério et al. [97]. 4,5 mL da solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidrato a 2% (AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) foi incubado com 0,5 mL de EASA (na concentração de 200 µg/mL) e esta solução foi mantida durante 30 min à temperatura ambiente, protegida da luz. Logo após, a absorbância foi mensurada a 415 nm utilizando um espectrofotômetro T 70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK) e o flavonoide quercetina (0,04 – 200 µg/mL) foi utilizado para construir uma curva de calibração. A concentração de flavonoides foi expresso em mg equivalente de quercetina (EQ)/g de EASA. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### 4.4. Atividade antioxidante

As atividades antioxidantes foram determinadas por diferentes métodos e as doses foram definidas por ensaios previamente realizados, bem como com base em dados de espécies do bioma Cerrado [12,14-16]

##### 4.4.1. Ensaio de descoloração do radical ABTS<sup>•+</sup>

O ensaio de descoloração do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>), foi realizado de acordo com o método descrito por Re et al. [98]. O radical ABTS<sup>•+</sup> foi preparado com 5 mL da solução aquosa de ABTS (7 mM ) e 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mM ). A solução foi incubada durante 12-16 h à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, a solução foi diluída em etanol absoluto (50 mL) para obter uma absorbância de 0,70 nm ± 0,05 unidades a 734 nm em espectrofotômetro T 70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). O volume de 20 µL da solução de EASA (0,1 – 500 µg/ml) foram misturados com 1980 µL de solução do radical ABTS<sup>•+</sup>, incubada durante 6 min (à temperatura ambiente no escuro) e a absorbância foi lida a 734 nm. O ácido ascórbico (AA) foi utilizado como antioxidante de referência e um controle do extrato foi realizado para cada concentração avaliada. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. A porcentagem de inibição do ABTS<sup>•+</sup> foi calculada de acordo com a seguinte equação, onde Abscontrole é a absorbância do ABTS<sup>•+</sup> sem amostra testada.

$$\text{Inibição do radical ABTS}^{\bullet+} (\%) = (1 - \text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

#### 4.4.2. Atividade de captura do radical livre DPPH

A atividade de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi avaliada de acordo com o método descrito por Gupta & Gupta [99]. Para o ensaio, 0,2 mL do EASA (0,1 – 500 µg/mL) foi adicionado a 1,8 mL da solução de DPPH (0,11 mM, etanol 80%) e incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos no escuro. Posteriormente, a absorbância foi mensurada a 517 nm em espectrofotômetro T70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). O ácido ascórbico (AA) foi utilizado como antioxidante de referência e um controle do extrato foi realizado para cada concentração avaliada. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. A inibição foi determinada de acordo com a seguinte equação, onde  $Ab_{\text{Scontrole}}$  é a absorbância da solução de DPPH sem amostra.

$$\text{Atividade de captura do DPPH (\%)} = (1 - Ab_{\text{amostra}}/Ab_{\text{Scontrole}}) \times 100$$

#### 4.4.3. Ensaio antioxidante em eritrócitos humano

##### Preparação da suspensão de eritrócitos

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD, Brasil (CEP número do parecer 2.407.793)). Os eritrócitos obtidos a partir de sangue periférico de doadores saudáveis. O sangue coletado foi adicionado em tubos contendo anticoagulante citrato de sódio e centrifugados (400 x g por 10 min). Posteriormente, o plasma foi removido e os eritrócitos foram lavados três vezes com solução de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl). Os eritrócitos foram resuspenso em solução de NaCl 0,9% obtendo uma concentração final de 2,5%.

##### Atividade hemolítica e inibição da hemólise oxidativa

As avaliações da atividade hemolítica e da peroxidação lipídica foram determinadas em eritrócitos humanos de acordo com o método descrito por Campos et al. [100]. Os eritrócitos foram pré-incubados com EASA ou ácido ascórbico (50-125 µg/mL) à 37 °C durante 30 min. Em seguida, 0,5 mL de NaCl 0,9% foram adicionados para avaliar a atividade hemolítica dos tratamentos ou 0,5 mL do agente 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) a 50 mM foram adicionados para avaliar a proteção contra a hemólise oxidativa. Como controle de hemólise basal, os eritrócitos foram incubados com NaCl 0,9 %, enquanto que para hemólise total os eritrócitos foram incubados com água destilada. Os tratamentos foram mantidos por 240 min a 37 °C sob agitação constante e analisados a cada 60 min. Para avaliar a hemólise, os respectivos tubos (de cada período) foram centrifugados a 700 x g durante 5 min e o sobrenadante (0,2 mL) foram recolhidos, adicionados a 1800 µL de NaCl e mensurado a absorbância a 540 nm em espectrofotômetro T70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). A porcentagem de hemólise foi calculada pela fórmula abaixo, onde A é a absorbância da amostra e B é a absorbância da hemólise total. Foram realizados três experimentos em duplicata.

$$\text{Hemólise (\%)} = (A_{\text{amostra}}/B_{\text{hemólise total}}) \times 100$$

##### Dosagem do malondialdeído (MDA)

A capacidade de proteção do EASA contra a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos foi determinada pela dosagem de malondialdeído (MDA), de acordo com o método descrito por Campos et al. [100]. Os eritrócitos foram pré-incubados com EASA ou ácido ascórbico (50-125 µg/mL) à 37 °C durante 30 min. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL da solução oxidante AAPH (50 mM) em cada tratamento e incubados em foram adicionados, sendo mantidos a 37 °C durante 4 h com agitação constante. Após 60, 120, 180 e 240 min os tubos

foram centrifugados a 700 x g durante 5 min e 0,5 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 10 nmol e incubados a 96 °C por 45 min. Logo após, as amostras foram resfriadas, adicionou-se 4 mL de álcool n-butílico e centrifugou-se 1600 x g durante 5 min. O sobrenadante lido a 532 nm em espectrofotômetro T70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). O controle foi preparado misturando-se TBA (1 mL) e solução de MDA 20 mM (0,5 mL). Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Os níveis de MDA das amostras foram expressos em nmol/mL, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{MDA (nmol/mL)} = \text{Abs amostra} \times \left( \frac{20 \times 220,32}{\text{Abs padrão MDA}} \right)$$

#### 4.5. Cultura de Células

Sangue periférico humano de doadores saudáveis foi coletado em tubos contendo anticoagulante citrato de sódio. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por Ficoll Histopaque-1077 (1,077 g/cm<sup>3</sup>) (Sigma-Aldrich, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. O sangue foi centrifugado a 400 x g durante 30 min separando células mononucleares em interfases facilmente diferenciadas. O uso de amostras humanas e o termo de consentimento livre e esclarecido para os doadores foram aprovados pelo Comitê de Ética local da Universidade Federal da Grande Dourados (protocolo número 2.407.793).

A linhagem celular B16F10 foi originalmente obtida do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC), filial em São Paulo, Brasil. A B16F10Nex-2, uma sublinhagem isolada na Unidade Experimental em Oncologia (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP), mantém as mesmas características que a linhagem tumoral original com moderada agressividade *in vivo*. As células mononucleares do sangue periférico e B16F10Nex-2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Minneapolis, MN) suplementada com 10 nM de 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), 24 nM de bicarbonato de sódio e 10 % de soro fetal bovino (SFB), todos da Gibco/Invitrogen, e 40 mg/mL de gentamicina (Hipolabor Farmacêutica, Sabará, MG, Brasil). Todas as células foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

##### 4.5.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi realizada pelo ensaio colorimétrico utilizando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Células PBMC (12x10<sup>4</sup> células/mL) e B16F10Nex-2 (5 x10<sup>3</sup> células/mL) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações do EASA (0-500 µg/mL em RPMI 1640) durante 24 e 48 h. Após os tratamentos, o meio foi removido e em seguida adicionado 100 µL de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço, seguido de incubação por 4 h a 37 °C. Após este período, o sobrenadante foi removido e em seguida adicionado 100 µL de solvente (SDS 10 %, HCl 0.01M e água milli-q) para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi determinada a 630 nm usando Leitor SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A inibição da viabilidade foi calculada com a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Abs}_{\text{células tratadas}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

##### 4.5.2. Perfil de morte celular

O perfil de morte celular foi avaliado de acordo com os métodos descritos por Paredes-Gamero et al. [101], com pequenas modificações. Células B16F10Nex-2 foram cultivadas em placas de 48 poços (1 x 10<sup>4</sup> células/mL) em meio RPMI contendo 10% de FBS durante 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com IC<sub>50</sub> de EASA (65 µg / mL) e 100 µg / mL. Em seguida, as células foram desprendidas e lavadas com PBS. Posteriormente, as células foram ressuspensas em tampão de marcação anexina (0,14 M NaCl, 0,01 M Heps e 2,5 Mm CaCl<sub>2</sub>, pH

7,4). As células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) durante 15 min em temperatura ambiente, de acordo com as instruções do fabricante. Um total de 10.000 eventos foram adquiridos por amostra através da análise em um citômetro de fluxo Accuri C6 (Becton Dickinson). A análise foi realizada usando o software FlowJo v10.2 LCC (Ashland, OR, USA).

#### 4.5.3. Fases do ciclo celular

A distribuição do ciclo celular foi realizada de acordo com o método descrito por Paredes-Gamero et al. [101]. Células B16F10Nex-2 foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $6 \times 10^4$  células/mL) e cultivadas com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB na ausência ou presença do EASA (65  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 h a 37 °C. Após este período, as células foram fixadas e permeabilizadas como previamente descrito e incubadas com 4 mg/ml de RNase (Sigma-Aldrich) por 1 h a 37 °C. Para marcação do DNA celular, as células foram incubadas com 5  $\mu\text{g/ml}$  de SytoxGreen (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) foi determinada por citometria de fluxo Accuri™ C6 (Becton Dickinson). Um total de 20.000 eventos foram adquiridos por amostra. A análise foi realizada usando o software FlowJo v10.2 LCC.

#### 4.5.4. Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Os níveis intracelulares de ERO foram avaliados por citometria de fluxo utilizando o corante diacetato 2, 7-dicloro-di-hidrofluoresceína (CM-H2DCFDA) (Molecular Probe-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As células B16F10Nex-2 foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $6 \times 10^4$  células/mL) e tratadas com EASA (65  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 h à 37 °C. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e incubadas com 10  $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>DCFDA por 30 min em temperatura ambiente e protegidas da luz. A fluorescência das ERO foi avaliada em citômetro de fluxo Accuri™ C6 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. A análise foi realizada usando o software FlowJo v10.2 LCC.

#### 4.5.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para avaliar os possíveis efeitos do EASA sobre o potencial de membrana mitocondrial, células B16F10Nex-2 foram incubadas com o marcador fluorescente Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro- 1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1); Molecular Probes, Eugene, OR, USA) de acordo com o método descrito por Moraes et al. [102]. A sonda JC-1 é acumulada nas mitocôndrias, sendo dependente do potencial. Células viáveis apresentam elevado potencial de membrana mitocondrial, e são marcadas em vermelho. Quando o potencial de membrana mitocondrial diminui, as células são marcadas em verde. Neste ensaio, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $6 \times 10^4$  células/mL) contendo meio RPMI suplementado com 10% de FBS e tratadas com o controle positivo carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP, 30  $\mu\text{M}$ ) ou EASA (65  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 h à 37 °C. Após esse período, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e incubadas com JC-1 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) por 15 min em temperatura ambiente. A fluorescência foi analisada em citômetro de fluxo Accuri™ C6 usando o software CellQuest (Becton Dickinson). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. A análise foi realizada usando o software FlowJo v10.2 LCC..

#### 4.5.6. Atividade da caspase-3

A ativação da caspase-3 foi avaliada por citometria de fluxo de acordo com método descrito por Moraes et al. [102], com pequenas modificações. Células B16F10Nex-2 foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $6 \times 10^4$  células/poço) contendo meio RPMI suplementado com 10 % de SFB e tratadas com EASA (65  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 h a 37 °C. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% em PBS durante 30 min e permeabilizadas em 0,01% de

saponina por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com o caspase clivada 3 (Asp175) e com anticorpo conjugado Alexa Fluor 488 a temperatura ambiente e protegidas da luz. Após incubação, a fluorescência foi analisada em citômetro de fluxo Accuri™ C6 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. A análise foi realizada usando o software FlowJo v10.2 LCC.

#### 4.6. Análise estatística

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas significativas entre grupos foram determinadas utilizando o teste Student t-test para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA), seguido por teste de Dunnett's, para comparação de dois ou mais grupos, utilizando o Software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 5. Conclusões

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que o EASA da casca do caule apresenta elevada concentração de compostos fenólicos (flavan-3-ols, ácido gálico, proantocianidinas e cromonas), o que possivelmente está relacionado às atividades antioxidantes e efeitos anticâncer em células de melanoma B16F10Nex-2. Além disso, o EASA promoveu morte celular por apoptose, via aumento dos níveis de ERO intracelular, disfunção do potencial de membrana mitocondrial e ativação da caspase-3 clivada. Resultados que abrem novas perspectivas de investigações destes efeitos contra outras linhagens de células tumorais, bem como em modelos *in vivo* de câncer.

**Materiais Suplementares:** materiais complementares podem ser encontrados em [www.mdpi.com/link](http://www.mdpi.com/link)

**Contribuições dos autores:** Débora da Silva Baldivia, Daniel Ferreira Leite, David Tsuyoshi de Castro, Jaqueline Ferreira Campos, Uilson Pereira dos Santos, Edgar Julián Paredes-Gamero, Carlos Alexandre Carollo, Denise Brentan Silva, Kely de Picoli Souza e Edson Lucas dos Santos desenharam os experimentos; Débora da Silva Baldivia, Daniel Ferreira Leite, David Tsuyoshi de Castro, Jaqueline Ferreira Campos, Uilson Pereira dos Santos, Edgar Julián Paredes-Gamero, Carlos Alexandre Carollo, Denise Brentan Silva, Kely de Picoli Souza e Edson Lucas dos Santos realizaram os experimentos; Débora da Silva Baldivia, Daniel Ferreira Leite, David Tsuyoshi de Castro, Jaqueline Ferreira Campos, Uilson Pereira dos Santos, Edgar Julián Paredes-Gamero, Carlos Alexandre Carollo, Denise Brentan Silva, Kely de Picoli Souza e Edson Lucas dos Santos analisaram os dados; Edgar Julián Paredes-Gamero, Carlos Alexandre Carollo, Denise Brentan Silva, Kely de Picoli Souza e Edson Lucas dos Santos contribuíram com as análises/reagentes/materiais; Débora da Silva Baldivia, David Tsuyoshi de Castro, Jaqueline Ferreira Campos, Uilson Pereira dos Santos, Carlos Alexandre Carollo, Denise Brentan Silva, Kely de Picoli Souza e Edson Lucas dos Santos escreveram o artigo. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

**Agradecimentos:** Este trabalho foi financiado pelos órgãos de fomento: Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brasil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil).

**Conflitos de Interesse:** Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

#### Abreviações

AAPH	2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorato
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico)
CCCP	Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona
CM-H2DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente ao ácido gálico
EASA	Extrato aquoso de <i>Stryphnodendron adstringens</i>
EPM	Erro padrão da média
EQ	Equivalente à quercetina
ERO	Espécie reativa de oxigênio
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico
ILPC	Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer
MDA	Malondealdeído
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltertrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico, do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PI	Iodeto de propídeo
SFB	Soro fetal bovino
TBA	Ácido tiobarbitúrico



## Referências

1. Santana, B.F.; Voeks, R.A.; Funch, L.S. Ethnomedicinal survey of a maroon community in Brazil's Atlantic tropical forest. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *181*, 37-49. [10.1016/j.jep.2016.01.014](https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.014)
2. Albuquerque, U.P.; Monteiro, J.M.; Ramos, M.A.; de Amorim, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 76-91. [10.1016/j.jep.2006.09.010](https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.010)
3. Hernandez, L.; Pereira, L.M.D.S.; Palazzo, F.; Mello, J.C.P.D. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, *46*, 431-436. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502010000300005>
4. Lima, J.C.S.; Martins, D.T.O.; de Souza, P.T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother Res.* **1998**, *12*, 218-220. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199805\)12:3<218::AID-PTR220>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199805)12:3<218::AID-PTR220>3.0.CO;2-4)
5. Henriques, B.O.; Corrêa, O.; Azevedo, E.P.C.; Pádua, R.M.; de Oliveira, V.L.; Oliveira, T.H.C.; Boff, D.; Dias, A.C.F.; de Souza, D.G.; Amaral, F.A.; Teixeira, M.M.; Castilho, R.O.; Braga, F.C. In vitro TNF-inhibitory activity of brazilian plants and anti-inflammatory effect of *Stryphnodendron adstringens* in an acute arthritis model. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2016**, *2016*. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9872598>.
6. Morey, A.T.; Souza, F.C.; Santos, J.P.; Pereira, C.A.; Cardoso, J.D.; de Almeida, R.S.; Costa, M.A.; Mello, J.C.; Nakamura, C.V.; Pinge-Filho, P.; Yamauchi, L.M.; Yamada-Ogatta, S.F. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on candida tropicalis growth and adhesion properties. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17*, 365-375. [10.2174/1389201017666151223123712](https://doi.org/10.2174/1389201017666151223123712).
7. Luiz, R.L.; Vila, T.V.; Mello, J.C.; Nakamura, C.V.; Rozental, S.; Ishida, K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *BMC Complement. Altern. Med.* **2015**, *15*, 68. [10.1186/s12906-015-0597-4](https://doi.org/10.1186/s12906-015-0597-4)
8. Mello, J.P.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*. **1996**, *42*, 857-862, 1996. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00953-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00953-1)
9. Mello, J.C.P.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*. **1999**, *51*, 1105-1107. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00715-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00715-8)
10. Padumadasa, C.; Dharmadana, D.; Abeysekera, A.; Thammitiyagodage, M. *In vitro* antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of ethyl acetate soluble proanthocyanidins of the inflorescence of *Cocos nucifera* L. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 345. [10.1186/s12906-016-1335-2](https://doi.org/10.1186/s12906-016-1335-2)
11. Meng, X.H.; Liu, C.; Fan, R.; Zhu, L.F.; Yang, S.X.; Zhu, H.T.; Wang, D.; Yang, C.R.; Zhang, Y.J. Antioxidative Flavan-3-ol Dimers from the Leaves of *Camellia fangchengensis*. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 247-254. [10.1021/acs.jafc.7b04572](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04572)
12. Casagrande, J.C.; Macorini, L.F.B.; Antunes, K.A.; dos Santos, U.P.; Campos, J.F.; Dias-Júnior, N.M.; Sangalli, A.; Cardoso, C.A.L.; Vieira, M.D.C.; Rabelo, L.A.; Paredes-Gamero, E.J.; Santos, E.L.; Souza, K.P. Antioxidant and cytotoxic activity of hydroethanolic extract from *Jacaranda decurrens* leaves. *PLoS One*. **2014**, *9*, e112748. [10.1371/journal.pone.0112748](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112748)
13. Campos, J.F.; Castro, D.T.H.; Damião, M.J.; Torquato, H.F.V.; Paredes-Gamero, E.J.; Carollo, C.A.; Estevinho, L.M.; Souza, K.P.; Santos, E.L. The chemical profile of *Senna velutina* leaves and their antioxidant and cytotoxic effects. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, *2016*, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8405957>
14. Espindola, P.T.; Rocha, P.S.; Carollo, C.A.; Schmitz, W.O.; Pereira, Z.V.; Vieira, M.C.; Santos, E.L.; Souza, K.P. Antioxidant and antihyperlipidemic effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg root. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, *2016*, 1-8. [10.1155/2016/7910340](https://doi.org/10.1155/2016/7910340).
15. Lopes, R.H.; Macorini, L.F.; Antunes, K.Á.; Espindola, P.T.; Alfredo, T.M.; da Rocha, P.S.; Pereira, Z.V.; Santos, E.L.; Souza, K.P. Antioxidant and hypolipidemic activity of the hydroethanolic extract of *Curatella americana* l. leaves. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, *2016*, 1-6. [10.1155/2016/9681425](https://doi.org/10.1155/2016/9681425)
16. Santos, U.P.; Campos, J.F.; Torquato, H.F.; Paredes-Gamero, E.J.; Carollo, C.A.; Estevinho, L.M.; Souza, K.P.; Santos, E.L. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. *PLoS One*. **2016**, *11*, e0167531. [10.1371/journal.pone.0167531](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167531)
17. Ratnam, D.V.; Ankola, D.D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D.K.; Kumar, M.N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control. Release.* **2006**, *113*, 189-207. [10.1016/j.jconrel.2006.04.015](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.015)

18. Acharya, A.; Das, I.; Chandhok, D.; Saha, T. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2010**, *3*, 23-34. [10.4161/oxim.3.1.10095](https://doi.org/10.4161/oxim.3.1.10095)
19. Dror, S.; Sander, L.; Schwartz, H.; Sheinboim, D.; Barzilai, A.; Dishon, Y.; Apcher, S.; Golan, T.; Greenberger, S.; Barshack, I.; Malcov, H.; Zilberberg, A.; Levin, L.; Nessling, M.; Friedmann, Y.; Igras, V.; Barzilay, O.; Vaknine, H.; Brenner, R.; Zinger, A.; Schroeder, A.; Gonen, P.; Khaled, M.; Erez, N.; Hoheisel, J.D.; Levy, C. Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 1006-1017. [10.1038/ncb3399](https://doi.org/10.1038/ncb3399).
20. Gorantla, V.C.; Kirkwood, J.M. State of melanoma: an historic overview of a field in transition. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2014**, *28*, 415-435. [10.1016/j.hoc.2014.02.010](https://doi.org/10.1016/j.hoc.2014.02.010)
21. World Health Organization (WHO). Ultraviolet radiation and the Intersun Programme. Skin cancers. Available online: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. (accessed on 15 July 2016).
22. American Cancer Society (ACS). Melanoma skin cancer detailed guide. Available online: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates-for-melanoma-skin-cancer-by-stage.html>. (accessed on 31 July 2017).
23. Marelli, M.M.; Marzagalli, M.; Moretti, R.M.; Beretta, G.; Casati, L.; Comitato, R.; Gravina, G.L.; Festuccia, C.; Limonta, P. Vitamin E  $\delta$ -tocotrienol triggers endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in human melanoma cells. *Sci Rep.* **2016**, *6*, [10.1038/srep30502](https://doi.org/10.1038/srep30502)
24. Mattia, G.; Puglisi, R.; Ascione, B.; Malorni, W.; Carè, A.; Matarrese P. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death. Dis.* **2018**, *9*, 112. [10.1038/s41419-017-0059-7](https://doi.org/10.1038/s41419-017-0059-7)
25. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661. [10.1021/acs.jnatprod.5b01055](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055).
26. Cragg, G.M.; Newman, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1830*, 3670-3695. [10.1016/j.bbagen.2013.02.008](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008)
27. Nocchi, S.R.; Companhoni, M.V.; de Mello, J.C.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, C.V.; Carollo, C.A.; Silva, D.B.; Ueda-Nakamura, T. Antiviral Activity of Crude Hydroethanolic Extract from *Schinus terebinthifolia* against Herpes simplex Virus Type 1. *Planta Med.* **2017**, *83*, 509-518. [10.1055/s-0042-117774](https://doi.org/10.1055/s-0042-117774)
28. Isler, A.C.; Lopes, G.C.; Cardoso, M.L.C.; Mello, J.C.P. Development and validation of a LC-method for the determination of phenols in a pharmaceutical formulation containing extracts from *Stryphnodendron adstringens*. *Quím. Nova*, **2010**, *33*, 1126-1129. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000500023>
29. Robeson, D.J.; Ingham, J.L.; Harborne, J.B. Identification of two chromone phytoalexins in the sweet pea, *Lathyrus odoratus*. *Phytochemistry.* **1980**, *19*, 2171-2173. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82217-Z](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82217-Z)
30. Yang, S.J.; Ryu, J.H.; Jang, D.S.; Yang, L.; Han, H.K. A sensitive LC-MS/MS method for the quantitative determination of biflorin in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *115*, 272-276. [10.1016/j.jpba.2015.07.032](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.07.032)
31. Zou, L.; Li, X.; Shi, Q.; Feng, F. An effective integrated method for comprehensive identification of eighty-five compounds in Zhi-Zi-Da-Huang decoction by HPLC-DAD-ESI-MS (TOF) and HPLC-DAD-ESI-MS/MS (QqQ) without the help of reference standards. *Anal. Methods.* **2014**, *6*, 4312-4327. <http://dx.doi.org/10.1039/C4AY00219A>
32. Pinto, S.C.; Bueno, F.G.; Panizzon, G.P.; Morais, G.; dos Santos, P.V.; Baesso, M.L.; Leite-Mello, E.V.; de Mello, J.C. *Stryphnodendron adstringens*: clarifying wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med.* **2015**, *81*, 1090-1096. [10.1055/s-0035-1546209](https://doi.org/10.1055/s-0035-1546209).
33. Chen, X.; Liu, Z.; Meng, R.; Shi, C.; Guo, N. Antioxidative and anticancer properties of Licochalcone A from licorice. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *198*, 331-337. [10.1016/j.jep.2017.01.028](https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.028)
34. Allouche, Y.; Warleta, F.; Campos, M.; Sánchez-Quesada, C.; Uceda, M.; Beltrán, G.; Gaforio, J.J. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *59*, 121-130. [10.1021/jf102319y](https://doi.org/10.1021/jf102319y)
35. Orlikova, B.; Tasdemir, D.; Golais, F.; Dicato, M.; Diederich, M. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes Nutr.* **2011**, *6*, 125-147. [10.1007/s12263-011-0210-5](https://doi.org/10.1007/s12263-011-0210-5).

36. Mendoza-Wilson, A.M.; Castro-Arredondo, S.I.; Espinosa-Plascencia, Robles-Burgueño, M.R.; Balandrán-Quintana, R.R.; Bermúdez-Almada, M.C. Chemical composition and antioxidant-prooxidant potential of a polyphenolic extract and a proanthocyanidin-rich fraction of apple skin. *Heliyon*. **2016**, *2*, e00073. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00073>
37. Amoussa, A.M.; Bourjot, M.; Lagnika, L.; Vonthron-Sénécheau, C.; Sanni, A. Acthaside: a new chromone derivative from *Acacia ataxacantha* and its biological activities. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 506. [10.1186/s12906-016-1489-y](https://doi.org/10.1186/s12906-016-1489-y)
38. Santos, H.F.D.; Campos, J.F.; Santos, C.M.D.; Balestieri, J.B.P.; Silva, D.B.; Carollo, C.A.; Souza, K.P.; Estevinho, L.M.; Santos, E.L. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 953. [10.3390/ijms18050953](https://doi.org/10.3390/ijms18050953)
39. Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3954-3962. DOI: [10.1021/jf990146l](https://doi.org/10.1021/jf990146l)
40. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. **2010**, *15*, 7313-7352. [10.3390/molecules15107313](https://doi.org/10.3390/molecules15107313)
41. Macáková, K.; Kolečkář, V.; Cahlíková, L.; Chlebek, J.; Hošťálková, A.; Kuča, K.; Jun, D.; Opletal, L. Chapter 6: Tannins and their Influence on Health. In *Recent Advances in Medicinal Chemistry*, 1st ed.; Choudhary, M.I.; Perry, G.; Rahman, A. Elsevier, Bentham Science Publishers, San Antonio, TX, EUA, 2014; Vol. 1, pp.159-208, ISBN 978-0-12-803961-8.
42. López-Alarcón, C.; Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta.* **2013**, *763*, 1-10. [10.1016/j.aca.2012.11.051](https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051)
43. Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2014**, *2014*, 360438. [10.1155/2014/360438](https://doi.org/10.1155/2014/360438)
44. Suwalsky, M.; Colina, J.; Gallardo, M.J.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K.; Manrique-Moreno, M.; Sepúlveda, B. Antioxidant capacity of gallic acid *in vitro* assayed on human erythrocytes. *J. Membr. Biol.* **2016**, *249*, 769-779. [10.1007/s00232-016-9924-z](https://doi.org/10.1007/s00232-016-9924-z)
45. Li, W.; Liu, J.; Guan, R.; Chen, J.; Yang, D.; Zhao, Z.; Wang, D. Chemical characterization of procyanidins from *Spatholobus suberectus* and their antioxidative and anticancer activities. *J. Funct. Foods.* **2015**, *12*, 468-477. [doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.009](https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.009)
46. Zhu, Q.Y.; Schramm, D.D.; Gross, H.B.; Holt, R.R.; Kim, S.H.; Yamaguchi, T.; Kwik-Urbe, C.L.; Keen, C.L. Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical-induced human erythrocyte hemolysis. *Clin. Dev. Immunol.* **2005**, *12*, 27-34. [10.1080/17402520512331329514](https://doi.org/10.1080/17402520512331329514)
47. Arwa, P.S.; Zeraik, M.L.; Ximenes, V.F.; da Fonseca, L.M.; Bolzani, Vda. S.; Siqueira Silva, D.H.S. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *174*, 410-418. [10.1016/j.jep.2015.08.041](https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.041)
48. Majchrzak, D.; Mitter, S.; Elmadfa, I. The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas. *Food Chem.* **2004**, *88*, 447-451. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.058>
49. Macedo, J.A.; Battestin, V.; Ribeiro, M.L.; Macedo, G.A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chem.* **2011**, *126*, 491-497. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.026>
50. Chen, L.; Yang, X.; Jiao, H.; Zhao, B. Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicol. Sci.* **2002**, *69*, 149-156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215669>
51. Campos, J.F.; Santos, U.P.; Macorini, L.F.B.; Melo, A.M.M.F.; Balestieri, J.B.P.; Paredes-Gamero, E.J.; Cardoso, C.A.L.; Souza, K.P.; Santos, E.L.D. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *65*, 374-380. [10.1016/j.fct.2014.01.008](https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.008)
52. Gong, Y.; Fang, F.; Zhang, X.; Liu, B.; Luo, H.; Li, Z.; Zhang, X.; Zhang, Z.; Pang, X. B Type and complex A/B Type epicatechin trimers isolated from Litchi pericarp aqueous extract show high antioxidant and anticancer activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 301. doi: [10.3390/ijms19010301](https://doi.org/10.3390/ijms19010301)
53. Ravi Shankara, B.E.; Ramachandra, Y.L.; Rajan, S.S.; Ganapathy, P.S.; Yarla, N.S.; Richard, S.A.; Dhananjaya, B.L. Evaluating the anticancer potential of ethanolic gall extract of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz.(Combretaceae). *Pharmacognosy Res.* **2016**, *8*, 209. [10.4103/0974-8490.182919](https://doi.org/10.4103/0974-8490.182919)

54. Kuete, V.; Mbaveng, A.T.; Nono, E.C.; Simo, C.C.; Zeino, M.; Nkengfack, A.E.; Efferth, T. Cytotoxicity of seven naturally occurring phenolic compounds towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. *Phytomedicine*. **2016**, *23*, 856-863. [10.1016/j.phymed.2016.04.007](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.04.007)
55. Brys, A.K.; Gowda, R.; Loriaux, D.B.; Robertson, G.P.; Mosca, P.J. Nanotechnology-based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 565-577. [10.1016/j.biotechadv.2016.01.004](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.01.004)
56. Soengas, M.S.; Lowe, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. **2003**, *22*, 3138-3151. [10.1038/sj.onc.1206454](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206454)
57. Looi, C.Y.; Moharram, B.; Paydar, M.; Wong, Y.L.; Leong, K.H.; Mohamad, K.; Arya, A.; Wong, W.F.; Mustafa, M.R. Induction of apoptosis in melanoma A375 cells by a chloroform fraction of *Centrathrum anthelminticum* (L.) seeds involves NF-kappaB, p53 and Bcl-2-controlled mitochondrial signaling pathways. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 166. [10.1186/1472-6882-13-166](https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-166)
58. Liu, B.; Cheng, Y.; Zhang, B.; Bian, H.J.; Bao, J.K. *Polygonatum cyrtonema* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway. *Cancer Lett.* **2009**, *275*, 54-60. [10.1016/j.canlet.2008.09.042](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.09.042)
59. Wang, S.; Konorev, E.A.; Kotamraju, S.; Joseph, J.; Kalivendi, S.; Kalyanaraman, B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms intermediacy of H2O2-and p53-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25535-25543. [10.1074/jbc.M400944200](https://doi.org/10.1074/jbc.M400944200)
60. Florea, A.M.; Büsselberg, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. **2011**, *3*, 1351-1371. [10.3390/cancers3011351](https://doi.org/10.3390/cancers3011351)
61. Selimovic, D.; Badura, H.E.; El-Khattouti, A.; Soell, M.; Porzig, B.B.; Spernger, A.; Ghanjati, F.; Santourlidis, S.; Haikel, Y.; Hassan, M. Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by Ras homologous A protein (Rho A) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms. *Apoptosis*. **2013**, *18*, 980-997. [10.1007/s10495-013-0844-4](https://doi.org/10.1007/s10495-013-0844-4)
62. Simon, H.U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Schaffer, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. **2000**, *5*, 415-418. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1009616228304>
63. Kaufmann, S.H.; Lee, S.H.; Meng, X.W.; Loegering, D.A.; Kottke, T.J.; Henzing, A.J.; Earnshaw, W.C.; Ruchaud, S.; Samejima, K.; Earnshaw, W.C. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*. **2008**, *44*, 262-272. [10.1016/j.ymeth.2007.11.005](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.005)
64. Bortner, C.D.; Cidlowski, J.A. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death. Differ.* **2002**, *9*, 1307-1310, 2002. [10.1038/sj.cdd.4401126](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401126)
65. Chakraborty, B.; Dutta, D.; Mukherjee, S.; Das, S.; Maiti, N.C.; Das, P.; Chowdhury, C. Synthesis and biological evaluation of a novel betulinic acid derivative as an inducer of apoptosis in human colon carcinoma cells (HT-29). *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *102*, 93-105. [10.1016/j.ejmech.2015.07.035](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.035)
66. Renschler, M.F. The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. *Eur. J. Cancer*. **2004**, *40*, 1934-1940. [10.1016/j.ejca.2004.02.031](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.02.031)
67. Anantharaman, A.; Hemachandran, H.; Mohan, S.; Ayyathan, D.M.; Kumar, D.T.; Doss, G.P.C.; Siva, R. Induction of apoptosis by apocarotenoids in B16 melanoma cells through ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway. *J. Funct. Foods*. **2016**, *20*, 346-357. [doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.019](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.019)
68. Shi, X.J.; Yu, B.; Wang, J.W.; Qi, P.P.; Tang, K.; Huang, X.; Liu, H.M. Structurally novel steroidal spirooxindole by241 potentially inhibits tumor growth mainly through ROS-mediated mechanisms. *Sci Rep.* **2016**, *6*. [10.1038/srep31607](https://doi.org/10.1038/srep31607)
69. Singh, A.P.; Lange, T.S.; Kim, K.K.; Brard, L.; Horan, T.; Moore, R.G.; Vorsa, N.; Singh, R.K. Purified cranberry proanthocyanidines (PAC-1A) cause pro-apoptotic signaling, ROS generation, cyclophosphamide retention and cytotoxicity in high-risk neuroblastoma cells. *Int. J. Oncol.* **2012**, *40*, 99-108. [10.3892/ijo.2011.1225](https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1225)
70. Zhang, Y.; Luo, M.; Zu, Y.; Fu, Y.; Gu, C.; Wang, W.; Yao, L.; Efferth, T. Dryofragin, a phloroglucinol derivative, induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through ROS-mediated mitochondrial pathway. *Chem. Biol. Interact.* **2012**, *199*, 129-136. [10.1016/j.cbi.2012.06.007](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.06.007)
71. Jin, M.L.; Park, S.Y.; Kim, Y.H.; Park, G.; Lee, S.J. Halofuginone induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits migration via downregulation of matrix metalloproteinase-9. *Int. J. Oncol.* **2014**, *44*, 309-318. [10.3892/ijo.2013.2157](https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2157)
72. Chan, C.K.; Supriady, H.; Goh, B.H.; Kadir, H.A. *Elephantopus scaber* induces apoptosis through ROS-dependent mitochondrial signaling pathway in HCT116 human colorectal carcinoma cells. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *168*, 291-304. [10.1016/j.jep.2015.03.072](https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.072)

73. Rahman, M.A.; Akhtar, J.; Sahabjada.; Arshad, M. Evaluation of cytotoxic potential and apoptotic effect of a methanolic extract of *Bauhinia racemosa* Lam. against a human cancer cell line, HeLa. *Eur. J. Integr. Med.* **2016**, *8*, 513-518. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.02.004>
74. Qian, Y.; Guan, T.; Huang, M.; Cao, L.; Li, Y.; Cheng, H.; Jin, H.; Yu, D. Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria-dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF- $\kappa$ B activation in a cerebral ischemia mouse model. *Neurochem. Int.* **2012**, *60*, 759-767. [10.1016/j.neuint.2012.03.011](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.03.011)
75. Kuranaga, E. Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. *Genes Cells.* **2012**, *17*, 83-97. [10.1111/j.1365-2443.2011.01579.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01579.x)
76. Kwon, S.J.; Lee, J.H.; Moon, K.D.; Jeong, I.Y.; Ahn, D.U.; Lee, M.K.; Seo, K.I. Induction of apoptosis by isoegomaketone from *Perilla frutescens* L. in B16 melanoma cells is mediated through ROS generation and mitochondrial-dependent,-independent pathway. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *65*, 97-104. [10.1016/j.fct.2013.12.031](https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.031)
77. Ichim, G.; Tait, S.W. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer.* **2016**, 539-548. [10.1038/nrc.2016.58](https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58)
78. Taylor, R.C.; Cullen, S.P.; Martin, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 231-241. [10.1038/nrm2312](https://doi.org/10.1038/nrm2312)
79. Zhang, G.; Liu, S.; Liu, Y.; Wang, F.; Ren, J.; Gu, J.; Zhou, K.; Shan, B. A novel cyclic pentapeptide, H-10, inhibits B16 cancer cell growth and induces cell apoptosis. *Oncol. Lett.* **2014**, *8*, 248-252. [10.3892/ol.2014.2121](https://doi.org/10.3892/ol.2014.2121)
80. Tait, S.W.G.; Green, D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 621-632. [10.1038/nrm2952](https://doi.org/10.1038/nrm2952)
81. Wang, K.; Zhu, X.; Zhang, K.; Zhu, L.; Zhou, F. Investigation of gallic acid induced anticancer effect in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2014**, *28*, 387-393. [10.1002/jbt.21575](https://doi.org/10.1002/jbt.21575)
82. Wang, R.; Ma, L.; Weng, D.; Yao, J.; Liu, X.; Jin, F. Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in human small cell lung cancer H446 cell line via the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 3075-3083. [10.3892/or.2016.4690](https://doi.org/10.3892/or.2016.4690)
83. Santos, E.M.S.; Rocha, R.G.; Santos, H.O.; Guimarães, T.A.; Fraga, C.A.C.; Silveira, L.H.; Batista, P.R.; Oliveira, P.S.L.; Melo, G.A.; Santos, S.H.; Paula, A.M.B.; Guimarães, A.L.S.; Farias, L.C. Gallic acid modulates phenotypic behavior and gene expression in oral squamous cell carcinoma cells by interfering with leptin pathway. *Pathol. Res. Pract.* **2018**, *214*, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.11.022>
84. Sun, G.; Zhang, S.; Xie, Y.; Zhang, Z.; Zhao, W. Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Lett.* **2016**, *11*, 150-158. [10.3892/ol.2015.3845](https://doi.org/10.3892/ol.2015.3845)
85. Liu, C.; Lin, J.J.; Yang, Z.Y.; Tsai, C.C.; Hsu, J.L.; Wu, Y.J. Proteomic study reveals a co-occurrence of gallic acid-induced apoptosis and glycolysis in B16F10 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 11672-11680. [10.1021/jf504035s](https://doi.org/10.1021/jf504035s)
86. Lo, C.; Lai, T.Y.; Yang, J.H.; Yang, J.S.; Ma, Y.S.; Weng, S.W.; Chen, Y.Y.; Lin, J.G.; Chung, J.G. Gallic acid induces apoptosis in A375.S2 human melanoma cells through caspase-dependent and -independent pathways. *Int. J. Oncol.* **2010**, *37*, 377-385. <https://doi.org/10.3892/ijco.00000686>
87. Badhani, B.; Sharma, N.; Kakkar, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Rsc Advances.* **2015**, *5*, 27540-27557. DOI: 10.1039/C5RA01911G
88. Fu, Y.; Ye, X.; Lee, M.; Rankin, G.; Chen, Y.C. Prodelphinidins isolated from Chinese bayberry leaves induces apoptosis via the p53-dependent signaling pathways in OVCAR-3 human ovarian cancer cells. *Oncol Lett.* **2017**, *13*, 3210-3218. [10.3892/ol.2017.5813](https://doi.org/10.3892/ol.2017.5813)
89. Fujii, W.; Toda, K.; Kawaguchi, K.; Kawahara, S.I.; Katoh, M.; Hattori, Y.; Fujii, H.; Makabe, H. Syntheses of prodelphinidin B3 and C2, and their antitumor activities through cell cycle arrest and caspase-3 activation. *Tetrahedron.* **2013**, *69*, 3543-3550. [doi.org/10.1016/j.tet.2013.02.087](https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.02.087)
90. Engelbrecht, A.M.; Mattheyse, M.; Ellis, B.; Loos, B.; Thomas, M.; Smith, R.; Peters, S.; Smith, C.; Myburgh, K. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. *Cancer Lett.* **2007**, *258*, 144-153. [10.1016/j.canlet.2007.08.020](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.08.020)
91. Kumar, R.; Deep, G.; Wempe, M.F.; Surek, J.; Kumar, A.; Agarwal, R.; Agarwal, C. Procyanidin B2 3, 3'-di-O-gallate induces oxidative stress-mediated cell death in prostate cancer cells via inhibiting MAP kinase phosphatase activity and activating ERK1/2 and AMPK. *Mol. Carcinog.* **2017**, *57*, 57-69. [10.1002/mc.22731](https://doi.org/10.1002/mc.22731)

92. Hsu, C.P.; Lin, Y.H.; Chou, C.C.; Zhou, S.P.; Hsu, Y.C.; Liu, C.L.; Ku, F.M.; Chung, Y.C. Mechanisms of grape seed procyanidin-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 283-289. <http://ar.iiarjournals.org/content/29/1/283.long>
93. Reis, J.; Gaspar, A.; Milhazes, N.; Borges, F. Chromone as a Privileged Scaffold in Drug Discovery: Recent Advances. *J Med Chem.* **2017**, *60*, 7941-7957. [10.1021/acs.jmedchem.6b01720](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01720)
94. Sharma, S.K.; Kumar, S.; Chand, K.; Kathuria, A.; Gupta, A.; Jain, R. An Update on Natural Occurrence and Biological Activity of Chromones. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3825-52. [10.2174/092986711803414359](https://doi.org/10.2174/092986711803414359).
95. Keri, R.S.; Budagumpi, S.; Pai, R.K.; Balakrishna, R.G. Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *6*, 340-374. [10.1016/j.ejmech.2014.03.047](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.047)
96. Meda, A.; Lamien, C.E.; Romito, M.; Millogo, J.; Nacoulma, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in *Burkina Fasan* honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.* **2005**, *91*, 571-577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>
97. Liberio, S.A.; Pereira, A.L.; Dutra, R.P.; Reis, A.S.; Araújo, M.J.; Mattar, N.S.; Silva, L.A.; Ribeiro, M.N.; Nascimento, F.R.; Guerra, R.N.; Monteiro-Neto, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *11*, 108. [10.1186/1472-6882-11-108](https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-108)
98. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
99. Gupta D.; Gupta, R.K. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: *in vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *13*. [10.1186/1472-6882-11-13](https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-13)
100. Campos, J.F.; dos Santos, U.P.; Rocha, P.S.; Damião, M.J.; Balestieri, J.B.P.; Cardoso, C.A.L.; Paredes-Gamero, E.J.; Estevinho, L.M.; Souza, K.P.; Santos, E.L. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, 296186. [10.1155/2015/296186](https://doi.org/10.1155/2015/296186)
101. Paredes-Gamero, E.J.; Martins, M.N.; Cappabianco, F.A.; Ide, J.S.; Miranda, A. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, *1820*, 1062-1072. [10.1016/j.bbagen.2012.02.015](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.02.015)
102. Moraes, V.W.R.; Caires, A.C.F.; Paredes-Gamero, E.J.; Rodrigues, T. Organopalladium compound 7b targets mitochondrial thiols and induces caspase-dependent apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Cell Death. Dis.* **2013**, *4*, e658. [10.1038/cddis.2013.190](https://doi.org/10.1038/cddis.2013.190)



© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 6. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados do presente estudo demonstram que o extrato aquoso da casca de *Stryphnodendron adstringens* (EASA) apresenta elevada concentração de compostos fenólicos (flavan-3-ols, ácido gálico, proantocianidinas e cromonas), o que possivelmente está relacionado às atividades antioxidantes e efeitos anticâncer observados contra as células de melanoma B16F10Nex-2. Além disso, o EASA promoveu morte celular por apoptose, via aumento dos níveis de ERO intracelular, disfunção do potencial de membrana mitocondrial e ativação da caspase-3 clivada. Resultados que abrem novas perspectivas de investigações destes efeitos contra outras linhagens de células tumorais, bem como em modelos de câncer *in vivo*.









Article

# Evaluation of In Vitro Antioxidant and Anticancer Properties of the Aqueous Extract from the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens*

Déborá da Silva Baldivia <sup>1</sup> , Daniel Ferreira Leite <sup>1</sup>, David Tsuyoshi Hiramatsu de Castro <sup>1</sup>, Jaqueline Ferreira Campos <sup>1</sup>, Uilson Pereira dos Santos <sup>1</sup>, Edgar Julian Paredes-Gamero <sup>2</sup> , Carlos Alexandre Carollo <sup>3</sup>, Denise Brentan Silva <sup>3</sup> , Kely de Picoli Souza <sup>1</sup> and Edson Lucas dos Santos <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Research Group on Biotechnology and Bioprospecting Applied to Metabolism (GEBBAM), Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados Itahum, Km 12, CEP: 79.804-970 Dourados, MS, Brazil; deborabaldivia@outlook.com.br (D.d.S.B.); leitefd2@gmail.com (D.F.L.); david\_hiramatsu@hotmail.com (D.T.H.d.C.); jcampos\_bio@yahoo.com.br (J.F.C.); uilsanto@hotmail.com (U.P.d.S.); kelypicoli@gmail.com (K.d.P.S.)

<sup>2</sup> Federal University of Mato Grosso do Sul, University city, s/n, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil; paredes.gamero@gmail.com

<sup>3</sup> Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry, Federal University of Mato Grosso do Sul, University City, s/n, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil; carloscarollo@gmail.com (C.A.C.); denise.brentan@ufms.br (D.B.S.)

\* Correspondence: edsonsantosphd@gmail.com; Tel.: +55-67-3410-2210

Received: 12 June 2018; Accepted: 8 August 2018; Published: 17 August 2018



**Abstract:** *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) is a tree species native to the Brazilian Cerrado commonly known as barbatimão. In traditional medicine, decoctions or infusions of the stem bark of this plant are used in the treatment of several diseases. The objective of this study was to analyze the chemical composition of *Stryphnodendron adstringens* aqueous extracts (SAAE) prepared from the stem bark to assess their antioxidant activity and anticancer effects as well as characterize cell death mechanisms against murine B16F10Nex-2 melanoma cells. From the SAAE, gallic acid, gallo catechin, epigallocatechin, dimeric and trimeric proanthocyanidins mainly composed of prodelfphinidin units and the isomeric chromones C-hexosyl- and O-pentosyl-5,7-dihydroxychromone were identified. The SAAE showed antioxidant activity through direct free-radical scavenging as well as through oxidative hemolysis and lipid peroxidation inhibition in human erythrocytes. Furthermore, SAAE promoted apoptosis-induced cell death in melanoma cells by increasing intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, inducing mitochondrial membrane potential dysfunction and activating caspase-3. Together, these data show the antioxidant and anticancer effects of *Stryphnodendron adstringens*. These results open new perspectives for studies against other tumor cell lines and in vivo models as well as for the identification and isolation of the chemical constituents responsible for these effects.

**Keywords:** Cerrado; medicinal plants; LC-DAD-MS; oxidative stress; ROS; melanoma; caspase-3; apoptosis

## 1. Introduction

Brazilian biodiversity has numerous plant species with bioactive compounds among their constituents with potential for the development of new drugs. Among them, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) is a tree species native to the Brazilian Cerrado, commonly

known as barbatimão or casca-da-mocidade. In traditional medicine, decoctions or infusions of the stem bark of this plant are used to treat prostate problems, liver and skin diseases, poor circulation, wounds, fungal infections, dental inflammation, gastritis and diabetes [1,2]. Some of these effects have already been scientifically shown, including their wound healing [3], anti-inflammatory [4,5], antifungal [6,7] activities. However, other biological properties may still be characterized.

Chemical studies show that the stem bark of *S. adstringens* has high concentrations of condensed tannins (proanthocyanidins) and flavan-3-ol monomers [8,9], which are described in the literature for their antioxidant activities and anticancer properties [10,11].

The search for medicinal plants with antioxidant properties has intensified in recent years [12–16]. Natural antioxidants are molecules that protect the organism from cellular damage resulting from excess free-radicals responsible for inducing oxidative stress [17].

Oxidative stress is characterized by the imbalance between the production of oxidizing substances and endogenous antioxidants, and it may cause the oxidation of biomolecules such as nucleic acids, proteins and lipids [13]. This biological condition is strongly related to the development of various diseases, including cancer [18].

Melanoma is the most aggressive skin cancer due to its high metastatic capacity. Melanoma cells originate in melanocytes, cells responsible for the production of melanin, which is the pigment that gives color to the skin [19]. Although melanoma is a multifactorial disease, excessive exposure to ultraviolet radiation is among the main risk factors [20]. Its worldwide incidence is increasing, with annual rates of approximately 132,000 new cases [21]. The chances of a cure are related to detection and surgical treatment in the early stages of the disease. In the more advanced stages, the five-year survival prognosis ranges from approximately 15 to 20% of cases [22]. Currently, no fully effective treatment against metastatic melanoma is available. However, different chemotherapeutic drugs are among the main melanoma treatment options [23,24].

Despite the benefits from the treatment of melanoma with pharmacological drugs, chemotherapeutic drug resistance and high toxicity are the main problems identified. Therefore, the identification of effective anticancer compounds and molecules with high target cell selectivity is of great pharmacological interest. Approximately 49% of Food and Drug Administration (FDA)-approved anticancer therapeutic agents are derived from natural products or their derivatives [25].

These chemotherapeutic agents of plant origin used in cancer treatment include vincristine, vinblastine, and Taxol [26]. Hence, the identification of compounds extracted from medicinal plants, combined with cancer treatment strategies, is crucial for developing effective therapies for melanoma.

Thus, the objectives of this study were to analyze the chemical composition of *S. adstringens* aqueous extracts prepared from stem bark and to assess their antioxidant activity, anticancer effects and in vitro cell death mechanisms against B16F10Nex-2 melanoma cells.

## 2. Results

### 2.1. Identification of the Constituents from the SAAE by LC-DAD-MS/MS

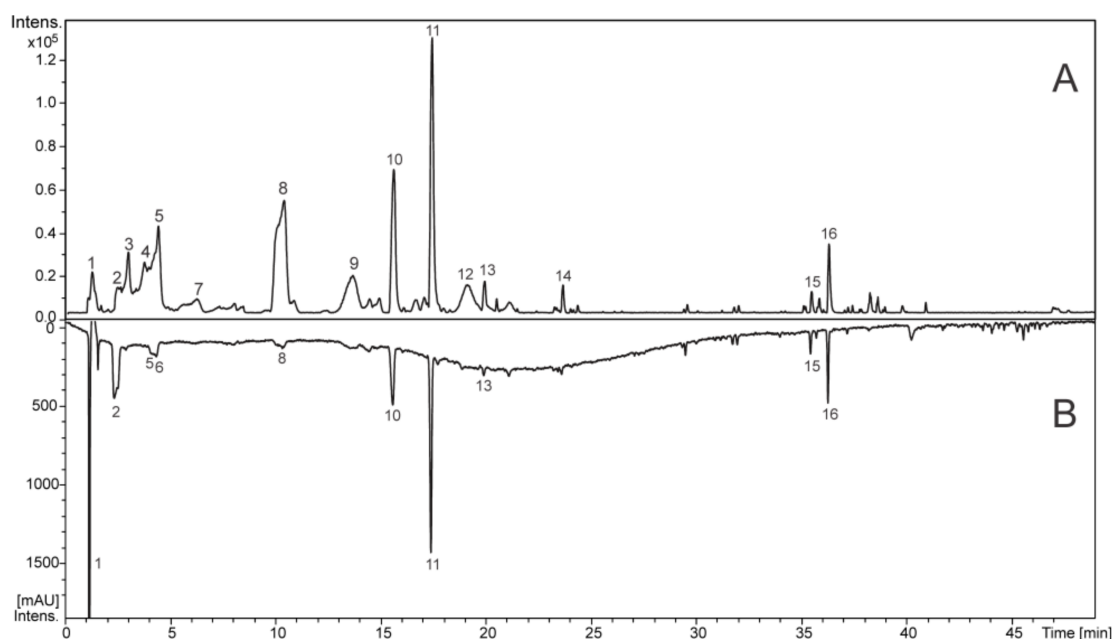
The chemical constituents from the *Stryphnodendron adstringens* aqueous extracts (SAAE) were identified based on UV, accurate MS and MS/MS data compared to spectral data reported in the literature, and some compounds could be confirmed by analyses of authentic standards. All identified compounds and spectral data are summarized on Table 1.

**Table 1.** Identification of the constituents from *S. adstringens* aqueous extract (SAAE) by LC-DAD-MS/MS.

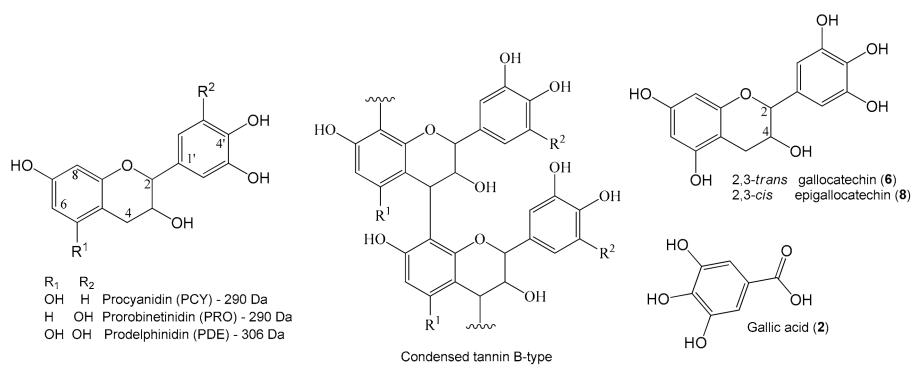
Peak	RT (min)	Compound	UV (nm)	MF	Negative Mode ( <i>m/z</i> )		Positive Mode ( <i>m/z</i> )	
					MS [M – H] <sup>–</sup> (*)	MS/MS	MS [M + H] <sup>+</sup> (*)	MS/MS
1	1.2	PDE-PDE (B type)	275	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1250 (2.5)	423, 305, 177	611.1411 (2.6)	287, 263, 179
		PDE-PDE-PDE (B type)		C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>21</sub>	913.1803 (3.3)	423, 305, 261, 243, 177	915.1955 (2.5)	-
		di-hexoside		C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	341.1093 (1.0)	-	365.1051 (0.9)	-
2	2.4	Gallic acid <sup>st</sup>	270	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	169.0140 (1.7)	-	171.0291 (1.9)	-
3	2.9	PDE-PDE (B type)	275	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1280 (4.9)	423, 305, 177, 165	611.1392 (0.6)	425, 299, 287, 275, 263, 179
4	3.6	PDE-PDE (B type)	276	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1254 (0.8)	423, 305, 177, 165	611.1395 (1.6)	425, 299, 287, 263, 179
5	4.2	PDE-PDE (B type)	275	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1259 (1.6)	423, 305, 177, 165	611.1400 (0.7)	425, 299, 287, 275, 263, 245, 179
6	4.3	Gallocatechin <sup>st</sup>	275	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	305.0673 (2.0)	179	307.0812 (3.2)	163, 159
7	6.1	PDE-PDE (B type)	275	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1245 (0.8)	-	611.1422 (4.3)	-
8	10.3	Epigallocatechin <sup>st</sup>	274	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	305.0673 (1.9)	167	307.0823 (3.4)	195, 177, 163, 159
9	13.5	PRO-PDE (B type)	280	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	593.1312 (1.9)	305, 177	595.1446 (0.1)	427
10	15.5	C-hexosyl <i>O</i> -pentosyl 5,7-dihydroxychromone	257, 285, 327 <sup>sh</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	485.1312 (2.4)	353, 335, 245, 233, 215, 205	487.1460 (2.9)	355, 337, 319, 289, 259, 235, 205
11	17.3	C-hexosyl <i>O</i> -pentosyl 5,7-dihydroxychromone	257, 295, 325 <sup>sh</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	485.1317 (3.3)	365, 353, 335, 263, 245, 263, 233, 215, 205	487.1452 (1.0)	319, 301, 283, 259, 235, 205
12	19.0	PCY-PDE (B type)	278	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	593.1308 (1.3)	305	595.1453 (1.1)	427, 307, 289
13	19.8	PDE-PDE benzoate (B type)	278	C <sub>37</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	729.1461 (3.5)	423, 305, 287, 261, 177	731.1611 (0.6)	425, 407, 299, 287, 275, 263
14	23.5	NI	280	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	535.1840 (3.6)	-	537.1981 (2.7)	-
15	35.4	NI	290, 330	C <sub>32</sub> H <sub>36</sub> O <sub>16</sub>	675.1946 (2.2)	245, 233, 215, 207	677.2088 (1.8)	235, 191, 163
16	36.2	NI	300	C <sub>33</sub> H <sub>38</sub> O <sub>17</sub>	705.2068 (4.5)	573, 467, 365, 335, 317, 245, 237, 233, 215	707.2193 (1.6)	325, 221, 191

\*: error in ppm; <sup>st</sup>: confirmed by authentic standard; <sup>sh</sup>: shoulder; MF: molecular formula; RT: retention time; NI: non identified; PDE: prodelpinidin, PRO: prorobinetidin; PCY: procyanidin.

The chromatographic peaks (Figure 1) 1–9 and 12–13 showed an intense band at  $\approx 280$  nm ( $\lambda_{\max}$ ) in the UV spectrum, which are assignable to gallic acid and flavan-3-ol units, including the proanthocyanidins (condensed tannins) (Figure 2). The compounds 2, 6 and 8 exhibited deprotonated ions at  $m/z$  169.0140, 305.0673 and 305.0673, respectively, which are compatible with the molecular formulas  $C_7H_6O_5$  and  $C_{15}H_{14}O_7$ , and these compounds were confirmed to be gallic acid, gallocatechin and epigallocatechin by the injection of standards. Their fragmentation profiles were compatible with published data [27], and they had already been reported from *S. adstringens* [8,28].



**Figure 1.** Total ion chromatogram in the negative ion mode (A) and chromatogram at wavelengths of 270–330 nm (B) of *S. adstringens* aqueous extract (SAAE).



**Figure 2.** Structures of flavan-3-ol monomers composed the proanthocyanidins from *S. adstringens* aqueous extract (SAAE), a typical condensed tannin B-type and some chemical compounds that were identified.

The metabolites 1, 3–5, 7, 9 and 12 exhibited ions at  $m/z$  609 and 593, which correspond to  $C_{30}H_{26}O_{14}$  and  $C_{30}H_{26}O_{13}$ , characterizing dimeric proanthocyanins. All of the metabolites showed fragment ions at  $m/z$  305 that are yielded from quinone methide reactions with losses of 304 and 288  $u$ , thus confirming prodelphinidin (PDE) and procyanidin (PCY)/prorobinetidin (PRO). The common losses by Retro Diels Alder (RDA) reactions of 168 and 152  $u$  suggest the presence of prodelphinidin/prorobinetidin and procyanidin, respectively. For example, the product ion  $m/z$

423 [M – H-168-H<sub>2</sub>O]<sup>−</sup> is observed for the metabolites **1**, **3–5** and **7**, the ion  $m/z$  423 [M – H-152-H<sub>2</sub>O]<sup>−</sup> is observed for **12** and the ion  $m/z$  425 [M-H-168]<sup>−</sup> of **9** suggested prodelphinidin (PDE), procyanidin (PCY) and prorobinetidin (PRO) units. Thus, the dimers PDE-PDE, PCY-PDE and PRO-PDE could be identified in the extract, and their spectral data are compatible with the published data [27]. In the same way, the trimer of prodelphinidin (**1**) and the hydroxy-benzoyl dimer of prodelphinidin, which already were isolated from *S. adstringens* [8], were identified.

Compounds **10** and **11** showed similar UV spectra with bands at wavelengths of approximately 257, 290 and 325 nm (shoulder), which are compatible with chromone compounds [29]. They presented accurate masses ( $m/z$  485.1312 and 485.1317 [M – H]<sup>−</sup>) that corresponded to the molecular formula C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub>. The fragmentation of ions at  $m/z$  485 yielded ions at  $m/z$  353 [M–H-132]<sup>−</sup>, suggesting an *O*-pentosyl substituent on the structure. In addition, the product ions  $m/z$  263 [M–H-90]<sup>−</sup>, 245 [M–H-90–H<sub>2</sub>O]<sup>−</sup>, 233 [M–H-120]<sup>−</sup> and 215 [M–H-120–H<sub>2</sub>O]<sup>−</sup> result from losses of C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> (120 *u*), C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (90 *u*) and water molecules (18 *u*). The losses of 120 and 90 *u* are produced from the fragmentation of the sugar ring and suggest a C-hexoside group. All of these losses were confirmed by the calculation of the accurate masses of product ions. Thus, substances **10** and **11** were putatively identified as C-hexosyl- and *O*-pentosyl-5,7-dihydroxychromone, and their spectral data are similar to their reported data [30,31].

## 2.2. Chemical Composition

The concentration of total phenols was 195.16 ± 0.94 mg GAE/g SAAE, and the concentration of flavonoids was 2.87 ± 0.08 mg QE/g SAAE.

## 2.3. Antioxidant Activity

### 2.3.1. ABTS and DPPH Free-Radical Scavenging

The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free-radicals as well as the maximum activity of the SAAE are outlined in Table 2. The SAAE had IC<sub>50</sub> results similar to those of the antioxidant control, ascorbic acid, in both assays. Conversely, the necessary concentrations of SAAE to reach the maximum free-radical inhibition were two and five times higher than those of ascorbic acid in the ABTS and DPPH assays, respectively.

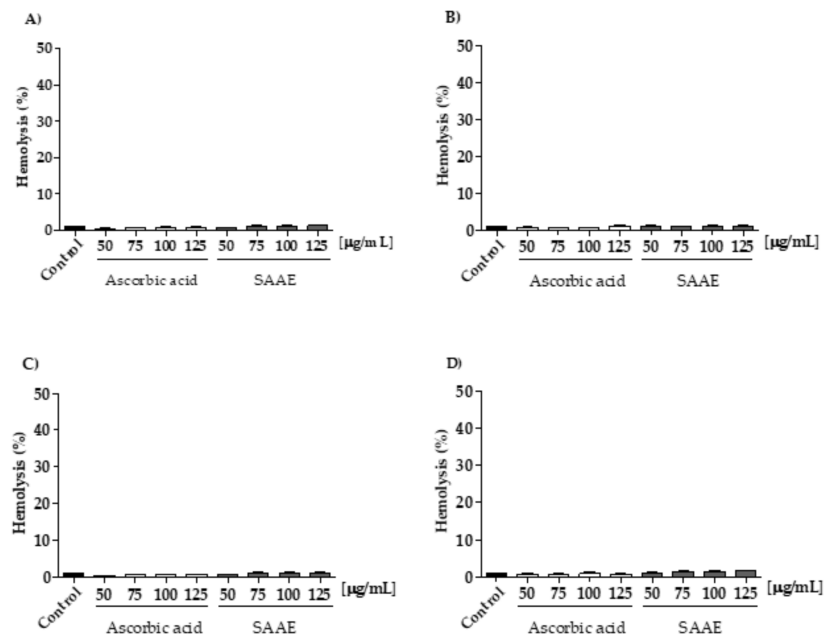
**Table 2.** IC<sub>50</sub> and maximum activity of the standard antioxidant and of *S. adstringens* aqueous extract (SAAE) in ABTS and DPPH free-radical scavenging.

Methods	Ascorbic Acid			SAAE		
	IC <sub>50</sub> µg/mL	Maximal %	Inhibition µg/mL	IC <sub>50</sub> µg/mL	Maximal %	Inhibition µg/mL
ABTS	1.34 ± 0.01	99.67 ± 0.04	5	1.83 ± 0.15	99.68 ± 0.08	10
DPPH	2.65 ± 0.03	87.44 ± 2.13	10	3.81 ± 0.02	89.92 ± 1.36	50

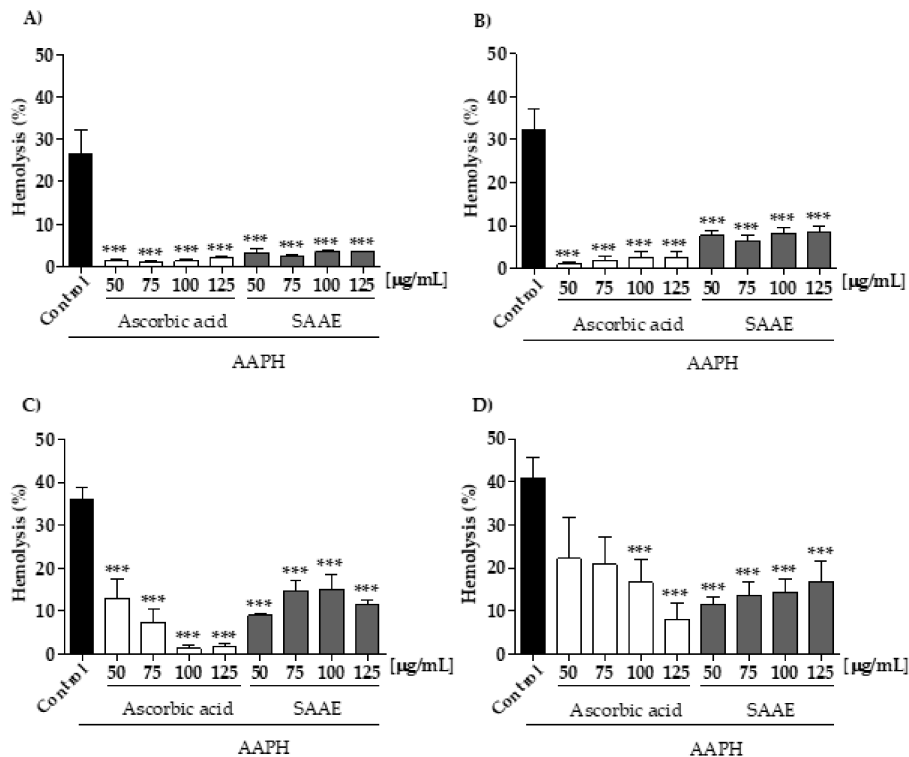
Results are expressed as the mean ± SEM (*n* = 3).

### 2.3.2. Protective Effect of the SAAE Against Oxidative Hemolysis

Throughout the experimental period, the SAAE showed no hemolytic activity in human erythrocytes at any time and concentration tested (Figure 3A–D). When in contact with the oxidizing agent 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), all of the SAAE concentrations tested were able to protect the erythrocytes against hemolysis during the 240 min incubation in a concentration- and time-dependent manner (Figure 4A–D). This result was better than that of the antioxidant control, ascorbic acid, which lost its anti-hemolytic activity at concentrations of 50 and 75 µg/mL after 240 min of incubation (Figure 4D).



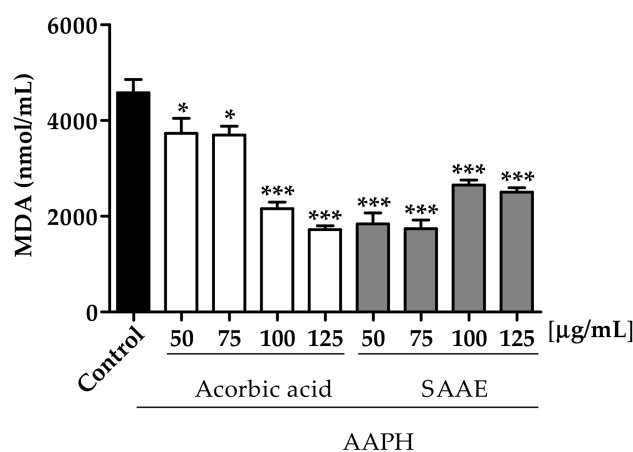
**Figure 3.** Assessment of hemolysis in human erythrocytes incubated for (A) 60, (B) 120, (C) 180 and (D) 240 min with different concentrations of ascorbic acid and the SAAE (50–125 µg/mL). Data are expressed as the mean ± SEM ( $n = 3$ ) in duplicates.



**Figure 4.** Assessment of hemolysis in human erythrocytes incubated for (A) 60, (B) 120, (C) 180 and (D) 240 min with the oxidizing agent AAPH with different concentrations of ascorbic acid and the SAAE (50–125 µg/mL). Data are expressed as the mean ± SEM ( $n = 3$ ) in duplicates. \*\*\*  $p < 0.0001$ , compared with the control group AAPH.

### 2.3.3. Malondialdehyde (MDA) Dosage

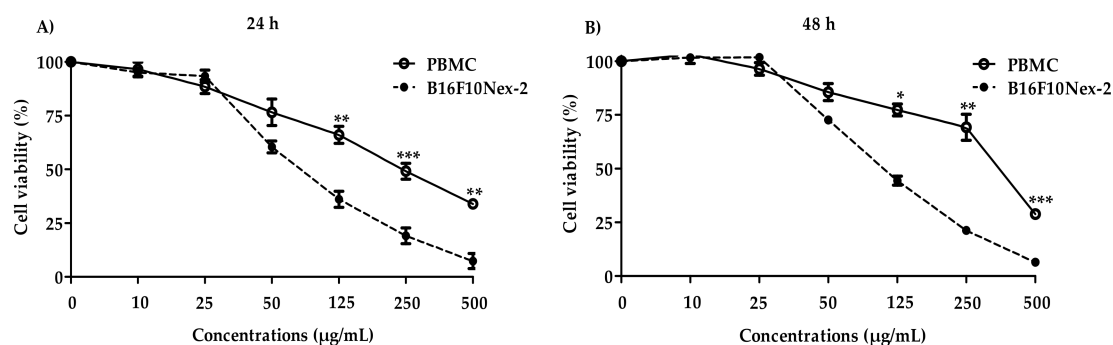
The ability of the SAAE to protect erythrocytes incubated with the oxidizing agent AAPH against lipid peroxidation was assessed by MDA quantification. All of the SAAE concentrations were able to reduce the MDA levels after 240 min of incubation. Erythrocyte treatment with the SAAE at concentrations of 50 and 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  reduced the MDA levels by 59.9% and 62.0%, respectively, compared with the control AAPH. These results were better than those assessed with the control ascorbic acid, which showed similar reductions (52.8% and 62.3%) only at concentrations of 100 and 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively (Figure 5). The higher doses SAAE were not so effective and a pro-oxidant effect probably occurs.



**Figure 5.** Malondialdehyde (MDA) concentration after adding the oxidizing agent AAPH to erythrocytes incubated for 240 min with different concentrations (50–125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of ascorbic acid and the SAAE. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) in duplicate. \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.0001$  compared with the control group AAPH.

### 2.4. Cytotoxic Activity and Cell Death Profile

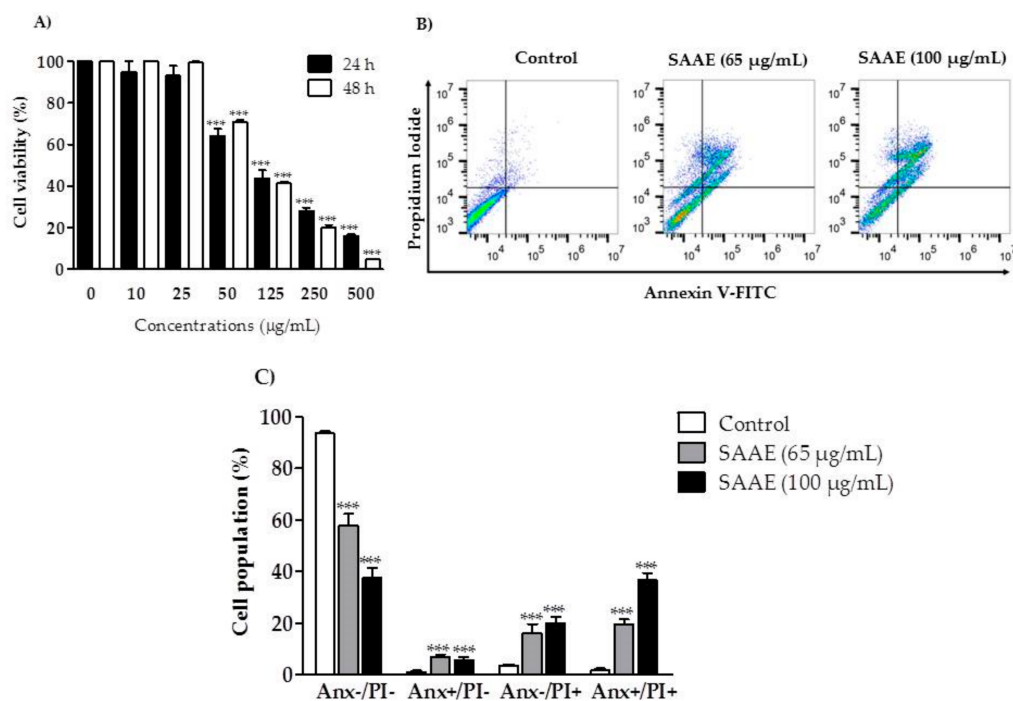
B16F10Nex-2 cells were treated with the SAAE for 24 and 48 h to assess its cytotoxicity. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were used as the control. Figure 6 shows that the extract had lower cytotoxicity against peripheral blood mononuclear cells ( $\text{IC}_{50} = 238.5 \pm 32.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $\text{IC}_{50} = 257.7 \pm 82.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) than against B16F10Nex-2 cells ( $\text{IC}_{50} = 65.0 \pm 1.6 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $\text{IC}_{50} = 65.0 \pm 5.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) in both treatment periods.



**Figure 6.** Viability curve in PBMC and B16F10Nex-2 cells. Cells were treated with different concentrations of the SAAE for (A) 24 h or (B) 48 h. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) in triplicates. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.0001$  compared with B16F10Nex-2 cells.



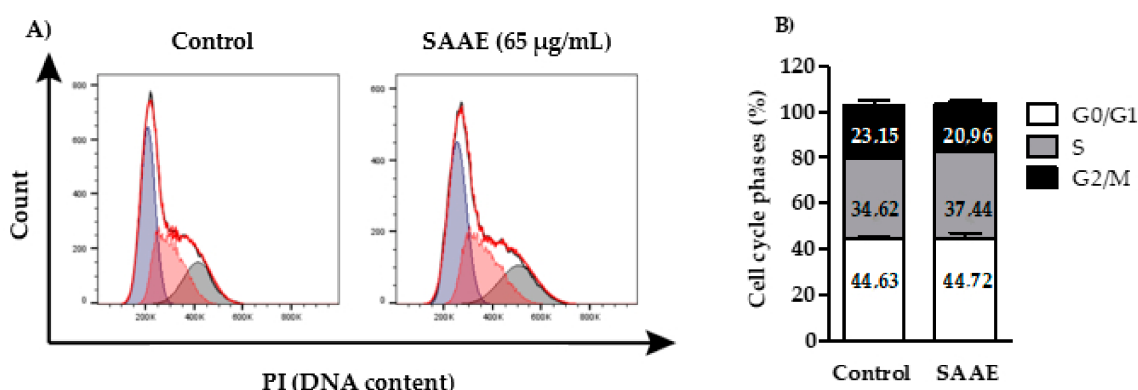
The SAAE showed concentration-dependent cytotoxic activity against B16F10Nex-2 cells (Figure 7A). After the 24 and 48 h treatments, the inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) observed was  $65 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Treatments with the SAAE at concentrations of 65 and  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  promoted double labeling (annexin  $V^+$ /PI $^+$ ), highlighting cell death by late apoptosis in approximately 19.6 and 36.7% of cells, respectively (Figure 7B,C).



**Figure 7.** Viability and cell death profiles of the B16F10Nex-2 melanoma cell line after treatment with different concentrations of the SAAE. (A) Cell viability versus concentration (10–500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) after 24 and 48 h of treatment. (B) Diagram of flow cytometry of cells stained with Annexin V–fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI) after a 24 h of treatment with the SAAE (65 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The lower left quadrant (Anx $^-$ /PI $^-$ ) represents viable cells, the lower right quadrant (Anx $^+$ /PI $^-$ ) represents apoptotic cells, the upper left quadrant (Anx $^-$ /PI $^+$ ) represents necrotic cells, and the upper right quadrant (Anx $^+$ /PI $^+$ ) represents late apoptotic cells. (C) Percentage of dead cells assessed in the diagram corresponding to concentrations of 65 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) in duplicates. \*\*\*  $p < 0.0001$ , compared with the untreated control group.

#### 2.4.1. Cell Cycle Phases

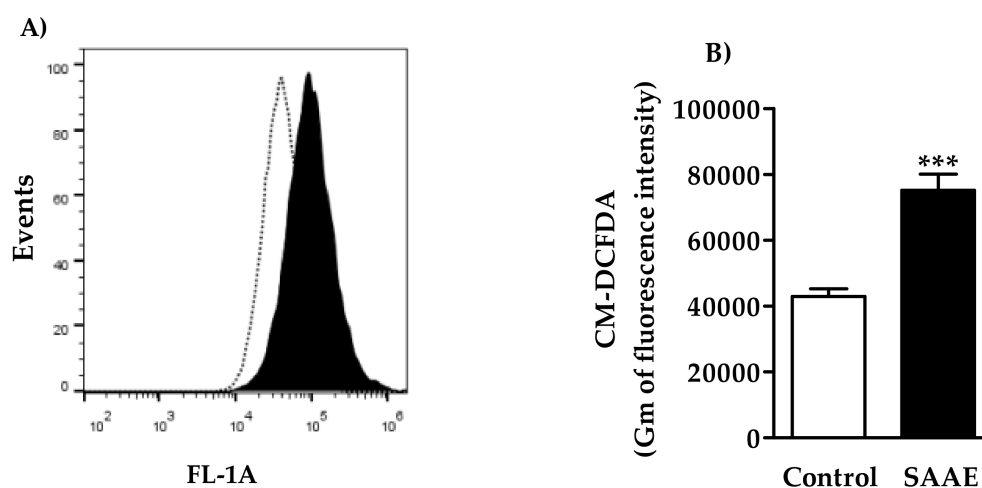
The histogram shows the distribution of the cell cycle phases of control (untreated) and treated (65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SAAE for 24 h) B16F10Nex-2 cells (Figure 8A). No significant differences were observed between cells from the control and SAAE treatment group, thus showing that treatment with the SAAE had no effect on the distribution of cell cycle phases of this cell line (Figure 8B)



**Figure 8.** (A) Histogram and (B) graphical representation of the percentages of cells in the G0/G1, S and G2/M phases after treatment with the SAAE (65 µg/mL) for 24 h. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) in duplicates.

#### 2.4.2. Reactive Oxygen Species (ROS) Levels

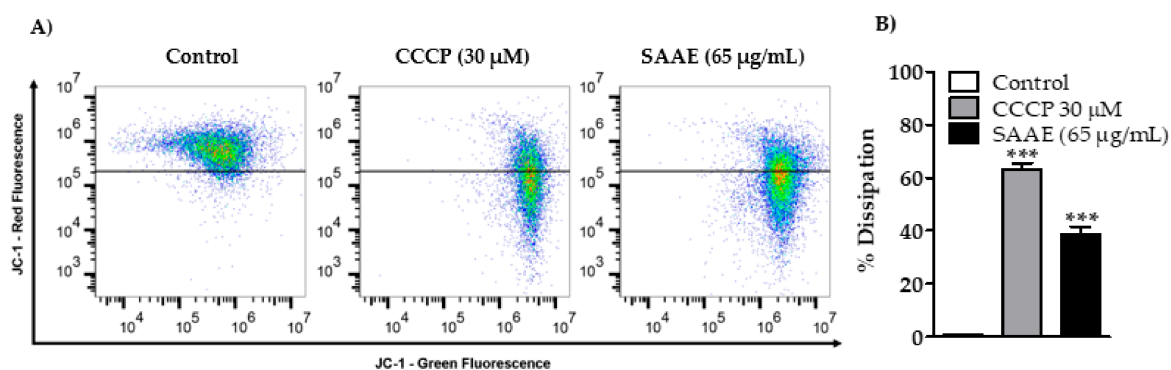
Cells treated with the SAAE (65 µg/mL) had increased ROS levels, as shown by the right-shifted fluorescence levels in the histogram (Figure 9A). The ROS levels increased by approximately 75% in B16F10Nex-2 cells treated with the SAAE in comparison to untreated cells (Figure 9B).



**Figure 9.** (A) Histogram and (B) graphical representation of the fluorescence intensity of ROS levels of B16F10Nex-2 cells treated with the SAAE (65 µg/mL). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) in duplicates. \*\*\*  $p < 0.0001$  compared with the untreated control group.

#### 2.4.3. Mitochondrial Membrane Potential

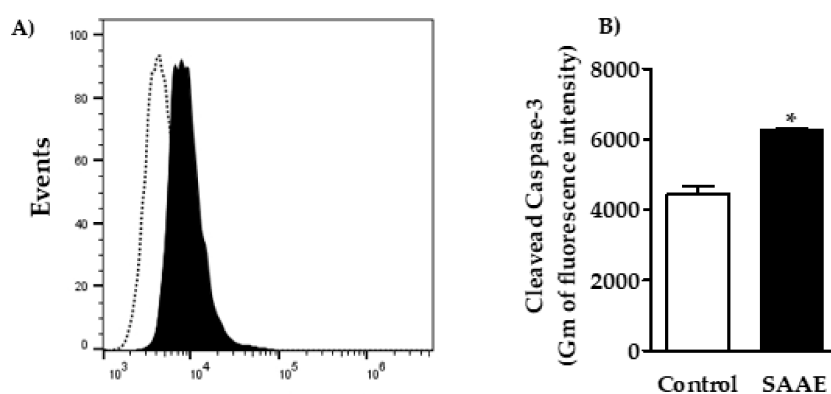
B16F10Nex-2 cells treated with the SAAE showed decreased mitochondrial membrane potential after 24 h of treatment (Figure 10A). The mitochondrial membrane potentials of cells treated with the positive control CCCP (30 µM) and the SAAE (65 µg/mL) decreased by  $63.1 \pm 2.4\%$  and  $38.7 \pm 2.9\%$ , respectively, in comparison with the untreated control cells (Figure 10B).



**Figure 10.** (A) Density Plot and (B) graphical representation of the percentages of mitochondrial membrane potential change in the control, CCCP-treated (30 μM) and SAAE-treated (65 μg/mL) B16F10Nex-2 melanoma cells. Data are expressed as the mean ± SEM ( $n = 3$ ) in duplicates. \*\*\*  $p < 0.0001$  compared with the untreated control group.

#### 2.4.4. Caspase-3 Activation

The assessment of the effects of the SAAE on caspase-3 in B16F10Nex-2 cells showed a right shift in the fluorescence levels in the histogram (Figure 11A), with an approximately 40% increase in the cleaved caspase-3 labeling intensity compared with untreated control cells (Figure 11B).



**Figure 11.** (A) Histogram and (B) graphical representation of caspase-3 activation in B16F10Nex-2 cells treated with the SAAE (65 μg/mL). Data are expressed as the mean ± SEM ( $n = 3$ ) in duplicates. \*  $p < 0.05$  compared with the untreated control group.

### 3. Discussion

Medicinal plants have been used for centuries by humanity in the prevention and treatment of various diseases. However, the chemical constituents and biological properties of a wide variety of endemic plants in poorly studied biomes remain unidentified and uncharacterized.

In this context, Brazil has been highlighted for its rich plant diversity with the potential for the development of new antioxidant and antitumor drugs, which are important for preventing oxidative stress-related diseases and different types of cancer [13].

*Stryphnodendron adstringens* is one of the species found in the Brazilian Cerrado that shows potential for the development of new drugs considering its chemical composition and biological activities previously described in the literature [3,5,6]. Previous phytochemical studies show that *S. adstringens* stem bark has proanthocyanidins [7,32], chalcones and triterpene compounds [4]. Those compounds are described for their antioxidant and anticancer activities [33–36].

In our study, gallic acid, gallocatechin, epigallocatechin, and dimeric as well as trimeric proanthocyanidins (condensed tannins), composed of mainly prodelphinidin along with procyanidin and prorobinetidin, were identified. These substances are commonly reported from *S. adstringens* [8,9]. However, chromone metabolites were only reported in the family Fabaceae [37]. Thus, the isomeric compounds C-hexosyl- and O-pentosyl-5,7-dihydroxychromone are newly discovered from the genus *Stryphnodendron*.

In recent years, natural antioxidants have gained importance for their prophylactic and therapeutic potential for many diseases as an effective tool in scavenging reactive species responsible for inducing oxidative stress [14,17,38]. The SAAE prepared from stem bark showed antioxidant activity by scavenging ABTS and DPPH free-radicals. This property is related to the concentration of phenolic compounds present in the SAAE, as these compounds are considered excellent natural antioxidants. These compounds are mainly described for their redox activity, acting as reducing agents, hydrogen donors and singlet oxygen scavengers [39], thereby preventing several diseases associated with oxidative stress [40]. Among the phenolic compounds identified in the SAAE, tannins are described as key antioxidant agents [41]. Furthermore, Luiz et al. [7] identified proanthocyanidins in *S. adstringens* stem bark, which are a class of polyphenols also known as condensed tannins. Dimeric procyanidins are the most active compounds of the proanthocyanidin class in scavenging free-radicals because they have a high molecular weight and a high degree of hydroxylation in the aromatic ring [41].

In addition to the direct effect on free-radical scavenging, the SAAE also protected human erythrocytes against damage caused by the antioxidant agent AAPH, resulting in oxidative hemolysis inhibition and reduced MDA levels. Antioxidant activity assessments in cellular models are highly important for studying the mechanisms of action of different compounds, including natural products. The antioxidant property observed in erythrocytes was not due to gene expression regulation because this cell model is anucleate, although it may occur through permeation of the compounds through the cellular membrane and interaction with endogenous antioxidant systems [42].

The ROS act as inducers of cell membrane lipid oxidation, a metabolic process that releases several by-products, such as malondialdehyde, which promotes DNA damage and may significantly contribute to cancer development [43].

The antioxidant capacity observed in erythrocytes may be related to the chemical compounds identified in the SAAE. Among the compounds identified, gallic acid is a well-described phenolic compound for its antioxidant and anti-hemolytic activities in human erythrocytes [14,44]. Procyanidins are also excellent antioxidants [45] capable of protecting erythrocytes from oxidative hemolysis and AAPH-induced lipid peroxidation [46,47]. Furthermore, flavonoids known as catechins are among the most abundant and important chemical constituents of green tea [48,49] and other plant species [13], and they are described as lipid peroxidation inhibitors [50].

Several studies have shown that extracts from natural products with high concentrations of phenolic compounds inhibit lipid peroxidation in human erythrocytes, thus decreasing the production of malondialdehyde [14,15] and showing cytotoxic effects on tumor cells [12,16,51].

The growing search for natural products with antioxidant properties and selective cytotoxic effects on tumor cells is among the strategies for discovering new anti-cancer drugs. Accordingly, this study aimed to investigate the cytotoxic activity of the SAAE against the B16F10Nex-2 melanoma line and to identify its mechanisms of action. The SAAE showed cytotoxic effects on melanoma cells, inducing cell death by apoptosis. Those effects may be attributed to the phenolic composition of the SAAE because these compounds have already been described for their cytotoxic effects on other tumor cell lines [52–54]. In vitro models are readily available and economically practical. In addition, they have been widely applied, including for studies related to discovery, therapeutic efficacy, and identification of molecular mechanism, optimizing the obtention of results. Despite the beneficial use of B16 lineage, melanoma cells isolated from human donors also are important to reveal the real clinical relevance of antitumor compounds [54].

Melanoma is among the cancers described for its chemoresistance to antitumor agents [55,56]. The search for derivatives of natural products has identified compounds with promising results in the treatment of this type of cancer. Among them, the chloroform fraction of *Anthelminticum centratherum* fruit seeds [57] and lectins extracted from *Polygonatum curtonema* rhizomes [58] showed cytotoxic effects via apoptosis in A375 melanoma cells resulting from increased ROS production, decreased mitochondrial membrane potential, cytochrome C release and caspase activation.

Apoptosis is a programmed cell death process essential for maintaining homeostasis; however, this is the mechanism of action of some antitumor drugs, such as doxorubicin [59], cisplatin [60] and vinblastine [61]. This mechanism is characterized by a series of biochemical and morphological changes, including an increase in ROS levels [62], caspase activation [63], cell shrinkage, chromatin condensation, DNA fragmentation and the formation of apoptotic bodies [64]. ROS are chemically reactive molecules produced in the mitochondria that present essential functions in cellular respiration, acting in the maintenance of homeostasis in normal cells. In tumor cells, the ROS production imbalance may be irreversible, making the cell vulnerable to increased oxidative stress by promoting cellular apoptosis [65]. Agents such as procarbazine [66] and various phytochemical compounds have shown cytotoxic effects in tumor cells by increasing the intracellular ROS production [57,58,67]. The increase in the ROS promotes mitochondrial dysfunction, resulting in the loss of the mitochondrial membrane potential [68]. In this study, the SAAE increased the production of ROS, which may have triggered the dysfunction in mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death observed in melanoma cells. Singh et al. [69] showed that proanthocyanidins extracted from cranberries have a cytotoxic effect on neuroblastoma cells by increasing ROS production and depolarizing the mitochondrial membrane potential. Furthermore, other extracts and natural compounds have already been described as promising in cancer treatment because they increase ROS and depolarize the mitochondrial membrane potential [70–73]. Excessive ROS production contributes to apoptotic cell death by releasing pro-apoptotic factors, including caspases [74]. The SAAE increased the caspase-3 activity, thus highlighting that the activation of this enzyme is directly involved in the apoptosis of B16F10Nex-2 melanoma cells.

Caspases are a family of proteases considered to be central regulators of apoptosis [75]. They act as a key apoptotic-signaling factor, triggered by the expression of proteins of the Bcl-2 family and by cytochrome C release from the internal mitochondrial membrane into the cytosol [76]. Caspases can be activated through two pathways, the extrinsic and intrinsic pathways [77]. The extrinsic pathway begins after extracellular signaling with death receptors [78], whereas the intrinsic pathway is initiated by intracellular stimuli that trigger mitochondrial membrane permeabilization, cytochrome C release into the cytosol, and subsequent caspase-9 activation, which activates caspase-3, the key enzyme for apoptosis [77,79,80].

Among the compounds identified, gallic acid shows cytotoxic effects against various tumor cell lines, including basal-like breast [81], non-small cell lung [82], oral squamous cell carcinoma [83] and hepatocellular cancer cell lines, showing no cytotoxic effects on normal cells [84]. In murine B16F10 melanoma cells, this compound is described for inducing apoptosis through the mitochondrial pathways by promoting the overexpression of the enzymes caspase-3, caspase-9 and PARP-1 as well as the pro-apoptotic proteins Bax and Bad; it also promotes the under-expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL [85]. In human melanoma cells (A375.S2), in addition to the involvement of caspases and pro- and anti-apoptotic proteins, an increase in ROS production and a decrease in mitochondrial membrane potential are observed [86]. However, Badhani et al. [87] show that the anticancer potential of gallic acid is not related to its antioxidant activity but instead to its pro-oxidant activity.

Prodelphinidins, whose subunits contain gallocatechin and epigallocatechin, inhibit cell proliferation and induce apoptosis in cancer cells by caspase-dependent extrinsic and intrinsic apoptotic pathways [88] as well as cell cycle arrest [89]. Procyanidins, the most abundant class of proanthocyanidins found in plants [88], show no cytotoxic effects on normal cells [90], although

they are able to inhibit cell proliferation and induce apoptotic death in cancer cells by increasing the ROS levels [91], decreasing the mitochondrial membrane potential and activating caspase-3 [92]. Chromones and their derivatives are heterocyclic compounds distributed throughout the plant kingdom [93] known for presenting various pharmacological activities, including antioxidant and anticancer activities, especially against multiple drug-resistant tumor cell lines [94,95].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Plant Material Collection

*Stryphnodendron adstringens* stem bark was collected at October 2014 and 2015 in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, at coordinates S 22°05'54.5, W 055°20'74.6, upon authorization from the SISBIO (Biodiversity Authorization and Information System), number 37931-3.

The plant material was identified by a botanist of the School of Biological and Environmental Sciences-FCBA in Federal University of Grande Dourados-UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), Brazil. A voucher was deposited in the DDMS Herbarium under record number 4815.

### 4.2. Aqueous Extract Preparation

Approximately 300 g of fresh bark was subjected to maceration in distilled water (2 L) for 48 h at room temperature. The macerate was filtered through Whatman No. 1 filter paper, frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and subsequently lyophilized to prepare the *Stryphnodendron adstringens* aqueous extract (SAAE). The dry extract yield was 2.3%, calculated using the following formula: extraction yield (%) =  $(W_{\text{DE}}/W_{\text{FB}}) \times 100$ , where  $W_{\text{DE}}$  is the dry extract weight (g) and  $W_{\text{FB}}$  is the fresh bark weight (g). The SAAE was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and protected from light.

### 4.3. Chemical Analysis

#### 4.3.1. Identification of Constituents by LC-DAD-MS

A chromatographic system UFLC Shimadzu Prominence coupled to a diode array detector (DAD) and a mass spectrometer was used to analyze and identify the compounds from SAAE extract. The mass spectrometer was a MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), composed by an electrospray ionization source and quadrupole time-of-flight analyzers. The MS analyses were performed on negative and positive ion mode. The applied chromatographic and mass spectrometric parameters were the same described by Nocchi et al. [27]. The SAAE extract was solubilized in methanol and ultrapure water (6:4, *v/v*) at 1 mg/mL, filtered (PTFE membrane, 0.22  $\mu\text{m}$ , Millex<sup>®</sup>, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) and 2  $\mu\text{L}$  was injected on the chromatographic column.

#### 4.3.2. Determination of Phenolic Compounds and Total Flavonoids

##### Phenolic Compounds

To determine the total phenolic content present in the SAAE, the Folin–Ciocalteu colorimetric method was performed [96]. Thus, 2.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent (1:10 *v/v*, diluted in distilled water) were added to 0.5 mL SAAE (at concentration 200  $\mu\text{g/mL}$ ). This solution was incubated in the dark for 5 min. Subsequently, 2.0 mL of 14% aqueous sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) were added and incubated at room temperature for 120 min and protected of light. The absorbance was measured at 760 nm using a T70 UV/Vis spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). To construct a calibration curve, gallic acid (0.04–200  $\mu\text{g/mL}$ ) was used as standard. The concentration of phenolic compounds present in SAAE was expressed in mg equivalent to gallic acid (GAE)/g of SAAE. The assay was performed in triplicate.

## Total Flavonoids

Total flavonoid content in SAAE was determined as described by Liberio et al. [97]. A methanolic solution of 2% aluminum chloride hexahydrate ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (4.5 mL) was added to 0.5 mL of SAAE (at concentration 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and this solution was kept in the dark for 30 min at room temperature. Subsequently, the absorbances were measured at 415 nm (T70 UV/Vis spectrometer, PG Instruments Limited, Leicestershire, UK) and the flavonoid quercetin (0.4–200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used to construct a calibration curve. The total flavonoid content was expressed in mg equivalent of quercetin (QE)/g extract. The assay was performed in triplicate.

### 4.4. Antioxidant Activity

The antioxidant activities were determined by different methods and the doses were defined by previously assays performed, as well as based on data reported from species of Cerrado Biome [12,14–16].

#### 4.4.1. ABTS<sup>•+</sup> Radical Discoloration Assay

The discoloration test of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) radical was performed as described by Re et al. [98]. The ABTS<sup>•+</sup> radical was prepared with 5 mL of ABTS<sup>•+</sup> aqueous solution (7 mM) and 88  $\mu\text{L}$  of potassium persulfate solution (140 mM). The solution was incubated for 12–16 h in dark at room temperature and then diluted in absolute ethanol (50 mL) to obtain an absorbance of 0.70 nm  $\pm$  0.05 units at 734 nm applying a T 70 UV/Vis spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). A volume of 20  $\mu\text{L}$  from SAAE solution (0.1–500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was mixed with 1980  $\mu\text{L}$  of the ABTS<sup>•+</sup> radical solution, incubated for 6 min (in the dark at room temperature) and the absorbances were measured at 734 nm. Ascorbic acid (AA) were used as a reference antioxidant and controls with the extract was performed for each concentration evaluated. Three independent assays were performed in triplicate. The percentage inhibition of the ABTS<sup>•+</sup> radical was calculated according to the following equation, where  $\text{Abs}_{\text{control}}$  is the absorbance of ABTS<sup>•+</sup> radical without the tested sample:

$$\text{Inhibition of the radical ABTS}^{\bullet+} (\%) = ((\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

#### 4.4.2. DPPH Free Radical Capture Activity

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical capture activity was evaluated as described by Gupta and Gupta [99]. For the assay, 0.2 mL of SAAE extract (0.1–500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added to 1,800  $\mu\text{L}$  of DPPH solution (0.11 mM, 80% ethanol) and maintained for 30 minutes at room temperature in the dark. Thereafter, the absorbances at 517 nm were measured by a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). Ascorbic acid (AA) were used as a reference antioxidant and the controls of the extract were also acquired for each concentration evaluated. Three independent experiments were performed in triplicate. The inhibition was determined according to the following equation, where  $\text{Abs}_{\text{control}}$  is the absorbance of the unsampled DPPH solution:

$$\text{Capture activity of DPPH} (\%) = (1 - \text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

#### 4.4.3. Antioxidant Assay in Human Erythrocytes

##### Erythrocyte Suspension Preparation

The experiments were approved by the Research Ethics Committee (Comitê de Ética em Pesquisa, CEP) of the Federal University of Grande Dourados, (UFGD, Brazil (CEP process number: 2.407.793)). The human erythrocytes were obtained from peripheral blood of healthy donors. The collected blood was added in tubes containing the anticoagulant sodium citrate and they were centrifuged ( $400 \times g$

for 10 min). Subsequently, the plasma was removed, and the erythrocytes were washed three times with 0.9% sodium chloride solution (NaCl). The erythrocytes were resuspended in 0.9% NaCl solution, obtaining a final concentration of 2.5%.

#### Hemolytic Activity and Oxidative Hemolysis Inhibition

The evaluations of hemolytic activity and lipid peroxidation were determined in human erythrocytes according to the method described by Campos et al. [100]. The erythrocytes were preincubated with SAAE or ascorbic acid (50–125 µg/mL) at 37 °C for 30 min. Afterwards, 0.5 mL of 0.9% NaCl was added to evaluate the hemolytic activity of treatments or 0.5 mL of the oxidizing agent, 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), at 50 mM was added to evaluate the protection against oxidative hemolysis. As control of basal hemolysis, erythrocytes were incubated with 0.9% NaCl, while the erythrocytes were incubated with distilled water for total hemolysis control. The treatments were maintained for 240 min at 37 °C under constant agitation and analyzed each 60 min. To evaluate the hemolysis, the respective tubes (each time) were centrifuged at 700× g for 5 min and the supernatants (0.2 mL) were separated, added to 1800 µL of 0.9% NaCl and measured at 540 nm using a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). The percentage of hemolysis was calculated by the formula below; where *A* is the absorbance of sample and *B* the absorbance of the total hemolysis. Three independent experiments were performed in duplicate.

$$\text{Hemolysis (\%)} = (A_{\text{sample}}/B_{\text{total hemolysis}}) \times 100$$

#### Malondialdehyde (MDA) Dosage

The ability of SAAE to protect against lipid peroxidation in human erythrocytes was determined by dosage of malondialdehyde (MDA) according to the methodology described by Campos et al. [100]. Erythrocytes were preincubated with SAAE or ascorbic acid (50–125 µg/mL) at 37 °C for 30 min. Then, 0.5 mL of the oxidizing solution AAPH (50 mM) was added in each treatment and incubated at 37 °C for 240 min with constant stirring. After 60, 120, 180 and 240 min, the tubes were centrifuged at 700× g for 5 min, and then 0.5 mL of supernatant was transferred into tubes containing 1 mL of 10 nM thiobarbituric acid (TBA) and incubated at 96 °C for 45 min. Soon after, the samples were cooled, added n-butyl alcohol (4 mL) and centrifuged at 1600× g for 5 min. The supernatant was measured at the wavelength 532 nm by a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). The control was prepared by the mixture of TBA (1 mL) and 20 mM MDA solution (0.5 mL). Two independent experiments were performed in duplicate. The MDA levels were expressed in nM/mL, according to the following formula:

$$\text{MDA (nmol/mL)} = \text{Abs}_{\text{sample}} \times \left( \frac{20 \times 220,32}{\text{Abs}_{\text{standardMDA}}} \right)$$

#### 4.5. Cell Cultures

Human peripheral blood from healthy donors was collected in tubes containing the anticoagulant sodium citrate. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was isolated by Ficoll Histopaque-1077 (1.077 g/cm<sup>3</sup>) (Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil) following the manufacturer's instructions, the blood was centrifuged at 400× g for 30 min separating mononuclear cells into easily differentiated interfaces. The use of human samples was approved by the local Ethical Committee of the Federal University of Grande Dourados (protocol number 2.407.793) and signing written informed consent by donors.

The B16F10 cell line was originally provided by the Ludwig Institute for Cancer Research (LICR), São Paulo, Brazil. B16F10Nex-2, a sub-line isolated at the Department of Experimental Oncology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), has the same characteristics as the original tumor cell line with moderate in vivo aggressiveness. Human peripheral blood mononuclear B16F10Nex-2 cells were



grown in RPMI 1640 media (Gibco/Invitrogen, Minneapolis, MN, USA) supplemented with 10 nM 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), 24 nM sodium bicarbonate and 10% fetal bovine serum (FBS), all from Gibco/Invitrogen, as well as with 40 mg/mL gentamicin (Hipolabor Farmacêutica, Sabará, Minas Gerais, MG, Brazil). All cells were kept in an incubator with a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

#### 4.5.1. MTT Cell Viability Assay

Cell viability was assessed based on the colorimetric assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). PBMC ( $12 \times 10^4$  cells/mL) and B16F10Nex-2 ( $5 \times 10^3$  cells/mL) cells were plated in 96-well microtiter plates with different concentrations of the SAAE (0–500 µg/mL in RPMI 1640) for 24 and 48 h. After the treatments, the media were discarded, and 100 µL of MTT (0.5 mg/mL) was subsequently added to each well, followed by incubation for 4 h at 37 °C. After this period, the supernatant was discarded, and 100 µL of solvent (10% SDS, 0.01 M HCl and Milli-Q water) was subsequently added to solubilize the formazan crystals. The absorbance of each well was read at 630 nm using the SpectraMax 250 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The cell viability was calculated using the following formula:

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{Abs}_{\text{treated cells}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

#### 4.5.2. Cell Death Profile

The cell death profile was evaluated according to the methods described by Paredes-Gamero et al. [101], with minor modifications. B16F10Nex-2 cells were grown on 48-well cell culture plates ( $1 \times 10^4$  cells/mL) in RPMI medium containing 10% FBS for 24 h. After this period the cells were stimulated with IC50 of SAAE (65 µg/mL) and 100 µg/mL. Then, the cells were retired and washed with PBS. Afterward, the cells were resuspended in annexin labeling buffer (0.14 M NaCl, 0.01 M HEPES, and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4). The cells were labeled with annexin V-FITC and Propidium iodide (PI) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions for 15 min at room temperature. A total of 10,000 events were acquired per sample through analysis in an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson). The analysis was performed using FlowJo v10.2 LCC software (Ashland, OR, USA).

#### 4.5.3. Cell Cycle Phases

The cell cycle was profiled according to the method described by Paredes-Gamero et al. [101]. B16F10Nex-2 cells were plated in 24-well microtiter plates ( $6 \times 10^4$  cells/mL) and grown in RPMI 1640 media supplemented with 10% FBS with or without SAAE (65 µg/mL) for 24 h at 37 °C. After this period, the cells were fixed, permeabilized as previously described and incubated with 4 mg/mL RNase (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C. To label cellular DNA, the cells were incubated with 5 µg/mL SytoxGreen (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). The percentage of cells in each cell cycle phase (G0/G1, S and G2/M) was determined by flow cytometry, in an Accuri™ C6 cytometer (Becton Dickinson). A total of 20,000 events were acquired per sample. The analysis was performed using FlowJo v10.2 LCC software.

#### 4.5.4. Assessment of Reactive Oxygen Species (ROS) Levels

Intracellular ROS levels were assessed by flow cytometry using the dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) (Molecular Probe-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). B16F10Nex-2 cells were plated in 24-well microtiter plates ( $6 \times 10^4$  cells/mL) were treated with SAAE (65 µg/mL) for 24 h at 37 °C. Subsequently, the cells were trypsinized and incubated with 10 µM H<sub>2</sub>DCFDA for 30 min at room temperature and protected from light. The fluorescence of the ROS was assessed in an Accuri™ C6 flow cytometer (Becton Dickinson,

San Jose, CA, USA). A total of 10,000 events were acquired per sample. The analysis was performed using FlowJo v10.2 LCC software.

#### 4.5.5. Assessment of the Mitochondrial Membrane Potential

To assess the possible effect of the SAAE on the mitochondrial membrane potential, B16F10Nex-2 cells were incubated with the fluorescent dye JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the method described by Moraes et al. [102]. The JC-1 probe accumulates in mitochondria depending on the potential. Viable cells have a high mitochondrial membrane potential and are labeled in red. When the mitochondrial membrane potential decreases, cells are labeled in green. In this assay, cells were plated in 24-well microtiter plates ( $6 \times 10^4$  cells/mL) containing RPMI media supplemented with 10% FBS and treated with the positive control carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP, 30  $\mu$ M) or with SAAE (65  $\mu$ g/mL) for 24 h at 37 °C. After this period, the cells were trypsinized, centrifuged and incubated with JC-1 (1  $\mu$ g/mL) for 15 min at room temperature. The fluorescence was analyzed in an Accuri™ C6 flow cytometer (Becton Dickinson). A total of 10,000 events were acquired per sample. The analysis was performed using FlowJo v10.2 LCC software.

#### 4.5.6. Caspase-3 Activity

Caspase-3 activation was assessed by flow cytometry according to the method described by Moraes et al. [102], with small modifications. B16F10Nex-2 cells were plated in 24-well plates ( $6 \times 10^4$  cells/mL) containing RPMI media supplemented with 10% FBS and treated with SAAE (65  $\mu$ g/mL) for 24 h at 37 °C. Then, cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min and permeabilized in 0.01% saponin for 20 min at room temperature. Subsequently, the cells were incubated with the antibody conjugated to the cleaved caspase-3 fluorophore (Asp175), Alexa Fluor 488, at room temperature and protected from light. After incubation, the fluorescence was analyzed in an Accuri™ C6 flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A total of 10,000 events were acquired per sample. The analysis was performed using FlowJo v10.2 LCC software.

#### 4.6. Statistical Analysis

Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Significant differences between groups were determined using the Student's *t*-test for comparison between two groups and analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for comparison of two or more groups using the GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA). The results were considered significant when  $p < 0.05$ .

### 5. Conclusions

In conclusion, the results from the present study show that the SAAE from stem bark had a high concentration of phenolic compounds (flavan-3-ols, gallic acid, proanthocyanidins and chromones), which may be related to its antioxidant activities and anticancer effects on B16F10Nex-2 melanoma cells. Furthermore, the SAAE promoted cell death by apoptosis by increasing the intracellular ROS levels, mitochondrial membrane potential dysfunction and cleaved caspase-3 activation. These results open new perspectives for studies on these effects on other tumor cell lines and in vivo cancer models.

**Author Contributions:** D.d.S.B., D.F.L., D.T.H.d.C., J.F.C., U.P.d.S., E.J.P.-G., C.A.C., D.B.S., K.d.P.S. and E.L.d.S. conceived and designed the experiments; D.d.S.B., D.F.L., D.T.H.d.C., J.F.C., U.P.d.S., E.J.P.-G., C.A.C., D.B.S., K.d.P.S. and E.L.d.S. performed the experiments; D.d.S.B., D.F.L., D.T.H.d.C., J.F.C., U.P.f.S., E.J.P.-G., C.A.C., D.B.S., K.d.P.S. and E.L.d.S. analyzed the data; E.J.P.G., C.A.C., D.B.S., K.d.P.S. and E.L.d.S. contributed reagents/materials/analysis tools; D.d.S.B., D.T.H.d.C., J.F.C., C.A.C., D.B.S., K.d.P.S. and E.L.d.S. wrote the paper. All authors have read and approved the final manuscript.

**Acknowledgments:** This work was supported by grants from Foundation to Support to Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil),

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest

## Abbreviations

AAPH	2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
CCCCP	Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona
CM-H2DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallic acid equivalente
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid
LICR	Ludwig Institute for Cancer Research
MDA	Malondialdehyde
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	Sodium chloride
PBMC	Human peripheral blood mononuclear cells
PI	Propidium iodide
QE	Quercetin equivalents
ROS	Reactive oxygen species
SAAE	<i>Stryphnodendron adstringens</i> aqueous extract
SEM	Standard error of the mean
TBA	Thiobarbituric acid

## References

- Santana, B.F.; Voeks, R.A.; Funch, L.S. Ethnomedicinal survey of a maroon community in Brazil's Atlantic tropical forest. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *181*, 37–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Albuquerque, U.P.; Monteiro, J.M.; Ramos, M.A.; de Amorim, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 76–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hernandes, L.; Pereira, L.M.D.S.; Palazzo, F.; Mello, J.C.P.D. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, *46*, 431–436. [[CrossRef](#)]
- Lima, J.C.S.; Martins, D.T.O.; de Souza, P.T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother Res.* **1998**, *12*, 218–220. [[CrossRef](#)]
- Henriques, B.O.; Corrêa, O.; Azevedo, E.P.C.; Pádua, R.M.; de Oliveira, V.L.; Oliveira, T.H.C.; Boff, D.; Dias, A.C.F.; de Souza, D.G.; Amaral, F.A.; et al. In vitro TNF-inhibitory activity of brazilian plants and anti-inflammatory effect of *Stryphnodendron adstringens* in an acute arthritis model. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2016**, *2016*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Morey, A.T.; Souza, F.C.; Santos, J.P.; Pereira, C.A.; Cardoso, J.D.; de Almeida, R.S.; Costa, M.A.; Mello, J.C.; Nakamura, C.V.; Pinge-Filho, P.; et al. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on candida tropicalis growth and adhesion properties. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17*, 365–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Luiz, R.L.; Vila, T.V.; Mello, J.C.; Nakamura, C.V.; Rozental, S.; Ishida, K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *BMC Complement. Altern. Med.* **2015**, *15*, 68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mello, J.P.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 857–862. [[CrossRef](#)]
- Mello, J.C.P.; Petereit, F.; Nahrstedt, A.A. Dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 1105–1107.
- Padumadasa, C.; Dharmadana, D.; Abeysekera, A.; Thammitiyagodage, M. In vitro antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of ethyl acetate soluble proanthocyanidins of the inflorescence of *Cocos nucifera* L. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Meng, X.H.; Liu, C.; Fan, R.; Zhu, L.F.; Yang, S.X.; Zhu, H.T.; Wang, D.; Yang, C.R.; Zhang, Y.J. Antioxidative Flavan-3-ol Dimers from the Leaves of *Camellia fangchengensis*. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 247–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Casagrande, J.C.; Macorini, L.F.B.; Antunes, K.A.; dos Santos, U.P.; Campos, J.F.; Dias-Júnior, N.M.; Sangalli, A.; Cardoso, C.A.L.; Vieira, M.D.C.; Rabelo, L.A.; et al. Antioxidant and cytotoxic activity of hydroethanolic extract from *Jacaranda decurrens* leaves. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Campos, J.F.; Castro, D.T.H.; Damião, M.J.; Torquato, H.F.V.; Paredes-Gamero, E.J.; Carollo, C.A.; Estevinho, L.M.; Souza, K.P.; Santos, E.L. The chemical profile of *Senna velutina* leaves and their antioxidant and cytotoxic effects. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, *2016*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Espindola, P.T.; Rocha, P.S.; Carollo, C.A.; Schmitz, W.O.; Pereira, Z.V.; Vieira, M.C.; Santos, E.L.; Souza, K.P. Antioxidant and antihyperlipidemic effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg root. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, *2016*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lopes, R.H.; Macorini, L.F.; Antunes, K.Á.; Espindola, P.T.; Alfredo, T.M.; da Rocha, P.S.; Pereira, Z.V.; Santos, E.L.; Souza, K.P. Antioxidant and hypolipidemic activity of the hydroethanolic extract of *Curatella americana* l. leaves. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, *2016*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Santos, U.P.; Campos, J.F.; Torquato, H.F.; Paredes-Gamero, E.J.; Carollo, C.A.; Estevinho, L.M.; Souza, K.P.; Santos, E.L. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0167531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ratnam, D.V.; Ankola, D.D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D.K.; Kumar, M.N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control. Release.* **2006**, *113*, 189–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Acharya, A.; Das, I.; Chandhok, D.; Saha, T. Redox regulation in cancer: A double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2010**, *3*, 23–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Dror, S.; Sander, L.; Schwartz, H.; Sheinboim, D.; Barzilai, A.; Dishon, Y.; Apcher, S.; Golan, T.; Greenberger, S.; Barshack, I.; et al. Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 1006–1017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gorantla, V.C.; Kirkwood, J.M. State of melanoma: An historic overview of a field in transition. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2014**, *28*, 415–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. World Health Organization (WHO). Ultraviolet Radiation and the Intersun Programme. Skin Cancers. Available online: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html> (accessed on 15 July 2016).
22. American Cancer Society (ACS). Melanoma Skin Cancer Detailed Guide. Available online: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates-for-melanoma-skin-cancer-by-stage.html> (accessed on 31 July 2017).
23. Marelli, M.M.; Marzagalli, M.; Moretti, R.M.; Beretta, G.; Casati, L.; Comitato, R.; Gravina, G.L.; Festuccia, C.; Limonta, P. Vitamin E  $\delta$ -tocotrienol triggers endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in human melanoma cells. *Sci Rep.* **2016**, *6*, 30502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mattia, G.; Puglisi, R.; Ascione, B.; Malorni, W.; Carè, A.; Matarrese, P. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death. Dis.* **2018**, *9*, 112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Cragg, G.M.; Newman, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3670–3695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Nocchi, S.R.; Companhoni, M.V.; de Mello, J.C.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, C.V.; Carollo, C.A.; Silva, D.B.; Ueda-Nakamura, T. Antiviral Activity of Crude Hydroethanolic Extract from *Schinus terebinthifolia* against Herpes simplex Virus Type 1. *Planta Med.* **2017**, *83*, 509–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Isler, A.C.; Lopes, G.C.; Cardoso, M.L.C.; Mello, J.C.P. Development and validation of a LC-method for the determination of phenols in a pharmaceutical formulation containing extracts from *Stryphnodendron adstringens*. *Quím. Nova* **2010**, *33*, 1126–1129. [[CrossRef](#)]
29. Robeson, D.J.; Ingham, J.L.; Harborne, J.B. Identification of two chromone phytoalexins in the sweet pea, *Lathyrus odoratus*. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2171–2173. [[CrossRef](#)]
30. Yang, S.J.; Ryu, J.H.; Jang, D.S.; Yang, L.; Han, H.K. A sensitive LC–MS/MS method for the quantitative determination of biflorin in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *115*, 272–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Zou, L.; Li, X.; Shi, Q.; Feng, F. An effective integrated method for comprehensive identification of eighty-five compounds in Zhi-Zi-Da-Huang decoction by HPLC-DAD-ESI-MS (TOF) and HPLC-DAD-ESI-MS/MS (QqQ) without the help of reference standards. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 4312–4327. [[CrossRef](#)]
32. Pinto, S.C.; Bueno, F.G.; Panizzon, G.P.; Morais, G.; dos Santos, P.V.; Baesso, M.L.; Leite-Mello, E.V.; de Mello, J.C. *Stryphnodendron adstringens*: Clarifying wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med.* **2015**, *81*, 1090–1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chen, X.; Liu, Z.; Meng, R.; Shi, C.; Guo, N. Antioxidative and anticancer properties of Licochalcone A from licorice. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *198*, 331–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Allouche, Y.; Warleta, F.; Campos, M.; Sánchez-Quesada, C.; Uceda, M.; Beltrán, G.; Gaforio, J.J. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *59*, 121–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Orlikova, B.; Tasdemir, D.; Golais, F.; Dicato, M.; Diederich, M. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes Nutr.* **2011**, *6*, 125–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mendoza-Wilson, A.M.; Castro-Arredondo, S.I.; Espinosa-Plascencia, A.; Robles-Burgueño, M.R.; Balandrán-Quintana, R.R.; Bermúdez-Almada, M.C. Chemical composition and antioxidant-prooxidant potential of a polyphenolic extract and a proanthocyanidin-rich fraction of apple skin. *Heliyon* **2016**, *2*, e00073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Amoussa, A.M.; Bourjot, M.; Lagnika, L.; Vonthron-Sénécheau, C.; Sanni, A. Acthaside: A new chromone derivative from *Acacia ataxacantha* and its biological activities. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Santos, H.F.D.; Campos, J.F.; Santos, C.M.D.; Balestieri, J.B.P.; Silva, D.B.; Carollo, C.A.; Souza, K.P.; Estevinho, L.M.; Santos, E.L. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3954–3962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Macáková, K.; Kolečkář, V.; Cahlíková, L.; Chlebek, J.; Hošťálková, A.; Kuča, K.; Jun, D.; Opletal, L. Chapter 6: Tannins and their Influence on Health. In *Recent Advances in Medicinal Chemistry*, 1st ed.; Choudhary, M.I., Perry, G., Rahman, A., Eds.; Elsevier, Bentham Science Publishers: San Antonio, TX, USA, 2014; Volume 1, pp. 159–208.
42. López-Alarcón, C.; Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *763*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2014**, *2014*, 360438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Suwalsky, M.; Colina, J.; Gallardo, M.J.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K.; Manrique-Moreno, M.; Sepúlveda, B. Antioxidant capacity of gallic acid *in vitro* assayed on human erythrocytes. *J. Membr. Biol.* **2016**, *249*, 769–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Li, W.; Liu, J.; Guan, R.; Chen, J.; Yang, D.; Zhao, Z.; Wang, D. Chemical characterization of procyanidins from *Spatholobus suberectus* and their antioxidative and anticancer activities. *J. Funct. Foods.* **2015**, *12*, 468–477. [[CrossRef](#)]
46. Zhu, Q.Y.; Schramm, D.D.; Gross, H.B.; Holt, R.R.; Kim, S.H.; Yamaguchi, T.; Kwik-Urbe, C.L.; Keen, C.L. Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free-radical-induced human erythrocyte hemolysis. *Clin. Dev. Immunol.* **2005**, *12*, 27–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Arwa, P.S.; Zeraik, M.L.; Ximenes, V.F.; da Fonseca, L.M.; Bolzani, V.S.; Siqueira Silva, D.H.S. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *174*, 410–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Majchrzak, D.; Mitter, S.; Elmadfa, I. The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas. *Food Chem.* **2004**, *88*, 447–451. [[CrossRef](#)]

49. Macedo, J.A.; Battestin, V.; Ribeiro, M.L.; Macedo, G.A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chem.* **2011**, *126*, 491–497. [[CrossRef](#)]
50. Chen, L.; Yang, X.; Jiao, H.; Zhao, B. Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicol. Sci.* **2002**, *69*, 149–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Campos, J.F.; Santos, U.P.; Macorini, L.F.B.; Melo, A.M.M.F.; Balestieri, J.B.P.; Paredes-Gamero, E.J.; Cardoso, C.A.L.; Souza, K.P.; Santos, E.L.D. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *65*, 374–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gong, Y.; Fang, F.; Zhang, X.; Liu, B.; Luo, H.; Li, Z.; Zhang, X.; Zhang, Z.; Pang, X. B Type and complex A/B Type epicatechin trimers isolated from Litchi pericarp aqueous extract show high antioxidant and anticancer activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ravi Shankara, B.E.; Ramachandra, Y.L.; Rajan, S.S.; Ganapathy, P.S.; Yarla, N.S.; Richard, S.A.; Dhananjaya, B.L. Evaluating the anticancer potential of ethanolic gall extract of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). *Pharmacognosy Res.* **2016**, *8*, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kuete, V.; Mbaveng, A.T.; Nono, E.C.; Simo, C.C.; Zeino, M.; Nkengfack, A.E.; Efferth, T. Cytotoxicity of seven naturally occurring phenolic compounds towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 856–863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Brys, A.K.; Gowda, R.; Loriaux, D.B.; Robertson, G.P.; Mosca, P.J. Nanotechnology-based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 565–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Soengas, M.S.; Lowe, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 3138–3151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Looi, C.Y.; Moharram, B.; Paydar, M.; Wong, Y.L.; Leong, K.H.; Mohamad, K.; Arya, A.; Wong, W.F.; Mustafa, M.R. Induction of apoptosis in melanoma A375 cells by a chloroform fraction of *Centratherrum anthelminticum* (L.) seeds involves NF-kappaB, p53 and Bcl-2-controlled mitochondrial signaling pathways. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Liu, B.; Cheng, Y.; Zhang, B.; Bian, H.J.; Bao, J.K. *Polygonatum cyrtonema* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS–p38–p53 pathway. *Cancer Lett.* **2009**, *275*, 54–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wang, S.; Konorev, E.A.; Kotamraju, S.; Joseph, J.; Kalivendi, S.; Kalyanaraman, B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms intermediacy of H2O2-and p53-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25535–25543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Florea, A.M.; Büsselberg, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* **2011**, *3*, 1351–1371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Selimovic, D.; Badura, H.E.; El-Khattouti, A.; Soell, M.; Porzig, B.B.; Spernger, A.; Ghanjati, F.; Santourlidis, S.; Haikel, Y.; Hassan, M. Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by Ras homologous A protein (Rho A) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms. *Apoptosis* **2013**, *18*, 980–997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Simon, H.U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Schaffer, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **2000**, *5*, 415–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kaufmann, S.H.; Lee, S.H.; Meng, X.W.; Loegering, D.A.; Kottke, T.J.; Henzing, A.J.; Earnshaw, W.C.; Ruchaud, S.; Samejima, K.; Earnshaw, W.C. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods* **2008**, *44*, 262–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bortner, C.D.; Cidlowski, J.A. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death. Differ.* **2002**, *9*, 1307–1310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chakraborty, B.; Dutta, D.; Mukherjee, S.; Das, S.; Maiti, N.C.; Das, P.; Chowdhury, C. Synthesis and biological evaluation of a novel betulinic acid derivative as an inducer of apoptosis in human colon carcinoma cells (HT-29). *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *102*, 93–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Renschler, M.F. The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 1934–1940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Anantharaman, A.; Hemachandran, H.; Mohan, S.; Ayyathan, D.M.; Kumar, D.T.; Doss, G.P.C.; Siva, R. Induction of apoptosis by apocarotenoids in B16 melanoma cells through ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway. *J. Funct. Foods* **2016**, *20*, 346–357. [[CrossRef](#)]

68. Shi, X.J.; Yu, B.; Wang, J.W.; Qi, P.P.; Tang, K.; Huang, X.; Liu, H.M. Structurally novel steroidal spirooxindole by241 potently inhibits tumor growth mainly through ROS-mediated mechanisms. *Sci Rep.* **2016**, *6*, 31607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Singh, A.P.; Lange, T.S.; Kim, K.K.; Brard, L.; Horan, T.; Moore, R.G.; Vorsa, N.; Singh, R.K. Purified cranberry proanthocyanidines (PAC-1A) cause pro-apoptotic signaling, ROS generation, cyclophosphamide retention and cytotoxicity in high-risk neuroblastoma cells. *Int. J. Oncol.* **2012**, *40*, 99–108. [[PubMed](#)]
70. Zhang, Y.; Luo, M.; Zu, Y.; Fu, Y.; Gu, C.; Wang, W.; Yao, L.; Efferth, T. Dryofragin, a phloroglucinol derivative, induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through ROS-mediated mitochondrial pathway. *Chem. Biol. Interact.* **2012**, *199*, 129–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Jin, M.L.; Park, S.Y.; Kim, Y.H.; Park, G.; Lee, S.J. Halofuginone induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits migration via downregulation of matrix metalloproteinase-9. *Int. J. Oncol.* **2014**, *44*, 309–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Chan, C.K.; Supriady, H.; Goh, B.H.; Kadir, H.A. *Elephantopus scaber* induces apoptosis through ROS-dependent mitochondrial signaling pathway in HCT116 human colorectal carcinoma cells. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *168*, 291–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Rahman, M.A.; Akhtar, J.; Sahabjada; Arshad, M. Evaluation of cytotoxic potential and apoptotic effect of a methanolic extract of *Bauhinia racemosa* Lam. against a human cancer cell line, HeLa. *Eur. J. Integr. Med.* **2016**, *8*, 513–518. [[CrossRef](#)]
74. Qian, Y.; Guan, T.; Huang, M.; Cao, L.; Li, Y.; Cheng, H.; Jin, H.; Yu, D. Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria-dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF- $\kappa$ B activation in a cerebral ischemia mouse model. *Neurochem. Int.* **2012**, *60*, 759–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kuranaga, E. Beyond apoptosis: Caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. *Genes Cells* **2012**, *17*, 83–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Kwon, S.J.; Lee, J.H.; Moon, K.D.; Jeong, I.Y.; Ahn, D.U.; Lee, M.K.; Seo, K.I. Induction of apoptosis by isoegomaketone from *Perilla frutescens* L. in B16 melanoma cells is mediated through ROS generation and mitochondrial-dependent,-independent pathway. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *65*, 97–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Ichim, G.; Tait, S.W. A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer.* **2016**, *18*, 539–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Taylor, R.C.; Cullen, S.P.; Martin, S.J. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 231–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Zhang, G.; Liu, S.; Liu, Y.; Wang, F.; Ren, J.; Gu, J.; Zhou, K.; Shan, B. A novel cyclic pentapeptide, H-10, inhibits B16 cancer cell growth and induces cell apoptosis. *Oncol. Lett.* **2014**, *8*, 248–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Tait, S.W.G.; Green, D.R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 621–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Wang, K.; Zhu, X.; Zhang, K.; Zhu, L.; Zhou, F. Investigation of gallic acid induced anticancer effect in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2014**, *28*, 387–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Wang, R.; Ma, L.; Weng, D.; Yao, J.; Liu, X.; Jin, F. Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in human small cell lung cancer H446 cell line via the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 3075–3083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Santos, E.M.S.; Rocha, R.G.; Santos, H.O.; Guimarães, T.A.; Fraga, C.A.C.; Silveira, L.H.; Batista, P.R.; Oliveira, P.S.L.; Melo, G.A.; Santos, S.H.; et al. Gallic acid modulates phenotypic behavior and gene expression in oral squamous cell carcinoma cells by interfering with leptin pathway. *Pathol. Res. Pract.* **2018**, *214*, 30–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Sun, G.; Zhang, S.; Xie, Y.; Zhang, Z.; Zhao, W. Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Lett.* **2016**, *11*, 150–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Liu, C.; Lin, J.J.; Yang, Z.Y.; Tsai, C.C.; Hsu, J.L.; Wu, Y.J. Proteomic study reveals a co-occurrence of gallic acid-induced apoptosis and glycolysis in B16F10 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 11672–11680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Lo, C.; Lai, T.Y.; Yang, J.H.; Yang, J.S.; Ma, Y.S.; Weng, S.W.; Chen, Y.Y.; Lin, J.G.; Chung, J.G. Gallic acid induces apoptosis in A375.S2 human melanoma cells through caspase-dependent and -independent pathways. *Int. J. Oncol.* **2010**, *37*, 377–385. [[PubMed](#)]

87. Badhani, B.; Sharma, N.; Kakkar, R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Rsc. Adv.* **2015**, *5*, 27540–27557. [[CrossRef](#)]
88. Fu, Y.; Ye, X.; Lee, M.; Rankin, G.; Chen, Y.C. Prodelphinidins isolated from Chinese bayberry leaves induces apoptosis via the p53-dependent signaling pathways in OVCAR-3 human ovarian cancer cells. *Oncol Lett.* **2017**, *13*, 3210–3218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Fujii, W.; Toda, K.; Kawaguchi, K.; Kawahara, S.I.; Katoh, M.; Hattori, Y.; Fujii, H.; Makabe, H. Syntheses of prodelphinidin B3 and C2, and their antitumor activities through cell cycle arrest and caspase-3 activation. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3543–3550. [[CrossRef](#)]
90. Engelbrecht, A.M.; Mattheyse, M.; Ellis, B.; Loos, B.; Thomas, M.; Smith, R.; Peters, S.; Smith, C.; Myburgh, K. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. *Cancer Lett.* **2007**, *258*, 144–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Kumar, R.; Deep, G.; Wempe, M.F.; Surek, J.; Kumar, A.; Agarwal, R.; Agarwal, C. Procyanidin B2 3,3''-di-O-gallate induces oxidative stress-mediated cell death in prostate cancer cells via inhibiting MAP kinase phosphatase activity and activating ERK1/2 and AMPK. *Mol. Carcinog.* **2017**, *57*, 57–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Hsu, C.P.; Lin, Y.H.; Chou, C.C.; Zhou, S.P.; Hsu, Y.C.; Liu, C.L.; Ku, F.M.; Chung, Y.C. Mechanisms of grape seed procyanidin-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 283–289. [[PubMed](#)]
93. Reis, J.; Gaspar, A.; Milhazes, N.; Borges, F. Chromone as a Privileged Scaffold in Drug Discovery: Recent Advances. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7941–7957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Sharma, S.K.; Kumar, S.; Chand, K.; Kathuria, A.; Gupta, A.; Jain, R. An Update on Natural Occurrence and Biological Activity of Chromones. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3825–3852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Keri, R.S.; Budagumpi, S.; Pai, R.K.; Balakrishna, R.G. Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *6*, 340–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Meda, A.; Lamien, C.E.; Romito, M.; Millogo, J.; Nacoulma, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in *Burkina Fasan* honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.* **2005**, *91*, 571–577. [[CrossRef](#)]
97. Liberio, S.A.; Pereira, A.L.; Dutra, R.P.; Reis, A.S.; Araújo, M.J.; Mattar, N.S.; Silva, L.A.; Ribeiro, M.N.; Nascimento, F.R.; Guerra, R.N.; Monteiro-Neto, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *11*, 108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
99. Gupta, D.; Gupta, R.K. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: *In vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Campos, J.F.; dos Santos, U.P.; Rocha, P.S.; Damião, M.J.; Balestieri, J.B.P.; Cardoso, C.A.L.; Paredes-Gamero, E.J.; Estevinho, L.M.; Souza, K.P.; Santos, E.L. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, 296186. [[CrossRef](#)]
101. Paredes-Gamero, E.J.; Martins, M.N.; Cappabianco, F.A.; Ide, J.S.; Miranda, A. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: Regulated cell death or membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 1062–1072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Moraes, V.W.R.; Caires, A.C.F.; Paredes-Gamero, E.J.; Rodrigues, T. Organopalladium compound 7b targets mitochondrial thiols and induces caspase-dependent apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Cell Death. Dis.* **2013**, *4*, e658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

