

## Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*

### Evaluation of antioxidant and antiproliferative activities in fruits of *Campomanesia pubescens*

RIALA6/1579

Claudia Andrea Lima CARDOSO<sup>1\*</sup>, Marcos José SALVADOR<sup>2</sup>, João Ernesto CARVALHO<sup>2</sup>, Roberta Gomes COELHO<sup>3</sup>

\*Endereço para Correspondência: <sup>1</sup>Centro de Pesquisa em Biodiversidade, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Caixa Postal 351, Dourados, MS, Brasil. CEP 79804-970, Tel: 67 39022643. E-mail: claudia@uems.br

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Curso de Farmácia, DBV-IB/CPQBA, Campinas, SP, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Instituto de Química, Campo Grande, MS, Brasil

Recebido: 17.12.2012 - Aceito para publicação: 01.10.2013

#### RESUMO

A investigação química dos extratos bioativos dos frutos de *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) resultou no isolamento de duas chalconas. Os compostos isolados foram identificados pelas análises espectroscópicas (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e 2D RMN) e, por comparação com os dados descritos na literatura. A capacidade antioxidante dos extratos e frações foi determinada utilizando-se os ensaios de capacidade de absorção de oxigênio radical (ORAC-FL) e de DPPH; e os teores de fenólicos solúveis foram medidos utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Os efeitos antiproliferativos dos extratos e de isolados de chalconas **1** e **2** foram determinados *in vitro* contra as seguintes células cancerosas humanas U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NC1-ADR/RES (ovário resistente), 786,0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon) e K562 (leucemia), e contra linhagem celular não cancerígena VERO. O extrato hexânico e os compostos isolados de chalconas **1** e **2** demonstraram efeito antiproliferativo potente contra linhagens de células cancerosas com valores de inibição de crescimento total (TGI) menores dos aqueles observados na linhagem celular controle. A atividade mais elevada das chalconas **1** e **2** foi detectada nas células MCF-7, PC-3 e HT-29.

**Palavras-chave.** guavira, *Campomanesia pubescens*, DPPH, antiproliferativa, chalconas.

#### ABSTRACT

Chemical investigation on the bioactive extracts from fruits of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) resulted in the isolation of two chalcones. The isolated compounds were identified by means of spectroscopic analysis (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and 2D NMR), and by comparing with the data reported in the specific literature. Antioxidant capacity of extracts and fractions was determined using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL) and DPPH assays; and the total soluble phenolic contents were measured by using Folin-Ciocalteu reagent. The anti-proliferative effects of the extracts and of the chalcone isolates **1** and **2** were determined *in vitro* against human cancer cells lineages U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NC1-ADR/RES (ovarian-resistant), 786.0 (kidney), NCI-H460 (lung), PC-3 (prostate), OVCAR-3 (ovarian), HT-29 (colon) and K562 (leukemia), and against non-cancerous cell line VERO. Hexanic extract and chalcone isolated compounds **1** and **2** showed potent antiproliferative effect against cancer cell lineages with lower total growth inhibition (TGI) values than those found in control cell line. The highest activity of the chalcones **1** and **2** was observed against the MCF-7, PC-3 and HT-29 cell lines.

**Keywords.** guavira, *Campomanesia pubescens*, DPPH, antiproliferative, chalcones.

## INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde estima que em 2020 cerca de 15 milhões de pessoas irão morrer da doença<sup>1</sup>. Apesar do elevado número, um grande progresso tem sido feito em relação às terapias para tratar o câncer. O tratamento quimioterápico é o mais utilizado, mas muitas substâncias de fontes naturais têm sido utilizadas, principalmente aquelas obtidas de plantas que são isoladas, identificadas e/ou sintetizadas. Como exemplo o diterpeno taxol isolado de *Taxus brevifolia* e os alcalóides vincristina e vinblastina extraídos de *Catharanthus roseus*<sup>2</sup>.

O potencial inibitório contra o câncer tem sido confirmado em vários modelos animais. Apesar de que uma avaliação preliminar pode ser realizada em testes *in vitro* utilizando linhagens de células tumorais para avaliação de extratos e de substâncias puras isoladas. Deste modo, a realização de ensaios biológicos para verificar algumas possíveis atividades que são atribuídas ou não a várias espécies vegetais torna-se importante e essencial ferramenta para dar continuidade a estudos visando à busca por substâncias bioativas<sup>3,4</sup>.

Como parte de nossa pesquisa com plantas estão as espécies do gênero *Campomanesia* (família Myrtaceae), como a espécie *Campomanesia pubescens*. Essas espécies são conhecidas como guavira e são encontradas em abundância no estado de Mato Grosso do Sul podendo ser uma fonte de compostos bioativos<sup>5</sup>.

O gênero *Campomanesia* pertencente à subfamília *Myrtoidea* apresenta aproximadamente 25 espécies distribuídas por toda a América tropical, sendo 15 nativas do Brasil<sup>5-7</sup>. São amplamente usadas pela população e podem ser consumidas frescas ou usadas para elaborar sucos, licores e doces. Em alguns lugares utiliza-se a infusão de suas folhas, casca dos frutos e talos como remédio para disenteria, problemas de estômago, febre entre outros<sup>8</sup>. Apesar do seu uso medicinal, a literatura relata poucas investigações químicas e farmacológicas com plantas deste gênero.

Dentre os estudos químicos existentes, o extrato hexânico dos frutos de *C. pubescens* foi analisado e identificado por cromatografia líquida alta eficiência (CLAE) duas chalconas e quatro flavanonas<sup>9</sup>. Dos frutos de *C. adamantium* uma fração contendo uma mistura de uma flavanona e uma chalcona apresentou atividade contra o bacilo da tuberculose, *Mycobacterium*

*tuberculosis*. A variação das concentrações das substâncias presentes nessa mistura apresentou MIC entre 62,5 a 7,8 µg/mL demonstrando sinergismo entre essas substâncias<sup>10</sup>. Flavanonas e chalconas sintéticas e naturais são conhecidas por apresentarem várias atividades farmacológicas entre elas citotóxica, anti-inflamatória, antiangiogênica, antipirética, analgésica.<sup>11,12</sup>

No extrato hexânico das folhas, foram identificados sesquiterpenos e triterpenos. Esse extrato não se mostrou tóxico frente à *Artemia salina* e apresentou atividade antioxidante<sup>13</sup>, o que sugere ter um potencial para combater radicais livres além de diversas doenças a eles relacionados<sup>14-16</sup>. Além disso, o ensaio utilizando *A. salina* tem sido considerado um bom método para detecção de compostos bioativos em extratos de plantas e a toxicidade a este microcrustáceo tem uma boa correlação com atividades antitumor e anti-*Trypanosoma cruzi*<sup>17,18</sup>.

Outros estudos químicos empregando CLAE também em folhas de *C. pubescens* relataram a presença dos flavonóides como a miricitrina. Quercetina, miricitrina e rutina foram encontrados em *C. xanthocarpa*; e miricitrina e quercetina em *C. quazumaefolia*<sup>19</sup>. A miricitrina, substância encontrada em espécies deste gênero, apresenta várias atividades farmacológicas, entre elas antinociceptiva e antioxidante<sup>20,21</sup>.

Dando continuidade ao estudo da espécie *C. pubescens*, este artigo relata o isolamento e a identificação de duas chalconas e a avaliação da atividade antiproliferativa frente a linhagens de células tumorais humanas, atividade antioxidante e quantificação dos teores de fenóis totais solúveis dos extratos dos frutos de *C. pubescens*, visando contribuir para o conhecimento da constituição química dessa espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta da amostra

Os frutos de *C. pubescens* foram coletados no município de Campo Grande, MS, Brasil, em dezembro de 2008. A espécie foi identificada e uma exsicata foi depositada no Herbário Mato Grosso do Sul-HMS, Campo Grande, MS, Brasil, sob o número 5199.

### Obtenção dos extratos e isolamento das substâncias

Os frutos inteiros e frescos (1,8 kg da amostra total) foram triturados e extraídos por maceração

exaustiva sucessivamente com hexano e acetato de etila à temperatura ambiente. Os solventes de cada extrato foram evaporados sob pressão em rotaevaporador fornecendo 23,53 g de extrato hexânico (EHex) e 40,87 g de extrato acetato de etila (EAcOEt). O extrato hexânico (22,59 g) foi dissolvido em acetonitrila, aquecido e mantido a aproximadamente 70 °C por 1 h. Após o aquecimento a amostra foi resfriada e mantida em refrigerador a -4 °C por 24 h. Após esse período o sobrenadante foi decantado e o resíduo foi novamente submetido a esse processo. Após esse procedimento obteve-se 5,67 g da fração solúvel, denominada de fase acetonitrila (FACN), e 16,87 g de resíduo, denominada de fase hexânica (FHex). A fase acetonitrila (3,20 g) foi submetida à coluna cromatográfica de sílica gel 70-230 mesh, utilizando hexano-AcOEt em gradiente de polaridade crescente, fornecendo 29 frações por cromatografia em coluna. A fração 8 (253,53 mg) foi novamente submetida a uma coluna em gel de sílica (230-400 mesh) nos mesmos solventes utilizados acima em gradiente de polaridade crescente e forneceu o composto **1** (63,57 mg). A fração 10 (234,98 mg) forneceu o composto **2** (6,66 mg) após ser fracionada em gel de sílica (230-400 mesh), porém utilizando hexano-acetona em gradiente de polaridade crescente.

#### **Instrumentação e procedimentos experimentais gerais**

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em um espectrômetro Bruker DPX-300 (<sup>1</sup>H: 300 MHz e <sup>13</sup>C: 75 MHz) utilizando-se como solventes CDCl<sub>3</sub> e Acetona-d<sub>6</sub> e TMS como referência interna.

Na cromatografia de adsorção em coluna (CC) foi utilizado gel de sílica 60 (63-200 µm, 70-230 mesh e 40-63 µm, 230-400 mesh, Merck). Para CCD foram utilizadas cromatoplasmas de alumínio recobertas por filme de 200 µm de sílica gel, com indicador de fluorescência na faixa de 245 nm. As placas foram reveladas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e por aspersão de solução ácida de vanilina seguida de aquecimento. Os eluentes utilizados nas colunas cromatográficas foram hexano (Dinâmica), acetato de etila (Chenco) e acetona (Dinâmica).

#### **Teor de compostos fenólicos**

O teor total de compostos fenólicos solúveis foi determinado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Foram preparadas soluções com concentração de 800 µg/mL de cada extrato e partição. Aliquotas dessas soluções (100 µL) foram adicionadas a 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Após 2

minutos, 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 50 % foi adicionado à mistura. Após 30 minutos a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 750 nm. Com os dados do ácido gálico foi obtida uma curva analítica. O conteúdo de fenóis totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL de solução. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **Atividade antioxidante**

Os testes de atividade antioxidante e da quantificação de fenóis solúveis totais foram realizados em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1100.

O ensaio com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) foi realizado pela adição de 1,0 mL de cada extrato, em diferentes concentrações (40 µg/mL a 400 µg/mL), a 2,0 mL de uma solução a 0,004 % de DPPH em metanol. Após incubação a 25 °C por 30 minutos, a absorbância de cada amostra foi lida no comprimento de onda de 517 nm. Todas as análises foram feitas em triplicata. A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula: % I = (A<sub>DPPH</sub> - (A<sub>A</sub> - A<sub>DPPH</sub>)) / A<sub>DPPH</sub> × 100. Onde A<sub>DPPH</sub> é a absorbância máxima do DPPH, A<sub>A</sub> é a absorbância da amostra após 30 minutos de reação e A<sub>A</sub> é a absorbância da amostra em metanol. Os resultados foram expressos em CI<sub>50</sub> que é a concentração capaz de reagir com 50 % do DPPH presente.

Na avaliação da atividade antioxidante empregou-se também o ensaio cinético ORAC-FL (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) utilizando a metodologia como descrita por Salvador<sup>22</sup>. Estes ensaios foram realizados em triplicata e expressos como µM de Trolox equivalente por grama de extrato em base seca.

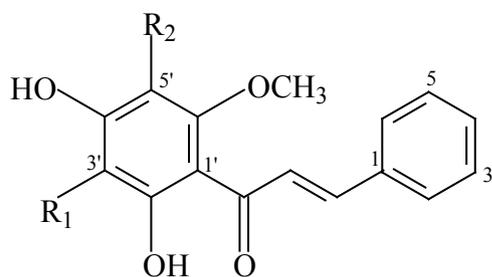
#### **Avaliação da atividade antiproliferativa**

Para a realização dos ensaios foram empregadas oito linhagens de células tumorais e um controle. A avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa foi realizada segundo metodologia descrita por Monks<sup>23</sup>, utilizando-se doxorubicina como controle positivo. Para o teste de atividade, foram plaqueados 100 µL de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, em placas de 96 compartimentos. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Depois desse período, uma placa controle foi fixada através da adição de ácido tricloroacético para determinação da quantidade de células no momento da adição das drogas-teste. Os extratos e as substâncias isoladas foram avaliados em concentrações que variaram de 0,0625 a 250 µg/mL e

incubados por 48 h. Decorrido o período de incubação, as placas foram coradas pela adição de 50 µL do corante proteico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 %, e incubadas a 4 °C durante 30 min. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10 µM e pH 10,5 por 5 min em ultrassom. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente determinou-se os teores de fenóis totais solúveis dos extratos hexânico e acetato de etila, seguida da avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa e antioxidante. Após isso, procedeu-se o fracionamento cromatográfico da fase acetonitrila (FACN), proveniente do extrato hexânico dos frutos que levou ao isolamento das chalconas 2',4'-diidroxí-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona. (1) e 2',4'-diidroxí-5'-metil-6'-metoxichalcona (2). Suas estruturas são mostradas na Figura 1. Ambas foram identificadas com base nos dados espectrais de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e RMN 2D e comparação com os dados da literatura<sup>24</sup>.



**Figura 1.** Substâncias (1 e 2) isoladas dos extratos dos frutos de *C. pubescens*

Em estudos realizados anteriormente somente a substância foi identificada no extrato hexânico dos frutos de *C. pubescens* empregando CLAE-DAD e padrões<sup>9</sup>.

A atividade antioxidante dos extratos e partições foi realizada por dois métodos: DPPH (radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ORAC-FL (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)<sup>25</sup>. Os resultados são reportados na Tabela 1. O extrato acetato de etila (EAcOEt) mostrou ser o mais ativo dentre os analisados e a FACN apresentou a segunda maior atividade. Quando comparados os teores de compostos fenólicos

para essas amostras (Tabela 1) na concentração de 1000 µg/mL, verificou-se que o EAcOEt apresentou um teor de fenóis inferior a FACN, 77,74 e 96,24 µg EAG/mL, respectivamente. O extrato hexânico (EHex) e a fase hexânica (FHex) foram os menos ativos diante ao ensaio com DPPH. Apesar de apresentar um teor de fenóis (85,09 µg EAG/mL) superior ao EAcOEt, o EHex apresentou baixa atividade. Isso pode ser devido a maiores quantidades de flavanonas e chalconas que estão presentes no EHex e que não apresentam as características químicas necessárias para a atividade antioxidante utilizando o método do DPPH, mas que apresentam um teor de fenóis superior ao EAcOEt.

As substâncias 1 e 2 tiveram suas  $CI_{50}$  determinadas frente ao DPPH iguais a  $205 \pm 1,2$  e  $141 \pm 4,3$  µM, respectivamente, valores superiores ao ácido gálico, que foi utilizado como padrão e apresentou  $CI_{50}$  de  $25 \pm 0,1$  µM<sup>26</sup>. Esses resultados mostram que a substância 1, majoritária em todas as amostras, apresenta atividade cerca de oito vezes menor que o ácido gálico, justificando a afirmação de que é pouco ativa frente ao DPPH quando comparado ao padrão.

Entretanto no ensaio cinético ORAC-FL, baseado em mecanismos de transferência de hidrogênio, ambos os extratos apresentaram considerável capacidade antioxidante, da ordem de 1200 µM de Trolox equivalente por grama de extrato em base seca (Tabela 1). Essas diferenças de valores observadas nos resultados podem ser explicadas baseadas nos diferentes mecanismos envolvidos nos dois métodos de determinação da capacidade antioxidante<sup>26</sup>. Assim, torna-se importante empregar mais de um ensaio na avaliação da capacidade antioxidante de amostras complexas como os extratos vegetais, buscando-se fazer uso de ensaios diretos e indiretos.

A atividade antiproliferativa dos extratos de *C. pubescens* e das substâncias 1 e 2 isoladas foram avaliadas na inibição da proliferação de células em linhagens de células humanas UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (cólon) em comparação com célula normal VERO (célula epitelial de rim de macaco verde).

Os resultados da atividade antiproliferativa indicam que os extratos dos frutos de *C. pubescens* acumulam substâncias com efeito citocida para linhagens de células tumorais humanas (Tabela 2). A linhagem de célula normal VERO (célula epitelial

**Tabela 1.** Atividade antioxidante e total de fenóis dos extratos e partições dos frutos de *C. pubescens*

Teste	Amostras			
	EHex	FHex	FACN	EAcOEt
DPPH <sup>1</sup>	>400,0	>400,0	290,9	140,85
ORAC-FL <sup>2</sup>	1210,33	-	-	1288,18
Fenóis <sup>3</sup>	85,09	57,61	96,24	77,74

<sup>1</sup> Atividade antioxidante expressa em CI50. <sup>2</sup> Dados apresentados como média do ensaio em triplicata, os resultados estão expressos como  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalente por grama de extrato em base seca. <sup>3</sup> Em  $\mu\text{g}$  EAG/mL, medida em uma solução a 800  $\mu\text{g/mL}$ . EHex: extrato hexânico. FHex: fase hexânica. FACN: Fase acetonitrila. EAcOEt: extrato acetato de etila. -: experimento não realizado

de rim de macaco verde, linhagem de célula controle), os extratos EHex e EAcOEt e dos frutos de *C. pubescens* mostraram baixa citotoxicidade, uma vez que ambos apresentaram valor de TGI (concentração necessária para inibição de 100 % do crescimento celular) > 250,00  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto frente as linhagens de células tumorais UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama) e NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos) o EHex apresentou-se ativo com valores de TGI 103,50  $\mu\text{g/mL}$  e para a linhagem HT-29 (côlon) o TGI foi de 207,17  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 2). O EAcOEt não mostrou atividade antiproliferativa até a concentração de 250,00  $\mu\text{g/mL}$ . Possivelmente a diferença de valores observadas entre os diferentes extratos se deve a presença das chalconas no extrato hexânico. Chalconas são polifenóis e participam como intermediários na biossíntese dos flavonóides<sup>27</sup>. A literatura relata inúmeros estudos e investigações usando diferentes modelos celular e animal que sugerem que chalconas podem inibir a iniciação de alguns tumores, assim como sua progressão<sup>27</sup>.

Sendo assim, as substâncias isoladas **1** e **2** foram testadas frente as linhagens de células tumorais humanas e apesar de apresentarem, respectivamente, TGI de 9,48 e 13,27  $\mu\text{g/mL}$  frente a célula controle VERO, mostraram resultados promissores frente às linhagens tumorais de

melanoma, mama, próstata e cólon, com valores de TGI que variaram de 4,99 a 12,94  $\mu\text{g/mL}$ , portanto com valores de TGI inferiores ao citotóxico para a célula normal controle (Tabela 2). Merece destaque o TGI da atividade antiproliferativa da chalcona **1** frente à linhagem tumoral de ovário resistente a múltiplos fármacos NCI-ADR/RES = 3,03  $\mu\text{g/mL}$ , valor este próximo a 1/3 da concentração citotóxica dessa substância frente à linhagem controle (9,48  $\mu\text{g/mL}$ ).

Simirgiotis et al<sup>28</sup> relata que a presença de um grupo 4-OH e uma ligação dupla-insaturada são características essenciais para a citotoxicidade de chalconas. Chalconas O-metiladas apresentaram atividade contra linhagens de células tumorais humanas KB, KB-VCR e A-549. Outra investigação mostrou que muitas chalconas com metoxilas no anel A exibiram atividade por inibição da polimerização da tubulina contra uma variedade de células tumorais com baixas concentrações ( $\text{CI}_{50} < 50 \mu\text{M}$ )<sup>28</sup>.

Os compostos **1** e **2** possuem nas posições 2' e 4' um grupo hidroxila e na posição 6' um grupamento metoxila. Uma característica incomum a essa classe de compostos é a presença de um grupamento metila nas posições 3' e 5', respectivamente. Comparando-se a atividade antiproliferativa das chalconas **1** e **2** entre si, observa-se que na relação estrutura-atividade a inserção

**Tabela 2.** Valores de TGI em  $\mu\text{g/mL}$ , para os extratos hexânico e em acetato de etila dos frutos de *C. pubescens* necessários para inibir a proliferação celular\*

Amostras	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT-29	VERO
Extrato hexânico	95,32	65,56	103,50	>250	>250	>250	>250	207,17	>250
Ac. de etila	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Substância 1	7,13	6,78	3,03	10,99	7,79	5,37	11,11	4,99	9,48
Substância 2	10,62	8,10	14,59	13,36	14,66	9,20	12,94	8,63	13,27

\*TGI: *Total Growth Inhibition* - concentração que promove a inibição 100 % do crescimento celular. Os valores foram determinados por análise de regressão não linear (sigmoideal), utilizando o programa Origin 7.5 ( $r^2 > 0,9$ ).

Células tumorais: UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (côlon); Célula normal: VERO (célula epitelial de rim de macaco verde)

de um grupamento metila na posição 3' da chalcona **1** potencializa consideravelmente sua atividade citotóxica frente as células tumorais, estando estes dados coerentes com relatos da literatura<sup>29</sup>.

Estudos realizados por Ye et al<sup>30</sup> com o composto **1** isolado de *Cleistocalyx operculatus* demonstraram que essa chalcona foi citotóxica para células K562 de humanos leucêmicas com  $CI_{50}$  igual a 14,2  $\mu M$ <sup>30</sup>. De acordo com o autor o mecanismo antitumor de como as chalconas atuam ainda não é totalmente esclarecido, embora estudos sugeriram que esses compostos possam induzir apoptose em células cancerígenas. As chalconas buiteína e isoliquiritigenina induziram apoptose em células de melanoma *in vitro* e a chalcona phloretina induziu apoptose em células de melanoma e células de humano leucêmicas<sup>31</sup>.

Em conclusão, nosso estudo avaliou os teores de fenóis totais atividades antioxidante, por dois métodos diferentes, e antiproliferativa dos extratos de *C. pubescens*. Duas chalconas foram isoladas, identificadas e avaliadas quanto às atividades citadas anteriormente. Chalconas são compostos caracterizados por diversas propriedades bioquímicas, atuando como atividade citotóxica, anticancerígena, mutagênica e quimiopreventiva, além de antiviral, antimicrobiana, apesar de que o papel que ela desempenha, o mais conhecido, está associado a propriedades de captura de radicais livres<sup>27,31-32</sup>. Entretanto, as chalconas por nós avaliadas apresentaram baixa atividade antioxidante. De acordo com Zakaria et al<sup>32</sup> sugerem que as propriedades antioxidante exibida por substâncias fenólicas e extratos que contenham esses compostos estão direta ou indiretamente relacionadas com a atividade antiproliferativa<sup>32</sup>, mas isso ainda não está totalmente esclarecido. Estudos futuros serão necessários para elucidar o mecanismo de atuação das chalconas **1** e **2**.

## AGRADECIMENTOS

A FUNDECT, FAPESP e CNPq

## REFERÊNCIAS

1. Barbosa CES, Silveira-Lacerda EDP. Toxicidade aguda em dose simples do composto experimental cis-tetraaminoxalatorutênio (III). *Infarma*. 2006;18(11): 14-6.
2. Kingston DGI, Newman DJ. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology. London: John Wiley & Sons; 2009, p. 249-60.
3. Pilatova M, Varinska L, Perjesi P, Sarissky M, Mirossay L, Solar P, et al. *In vitro* antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. *Toxicol in Vitro*. 2010;24:1347-55.
4. Zakaria ZA, Rofiee MS, Mohamed AM, Teh LK, Salleh MZ. *In Vitro* Antiproliferative and Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of the Extracts of *Melastoma malabathricum* Leaves. *J Acupunct Meridian Stud*. 2011;4(4):248-56.
5. Limberger RP, Apel MA, Sobral M., Moreno PRH, Henriques AT, Menu C. Aromatic plant from Brazil-chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). *J Essent Oil Res*. 2001;13(2):113-5.
6. Ferreira LC, Guimarães AG, Paula CA, Michel MCP, Guimarães R G, Rezende AS, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J Ethnopharmacol*. 2013;145:100-8.
7. Moura-Costa GF, Nocchi SR, Coelle LF, Mello JCP, Nakamura CV, Dias Filho BP, et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinal sonan indigenous reserve in Rio das Cobras, Parana, Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2012;143:631-8.
8. Lorenzi H, Sartori SF, Bacher LB, Lacerda MTC. Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas – (de consumo *in natura*). Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2006.
9. Cardoso CAL, Salmazzo GR, Honda NK, Prates CB, Vieira MC, Coelho RG. Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia* Species (Myrtaceae). *J Med Food*. 2010;13(5):1273-6.
10. Pavan FR, Leite CQF, Coelho RG, Coutinho ID, Honda NK, Cardoso CAL, et al. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Quim Nova*. 2009;32:1222-6.
11. Bandgar BP, Gawande SS, Bodade RG, Totre JV, Khobragade CN. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorgan Med Chem*. 2010;18:1364-70.
12. Nielsen SF, Boesen T, Larsen M, Schönning K, Kromann H. Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 40-hydroxy group. *Bioorgan Med Chem*. 2004;12:3047-54.
13. Cardoso CAL, Silva JRM, Kataoka VMF, Brum CS, Poppi NR. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. *Rev Cien Farm Bas Aplic*. 2008;29:297-301.
14. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Ranha J, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Antioxidant activity plants extracts containing phenolics compounds. *J Agric Food Chem*. 1999;47:3954-62.
15. Noguch N, Niki E. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drugs for atherosclerosis. *Free Rad Biol Med*. 2000;28:1538-46.
16. Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev*. 1997;55:544-52.
17. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JF, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL. Brine shrimp a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 1982;45:31-5.
18. Zani CL, Chaves PPG, Queiroz R, Menes NM, Oliveira AB, Cardoso JE, et al. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypasoma cruzi* activity. *Phytomed*. 1995;2:47-54.
19. Schmeda-Hirschmann G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoter*. 1995;66:373-4.
20. Córdova MM, Werner MFP, Silva MD, Ruanic AP, Pizzolatti MG, Santos ARS. Further antinociceptive effects of myricitrin

- in chemical models of overt nociception in mice. *Neurosci Lett*. 2011;495:173-7.
21. Meotti FC, Luiz AP, Pizzolatti MG, Kassuya CA, Calixto JB, Santos AR. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the l-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316:789-96.
  22. Salvador MJ, Ferreira EO, Mertens-Talcott SU, Castro WV, Butterweck V, Derendorf H, et al. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*. 2006;61:19-25.
  23. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, et al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83:757-66.
  24. Agrawal PK. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Amsterdam: Elsevier; 1989, p 95-235.
  25. Belofsky G, Percivill D, Lewis K, Tegos GP, Ekart J. Phenolic metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria. *J Nat Prod*. 2004;67:481-4.
  26. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53:1841-56.
  27. Go ML, Wu X, Liu XL. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr Med Chem*. 2005;12:483-99.
  28. Simirgiotis MJ, Adachi S, To S, Yang H, Reynertson KA, Basile M J, et al. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). *Food Chem*. 2008;107:813-9.
  29. Andrade Cunha GM, Fontenele JB, Nobre Júnior HV, De Sousa FCM, Silveira ER, Nogueira NAP, et al. Cytotoxic Activity of Chalcones Isolated from *Lonchocarpus Sericeus* (Pocr.) Kunth. *Phytother Res*. 2003;17:155-9.
  30. Ye C-L, Qian F, Wei D-Z, Lu Y-H, Liu J-W. Induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone. *Leukemia Res*. 2005;29:887-92.
  31. Ye CL, Liu JW, Wei DZ, Lu YH, Qian F. *In vitro* anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'- dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. *Pharmacol Res*. 2004;50:505-10.
  32. Zakaria ZA, Rofiee MS, Mohamed AM, Teh LK, Salleh MZ. *In Vitro* Antiproliferative and Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of the Extracts of *Melastoma malabathricum* Leaves. *J Acupunct Meridian Stud*. 2011;4:248-56.