

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

AISLAN CRISTINA RHEDER FAGUNDES PASCOAL



PROSPECÇÃO DE ANTIOXIDANTES E DE SUBSTÂNCIAS  
COM ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM  
*Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE)

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
AISLAN C.R. FAGUNDES PASCOAL  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia  
para a obtenção do Título de Mestre em Biologia  
Vegetal.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marcos José Salvador".

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador.

P263p	<p>Pascoal, Aislan Cristina Rheder Fagundes, 1982- Prospecção de antioxidantes e de substâncias com atividade antiproliferativa em <i>Campomanesia adamantium</i> (Myrtaceae) / Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Marcos José Salvador. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Campomanesia. 2. Antioxidantes. 3. Atividade antiproliferativa. 4. Chalconas. 5. Flavonóides. I. Salvador, Marcos José, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Prospect of antioxidants and antiproliferative substances in  
*Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)

**Palavras-chave em Inglês:**

Campomanesia

Antioxidants

Antiproliferative activity

Chalcones

Flavonoids

**Área de concentração:** Biologia Vegetal

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal

**Banca examinadora:**

Marcos José Salvador [Orientador]

Elaine Minatel

Elfriede Marianne Bacchi

**Data da defesa:** 23-02-2012

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Vegetal

Campinas, 23 de fevereiro de 2012

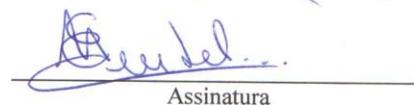
**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcos José Salvador (Orientador)



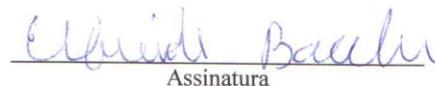
Assinatura

Profa. Dra. Elaine Minatel



Assinatura

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi



Assinatura

Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad

Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

Assinatura

*Dedico este trabalho aos meus pais, Fandes e Telma,  
ao meu marido Vinicius, à minha irmã Lorele e  
minhas afilhadas Ana Clara e Mirella.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu conforto nas horas difíceis e a quem sempre agradeço nos bons momentos.

Ao Prof. Dr. Marcos José Salvador por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e por sempre me “dar corda” para ver até onde eu iria. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela boa convivência e pela amizade.

Aos meus pais, Fandes, meu exemplo de honestidade e profissionalismo, e minha mãe Telma, pela paciência e carinho, sempre me incentivaram nos meus estudos e não mediram esforços para que eu estivesse hoje aqui.

Ao meu marido Vinicius, meu melhor amigo, companheiro, confiante, que sempre esteve ao meu lado, mesmo quando estava há alguns mil quilômetros de distância. Obrigada pela paciência, amor e pelas longas discussões sobre meus resultados, que sempre foram muito construtivas. Com você, essa caminhada se tornou mais leve e mais feliz.

À minha sobrinha e afilhada Ana Clara, que ainda tão pequena, me revigorava com seus abraços e declarações de seu amor por mim e aos meus tios e tias e minha avó pelo torcida incessante.

À minha amiga Rogéria por me ajudar com o Origin e também pelos momentos de apoio e de amizade sincera. Ao Adilson pela amizade, a ajuda para prova de seleção do departamento e às inúmeras conversas nos corredores do laboratório. Carol e Larissa obrigada pela amizade.

À Néia, Dulce e Denise e à professora Claudia por terem me recebido tão bem ao laboratório de fisiologia vegetal e sempre me ajudarem quando precisei.

Ao Prof. Dr. Rovilson Gillioli e a todos do laboratório de Controle de Saúde Animal, especialmente à Dani e Josélia, que sempre tiraram minhas dúvidas e me ensinaram muito.

À FAPESP, CAPES, CNPq e FAEPEX-UNICAMP pelo apoio financeiro.

A todos colaboradores que fizeram parte deste projeto. Muito obrigada!

# ÍNDICE

ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Metabolismo secundário vegetal	18
1.2. Plantas medicinais e pesquisa de novos fármacos	20
1.3. Família Myrtaceae e o gênero <i>Campomanesia</i>	22
1.4. Atividade antioxidante	24
1.5. Câncer	25
1.6. Morte celular: apoptose e necrose	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Coleta e identificação do material vegetal	32
3.2. Preparação do extrato bruto	32
3.3. Fracionamento do extrato bruto	32
3.4. Separação e análise de antioxidantes em TLC	33
3.5. Análise do perfil químico por HPLC-DAD e ESI-MS	34
3.6. Isolamento do constituinte químico	35
3.7. Identificação do constituinte químico isolado	35
3.8. Ensaio para avaliação da atividade antioxidante	36
3.8.1. Ensaio para avaliação da redução do radical DPPH	36
3.8.2. Ensaio ORAC <sub>FL</sub>	36
3.9. Quantificação de compostos fenólicos solúveis totais	37
3.10. Ensaio em cultura celular	38
3.10.1. Ensaio de citotoxicidade em células 3T3	38
3.10.2. Ensaio para avaliar atividade antiproliferativa frente a linhagens tumorais	38
3.10.3. Análise da Expressão dos genes <i>BAX</i> e <i>BCL-2</i>	40

3.10.4. Tratamento de células PC-3 para análise de RNAm	40
3.10.5. Extração e quantificação de ácidos ribonucléicos (RNA)	40
3.10.6. Síntese de cDNA	41
3.10.7. PCR semiquantitativo	41
3.10.8. Análise por citometria de fluxo da fragmentação do DNA de cultura de células PC-3	42
3.11. Análise estatística	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Estudo fitoquímico e identificação dos constituintes químicos	43
4.1.1. Análise do perfil químico por HPLC-UV-DAD e ESI-MS	43
4.1.2. Isolamento e identificação de constituinte químico	49
4.2. Atividade antioxidante	50
4.3. Ensaio em cultura celular	52
4.3.1. Ensaio de citotoxicidade em células precursoras de fibroblastos de camundongo 3T3	52
4.3.2. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais	55
4.3.3. Análise da Expressão dos genes <i>BAX</i> e <i>BCL-2</i>	62
4.3.4. Análise por citometria de fluxo da fragmentação do DNA de células PC-3	65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8. ANEXOS	89

## ABREVIATURAS

•OH	radical hidroxila
a.C.	antes de Cristo
AAPH	2,2'-Azobis (2-amidiopropane) dihydrochloride
AIF	fator indutor de apoptose
APAF-1	fator ativador de proteases – 1
ASC	ascorbato
BAW	butanol: ácido acético: água
BAX	Bcl-2 associated protein x
BCL-2	B-cell lymphoma protein 2
C	controle de célula
CV	coeficiente de variação
CAT	catalase
cDNA	DNA complementar
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DAD	detector arranjo diodo
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribunucleico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EROs	espécies reativas de oxigênio
ESI-MS	espectrometria de massas com ionização por electrospray
ESI(-)-MS	espectrometria de massas com ionização por electrospray em modo negativo
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FT	fenóis totais
GAE	ácido gálico equivalente
GSH	glutathiona reduzida
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IAPs	proteínas inibidoras de apoptose
IC	inibição de crescimento

INCA	Instituto Nacional do Câncer
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MDR1	gene coficante da Glioproteína P
<i>m/z</i>	razão massa/carga
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	ânion radical superóxido
°C	graus Celsius
ORAC <sub>FL</sub>	Oxygen Radical Absorbance Capacity fluorescein
p-53	proteína citoplasmática p-53
pH	potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucléico mensageiro
ROO•	hidroperoxila
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RTE	trolox equivalente relativo
SBR B	sulforrodamina B
SOD	enzimas superóxido dismutase
T	média da absorbância da célula tratada
T <sup>0</sup>	média da absorbância do controle das células no início do experimento
TGI	<i>total growth inhibition</i>
TLC	cromatografia de camada delgada
TNF	receptores de necrose tumoral
Trolox	<i>6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i>
UV	ultra-violeta

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema do fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas de *Campomanesia adamantium* pela técnica da partição líquido-líquido, utilizando os solventes hexano, acetato de etila e butanol, separando classes de compostos conforme o incremento de polaridade. 33
- Figura 2. Estruturas das substâncias identificadas no extrato etanólico das folhas de *Campomanesia adamantium* e em suas frações. A substância Ca5 foi isolada e identificada da fração acetato de etila do extrato etanólico. 45
- Figura 3. Espectro após injeção direta em modo negativo em espectrômetro de massas do extrato bruto das folhas (CAE) (a) e fração acetato de etila (CAEA) (b). 46
- Figura 4. Espectro após injeção direta em modo negativo em espectrômetro de massas do extrato fração butanólica (CAEB) (a) e amostra “rica em antioxidantes” (FRA) (b). 47
- Figura 5. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) do extrato bruto das folhas de *Campomanesia adamantium* e do padrão de isoquercitrina 1mg/mL, (a) extrato etanólico; (b) padrão de isoquercitrina e (c) solução de extrato bruto acrescida de padrão de isoquercitrina. 48
- Figura 6. Espectro ESI-MS-MS dos padrões detectados no extrato etanólico das folhas de *Campomanesia adamantium*. 49
- Figura 7. Gráfico da viabilidade celular de células 3T3, células cultivadas com diluente (RPMI 1640: DMSO 99:1 - CTL), células tratadas com o extrato bruto (CAE) com concentrações entre 0,25 e 250 µg/mL após 48h. 53
- Figura 8. Gráfico da viabilidade celular de células 3T3, células cultivadas com diluente (RPMI 1640: DMSO 99:1 - CTL), células tratadas com a fração acetato de etila (CAEA) com concentrações entre 0,25 e 250 µg/mL após 48h. 54
- Figura 9. Gráfico da viabilidade celular de células 3T3, células cultivadas com diluente (RPMI 1640: DMSO 99:1 - CTL), células tratadas com a fração butanólica (CAEB) com concentrações entre 0,25 e 250 µg/mL após 48h. 54
- Figura 10. Gráfico da atividade antiproliferativa do extrato bruto etanólico das folhas de *C. adamantium* (CAE) em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato. Linhagens utilizadas: 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); K562 (leucemia). em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h. 56
- Figura 11. . Gráfico da atividade antiproliferativa da fração acetato de etila do extrato bruto etanólico das folhas de *C. adamantium* (CAEA) em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do fração. Linhagens utilizadas: 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); K562 (leucemia). 57

Figura 12. Gráfico da atividade antiproliferativa da fração butanólica das folhas de *C. adamantium* (CAEB) em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato. Linhagens utilizadas: 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); K562 (leucemia). 58

Figura 13. Gráfico da atividade antiproliferativa da chalcona isolada (Ca5) a partir da fração acetato de etila das folhas de *C. adamantium* em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato. Linhagens utilizadas: 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); K562 (leucemia). 59

Figura 14. Gráfico da atividade antiproliferativa do quimioterápico Doxorubicina em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do quimioterápico. Linhagens utilizadas: 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); K562 (leucemia). 60

Figura 15. Gráfico da análise de expressão do gene *BAX* em células não tratadas (Ctl - diluente RPMI 1640: DMSO, 99:1), células tratadas com a chalcona Ca5 e células tratadas com o quimioterápico doxorubicina 20 µg/mL. 63

Figura 16. Gráfico da análise de expressão do gene *BAX* em células não tratadas (Ctl - diluente RPMI 1640: DMSO, 99:1), células tratadas com a chalcona Ca5 e células tratadas com o quimioterápico doxorubicina 20 µg/mL. 64

Figura 17. Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3 (controle negativo, células tratadas com diluente- RPMI 1640/DMSO 99:1) em citômetro de fluxo, cultivadas por 48 horas. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado. 66

Figura 18. Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com doxorubicina por 48h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado. 66

Figura 19. Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com a chalcona Ca5 por 48h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado. 67

Figura 20. Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com doxorubicina por 24h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado. 67

Figura 21. Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com a chalcona Ca5 por 24h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado. 68

- Figura 22. Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com doxorubicina por 12h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado. 68
- Figura 23. Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com a chalcona Ca5 por 12h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado. 69
- Figura 24. Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com doxorubicina por 6h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado. 69
- Figura 25. Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com a chalcona Ca5 por 6h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado. 70
- Figura 26. Porcentagem de células com DNA fragmentado por análise em citômetro de fluxo. Ctl: controle negativo, células PC-3 cultivadas por 48h com o diluente (RPMI 1640/DMSO 99:1); Doxo: doxorubicina 20 $\mu$ g/mL tratadas por 6, 12, 24 e 48h; Ca5: chalcona isolada 20 $\mu$ g/mL tratadas por 6, 12, 24 e 48h. 71

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Substâncias identificadas no extrato etanólico das folhas de *Campomanesia adamantium* (CAE), frações acetato de etila (CAEA), butanólico (CAEB) e rica em antioxidantes raspada da CCD (FRA). 43
- Tabela 2. Conteúdo fenólico e capacidade antioxidante (determinada pelos ensaios DPPH e ORAC<sub>FL</sub>) do extrato bruto em etanol das folhas de *Campomanesia adamantium* (CAE) e de suas frações acetato de etila (CAEA) e butanólica (CAEB) e avaliação da atividade antioxidante da chalcona isolada (Ca5). 51
- Tabela 3. Valores de concentração que leva a inibição de crescimento total (TGI) em  $\mu\text{g/mL}$  do extrato bruto etanólico (CAE), frações acetato de etila (CAEA) e butanólica (CAEB), chalcona isolada (Ca5) e doxorubicina. 60

## RESUMO

*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae) é uma planta popularmente conhecida como gabioba ou guaviroba, cujos frutos são comestíveis. Suas folhas e cascas são usadas na medicina popular como antiinflamatórias, antidiarréicas, anti-sépticas das vias urinárias e para o tratamento da gripe. Como parte de um programa de bioprospecção que visa à descoberta de produtos naturais bioativos, o presente estudo teve por objetivo a prospecção de metabólitos secundários com atividade antioxidante e antiproliferativa acumulados no extrato etanólico das folhas de *C. adamantium*. Para tanto, adequou-se a metodologia para a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante (redução do radical DPPH e ORAC<sub>FL</sub>) e antiproliferativa, frente a linhagens de células tumorais humanas e procedeu-se o estudo fitoquímico, buscando-se a identificação dos constituintes majoritários ativos. Inicialmente obteve-se o perfil dos extratos ativos (HPLC-DAD e ESI-MS), identificando algumas substâncias conhecidas diretamente no extrato bruto e frações (desrepliação). Os extratos ativos foram submetidos ao fracionamento guiado pela atividade antioxidante e antiproliferativa e para a substância isolada e purificada realizou-se a elucidação estrutural utilizando-se métodos espectroscópicos de análise (RMN (1D e 2D) e espectrometria de massas). Ainda, buscou-se avaliar se a substância purificada induz a morte celular por apoptose frente à linhagem de célula de câncer de próstata (PC-3) com análise de expressão do RNAm por PCR semiquantitativo do genes *BAX* e *BCI-2* e a fragmentação do DNA por citometria de fluxo. Com base nos resultados sugere-se que: (1) o extrato bruto etanólico das folhas de *C. adamantium* e suas frações butanólica e acetato de etila apresentaram atividade antiproliferativa frente a linhagens tumorais humanas; (2) o extrato bruto etanólico das folhas de *C. adamantium* e suas frações butanólica e acetato de etila apresentaram atividade antioxidante tanto pelo método indireto DPPH (baseado em mecanismos de transferência de elétrons), quanto pelo ensaio ORAC<sub>FL</sub> (método direto, cinético, baseado em mecanismos de transferência de hidrogênio). A atividade antioxidante destas amostras pode ser relacionada com o alto teor de substâncias fenólicas

totais solúveis estimado pelo método colorimétrico Folin Ciocalteu; (3) análises empregando HPLC-DAD e ESI-MS e MS-MS dos extratos e frações com atividade antioxidante sugeriram a presença dos flavonóides isoquercitrina (Ca1), quercitrina (Ca2), miricetina (Ca3), quercetina (Ca4) e das chalconas 2',4'-diidroxí-6'-metoxichalcona (Ca5), 2',4'-diidroxí-5'-metil-6'-metoxichalcona (Ca6) e 2',4'-diidroxí-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona (Ca7); (4) o estudo fitoquímico da fração acetato de etila levou ao isolamento e identificação da chalcona Ca5, que apresentou promissora atividade antiproliferativa frente a algumas das linhagens de células tumorais humanas estudadas; (5) as análises de expressão dos genes *BAX* e *BCI-2* não apresentaram alterações significativas em relação às células controles que indicassem indução de apoptose. Porém, com a análise por citometria de fluxo da fragmentação do DNA pode-se observar que as células que foram tratadas com a chalcona isolada (Ca5) tiveram um aumento significativo da fragmentação, indicando indução do processo apoptótico. Assim, procedeu-se o estudo com *C. adamantium* para a busca de compostos com atividade antioxidante e antiproliferativa de origem vegetal, o que pode vir a contribuir para a quimioprevenção de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (doenças degenerativas, câncer, cardiovasculares, inflamatórias) e para obter novas fontes de insumos farmacêuticos.

## SUMMARY

*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae) is a plant popularly known as gabiroba or guaviroba, whose fruits are edible. Its leaves and bark are used in folk medicine as anti-inflammatory, antidiarrheal, antiseptic of the urinary tract and treatment of flu. As part of a bioprospecting program aimed at the discovery of bioactive natural products, this study aims at prospecting with phyto-derived antioxidant and antiproliferative activity accumulated in the ethanol extract from leaves of *C. adamantium*. To this end, it has adapted methods for *in vitro* evaluation of antioxidant activity (DPPH radical reduction and ORAC<sub>FL</sub> assays) and antiproliferative activity against human tumor cell lines and proceeded to the phytochemical study, seeking to identify the major constituents active. Initially, we obtained the profile of the active extracts (HPLC-DAD and ESI-MS), identifying some known substances directly into the crude extract and fractions (dereplication). The active extracts were subjected to fractionation guided by the antioxidant and antiproliferative activities and the compound isolated and purified held structural elucidation using spectroscopic analysis (NMR (1D and 2D) and mass spectrometry). Still, we sought to assess whether the purified substance induces cell death by apoptosis front of the cell line of prostate cancer (PC-3) with analysis of mRNA expression by semiquantitative PCR of the genes *BAX* and *BCL-2* and DNA fragmentation by flow cytometry. The results suggest that: (1) the crude ethanol extract of leaves of *C. adamantium* and its fractions in butanol and ethyl acetate showed antiproliferative activity against human tumor lines; (2) the crude ethanol extract of leaves of *C. adamantium* and its fractions butanol and ethyl acetate showed antioxidant activity proved both by DPPH method (based on mechanisms of electron transfer), and by the ORAC<sub>FL</sub> assay (kinetic method based on mechanisms of hydrogen transfer). The antioxidant activity of these samples may be related to the high content of total soluble phenolic substances estimated by the Folin Ciocalteu colorimetric assay; (3) analysis employing HPLC-DAD, ESI-MS and MS-MS of extracts and fractions with antioxidant activity suggested the presence of flavonoids isoquercitrin (Ca1), quercitrin (Ca2), myricetin (Ca3), quercetin (Ca4) chalcones and 2', 4'-dihydroxy-

6'-metoxichalcona (Ca5), 2', 4'-dihydroxy-5'-methyl-6'-metoxichalcona (Ca6) and 2', 4'-dihydroxy-3', 5'-dimethyl-6'-metoxichalcona (Ca7); (4) the phytochemical study of ethyl acetate fraction led to the isolation and identification of the chalcone Ca5 which showed promising antiproliferative activity against some human tumor cell lines studied; (5) analysis of gene expression of *BAX* and *BCL-2* showed no changes, but DNA fragmentation can be observed apoptosis in cells that were treated with chalcone Ca5. Thus, we proceeded the study of *C. adamantium* to search of natural products with antioxidant and antiproliferative activities, to contribute to the chemoprevention of diseases related to oxidative stress (degenerative diseases, cancer, cardiovascular, inflammatory) and to obtain new sources of pharmaceutical products.

## 1. INTRODUÇÃO

As substâncias orgânicas obtidas de fontes naturais são utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades há muitos anos. Existem relatos, por exemplo, do uso de plantas com finalidades terapêuticas desde 3.000 a.C., na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung (Tyler, 1996; Ko, 1999). Nos dias atuais, muitos medicamentos usados na terapia de inúmeras doenças são derivados direta ou indiretamente de vegetais, micro-organismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres (Newman *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 2006). Estudos demonstram que medicamentos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87% das enfermidades humanas, com atividades tais como antibacteriana, anticoagulante, imunossupressora e anticancerígena (Newman *et al.*, 2003).

Entre os anos de 1981 e 2002, 28% dos medicamentos disponibilizados no mercado possuíam princípios ativos isolados de produtos naturais ou produtos de semi-síntese e 24% eram fármacos sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de produtos naturais (Newman *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 2003). Na classe dos medicamentos anticancerígenos, um terço do mercado em 2002 foi representado por apenas dois grupos de quimioterápicos derivados de produtos naturais, os taxanos e os derivados da camptotecina (Thayer *et al.*, 2003; Oberlis & Kroll, 2004; Chin *et al.*, 2006).

### 1.1. Metabolismo secundário vegetal

Metabolismo é o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo no organismo. Essas reações visam, primariamente, ao aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais das células (Simões & Guerra, 2004). Nas células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário, em que o metabolismo primário é o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese e a respiração. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios, carboidratos e da clorofila (Taiz & Zeiger, 2004).

Por outro lado, os vegetais e os micro-organismos possuem um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) que é capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias que não são diretamente responsáveis pela manutenção da vida do organismo. Assim, são encontradas substâncias cuja produção e o acúmulo estão restritos a um número limitado de organismos especiais. As reações bioquímicas e as rotas metabólicas são específicas, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (Wink, 1990). Essa parte do metabolismo costuma ser definida como metabolismo secundário, cujos produtos garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema (Simões & Guerra, 2004). Exemplos de vantagens conferidas por estes metabólitos são: a ação contra a herbivoria, o ataque de patógenos e competição entre plantas e a atração de organismos benéficos, tais como polinizadores, dispersores de semente e de micro-organismos simbiotes. Ainda, muitos metabólitos secundários possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à luz ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (Taiz & Zeiger, 2004). Assim, como os metabólitos secundários exercem papel importante na interação entre a planta e o ambiente, sua biossíntese pode ser alterada pelo ritmo circadiano, desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, UV, macro e micronutrientes, altitude, poluição atmosférica, estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Em plantas medicinais, outros fatores como condições de coleta, estabilização e estocagem também podem influenciar o teor destas substâncias ativas (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Nas plantas, há três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos são derivados do isopreno, produzidos a partir do ácido mevalônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou do ácido mevalônico. Já os alcalóides são derivados de aminoácidos, tais como os aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), derivados do ácido chiquímico, ou podem ter sua biossíntese mediada por aminoácidos alifáticos (Taiz & Zeiger, 2004).

Algumas substâncias fenólicas, tais como os flavonóides, são formados pela combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste (biossíntese mista). Possuem pelo menos um anel aromático, no qual um ou mais átomos de hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila São responsáveis pela proteção das plantas contra o UV, insetos, fungos, vírus e bactérias. A proteção contra a fotodestruição proporcionada por esses compostos é devida às suas propriedades de absorver e dissipar a energia solar. (Taiz & Zeiger, 2004; Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Simões & Guerra, 2004).

Flavonóides são uma importante classe de compostos fenólicos formados a partir de um esqueleto básico com 15 carbonos (C<sub>15</sub>) e combinações de vários grupos substituintes, como hidroxilas e metoxilas, podendo ocorrer na forma aglicona ou de heterosídeos (Hodek *et al.*, 2002). As chalconas são o primeiro grupo formado na rota biossintética dos flavonóides, servindo como substrato para a síntese de flavonas, flavononas, flavonóis, antocianinas e isoflavonas (Simões *et al.*, 2004).

Os flavonóides apresentam atividades biológicas como atividade ansiolítica, antiinflamatória, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, antioxidante e antitumoral (Manthey & Grohmann, 2001; Fournet & Muñoz, 2002; Marder & Paladini, 2002; Cárdenas *et al.*, 2006). Uma atividade bastante estudada de algumas classes de flavonóides é o seu efeito potencial na quimioprevenção do câncer (Canivenc-Lavier *et al.*, 1996; Shih *et al.*, 2000).

## **1.2. Plantas medicinais e pesquisa de novos fármacos**

As plantas têm sido utilizadas pela humanidade devido seus efeitos terapêuticos desde tempos remotos, sendo usadas popularmente contra doenças infecciosas a parasitárias, problemas crônico-degenerativos e para o emagrecimento, regulação da menstruação, procedimento abortivo, além de serem empregadas também como antídoto ao veneno de cobra (Garcia, 1995).

Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (Baker *et al.*, 2007).

Com a descoberta de substâncias oriundas de micro-organismos que eram capazes de promover a cura de infecções graves no século XX, os produtos vegetais perderam destaque na área terapêutica. Nesta época, houve uma revolução na terapêutica que induziu o desenvolvimento de pesquisas, na indústria química-farmacêutica, com o objetivo de sintetizar novas substâncias ativas com baixa toxicidade (Tavares, 1996). A obtenção de novos fármacos, a partir de substâncias totalmente sintéticas, não foi mantida por muito tempo devido aos altos custos das pesquisas e inviabilidade de síntese química de algumas moléculas com inúmeros centros estereogênicos e estruturas complexas. Associado a este fato, estudos demonstraram que medicamentos originados de plantas medicinais poderiam ser desenvolvidos em menor tempo, com custos inferiores aos obtidos sinteticamente e podendo minimizar a ocorrência de efeitos adversos (Ferreira, 2001).

Assim, nos dias atuais, com diversas estratégias e métodos disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais aparece como uma alternativa promissora. Nas últimas décadas, as pesquisas com plantas geraram diversos produtos químicos com atividades farmacológicas importantes tais como os antineoplásicos: vincristina e vimblastina, ambas isoladas da vinca (*Catharanthus roseus*); os derivados da podofilotoxina, oriundos de rizomas de *Podophyllum peltatum* e *P. hexandrum*; os derivados da camptotecina, obtidos da *Camptotheca acuminata*; o taxol e o docetaxol extraídos de *Taxus brevifolia* e *T. baccata*, dentre outros (Cordell *et al.* 1991; Santos & Elizabestky, 1999; Simões & Guerra, 2004).

O Brasil, por deter uma enorme diversidade biológica e uma rica flora, desperta o interesse de comunidades científicas internacionais para o estudo, conservação e utilização racional destes recursos (Garcia, 1995). O bioma Cerrado contém mais de 6.000 plantas vasculares (Mendonça *et al.*, 1998), muitas com valor alimentício e medicinal (Almeida *et al.* 1998). Estima-se que menos de 1% das

plantas tropicais tiveram seus usos potenciais corretamente investigados (Garcia, 1995). Assim, a preservação do Cerrado é fundamental, tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica, como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (Barreiro & Fraga, 1999).

### **1.3. Família Myrtaceae e o gênero *Campomanesia***

A família Myrtaceae compreende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos que se distribuem por todos os continentes, à exceção da Antártica, mas com nítida predominância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Barroso, 1991; Marchiori & Sobral, 1997). Todas as espécies de Myrtaceae brasileiras estão incluídas na Tribo Myrteae *sensu* (Wilson *et al.*, 2005), com ocorrência de aproximadamente 1.000 espécies (Landrum & Kawasaki, 1997). No Brasil destacam-se os gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Calypttranthes*, com mais de uma centena de espécies, enquanto o restante dos gêneros possui menos de 60 espécies (Barroso & Perón 1994, Landrum & Kawasaki, 1997).

Em estudos com espécies da família Myrtaceae foram encontradas substâncias com atividade antiinflamatória relevante, efeito relacionado à presença de sesquiterpenos (Menezes-de-Lima Jr. *et al.*, 1997). Muitas espécies são empregadas em distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas. As partes mais usadas são as folhas e cascas, além dos frutos, comumente consumidos na alimentação (Cruz *et al.*, 2004).

*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg é uma espécie frutífera nativa do Brasil, com ocorrência abundante em campos de Cerrado no Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país e, em alguns casos, chegando a ultrapassar e alcançar as terras do Uruguai, Argentina e Paraguai (Lorenzi, 1992). Floresce entre os meses de setembro a novembro, com flores brancas, solitárias, axilares ou terminais. A planta desenvolve-se de forma arbustiva, atingindo até dois metros de altura, sendo muito ramificada e com ramos delgados. Suas folhas são simples, opostas, ovais ou elípticas, membranáceas

ou cartáceas, com base aguda à obtusa, apresentando ápice agudo com cerca de 4 cm de comprimento e 2 cm de largura (Durigan *et al.*, 2004).

Os estudos fitoquímicos sobre o gênero *Campomanesia* são recentes. A investigação química das sementes de *C. lineatifolia* levou ao isolamento e identificação de  $\beta$ -tricetona (Bonilla *et al.*, 2005). Os óleos essenciais das folhas de *C. guazumifolia*, *C. rhombea* e *C. xanthocarpa* constituem a principal fonte de estudos destes compostos (Limberger *et al.*, 2001). Em análises das folhas de algumas espécies de *Campomanesia*, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foram identificados flavonóides como a miricetina-3-O-rhamnoglucosídeo e miricetrina em *C. guazumifolia*, mirecetrina em *C. pubescens*. Já em *C. xanthocarpa* foram identificados os flavonóides miricetrina e rutina (Schmeda-Hirschmann, 1995).

Em estudos iniciais, os extratos de frutos de *C. adamantium* coletados no Centro-Oeste do Brasil (Mato Grosso do Sul) foram avaliados frente ao micro-organismo *Mycobacterium tuberculosis* e o extrato acetato de etila e frações apresentaram promissora atividade antibacteriana (Pavan *et al.*, 2009). Coutinho *et al.* (2008), analisaram a ação antioxidante dos extratos das folhas de *C. adamantium* pelo método do DPPH e os extratos apresentaram atividade antioxidante. Os autores também conseguiram isolar cinco flavanonas (7-hidroxi-5-metoxi flavanona; 7-hidroxi-5-metoxi-6-metil flavanona; 5,7-diidroxi-6-metil flavanona; 5,7-diidroxi-8-metil flavanona e 5,7-diidroxi-6,8-dimetil flavanona) e quatro chalconas (2',4'-diidroxi-6'-metoxi-chalcona; 2',4'-diidroxi-6'-metoxi-5'-metil chalcona; 2',4'-diidroxi,6'-metoxi-3'-metil chalcona e 2',4'-diidroxi-6'-metoxi-3',5'-dimetil chalcona) do extrato alcoólico das folhas desta espécie, porém estas substâncias não apresentaram atividade antioxidante pelo método DPPH, incentivando a realização de novos estudos que empreguem outros ensaios antioxidantes (métodos diretos e indiretos), visando identificar os constituintes majoritários dos extratos ativos que estejam relacionados com a atividade antioxidante de *C. adamantium* coletada em Curitiba- PR, já que alterações no clima e solo podem alterar a biossíntese dos metabólitos secundários (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). A atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato de *C. adamantium* é uma

abordagem inédita. Assim, estes fatos incentivaram o estudo proposto para a busca de antioxidantes e agentes antiproliferativos nesta espécie vegetal.

#### **1.4. Atividade antioxidante**

Os radicais livres são espécies altamente reativas, sendo normalmente produzidas pelos organismos ao longo dos processos oxidativos, como a respiração (Marroni, 2002). Quando em excesso, espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), ânion radical superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ) e hidroperoxila ( $\text{ROO}\bullet$ ), podem causar danos ao DNA ou oxidar lipídios e proteínas. Os radicais livres reagem com as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, subtraindo um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio, originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de muitas moléculas de ácidos graxos (Haslam, 1996; Valko *et al.*, 2004). Os hidroperóxidos formados na peroxidação lipídica têm vida curta e, quando reagem com metais, formam aldeídos (isto é, malonaldeído, acroleína, crotonaldeído) e epóxidos, os quais são reativos e causam novos danos ao DNA (Valko *et al.*, 2004).

Portanto, quando a produção de radicais livres supera a capacidade de inativação, estes podem reagir com proteínas, lipídios e DNA, levando ao dano estrutural e/ou funcional nas enzimas, células e material genético (Barreiros *et al.*, 2006). Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes, podem ocorrer lesões oxidativas de caráter acumulativo, levando a patologias, como o câncer, doenças vasculares, doença de Alzheimer e de Parkinson, e doenças inflamatórias e imunológicas, como artrite, alergia, asma. Outras doenças relacionadas com o processo de envelhecimento também apresentam, em ao menos parte de sua etiologia, os efeitos danosos da produção de radicais livres (Wu *et al.*, 2004).

Entretanto, nos sistemas vivos existe uma variedade de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas que controlam a formação excessiva das EROs. Dentre as defesas enzimáticas, encontram-

se as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), enquanto que compostos como a glutationa reduzida (GSH) e o ascorbato (ASC) fazem parte do sistema de defesa não enzimático celular (Meagher & Fitzgerald, 2000; Peng *et al.*, 2000; Alscher *et al.*, 2002). A defesa antioxidante também pode ser proveniente da dieta alimentar, como os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides (Haslam, 1996; Valko *et al.*, 2004).

De forma geral, denominam-se antioxidantes substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres, inibindo a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical e formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (Atoui *et al.*, 2005, Valko *et al.*, 2004).

Na conservação dos alimentos, a oxidação lipídica é um dos maiores problemas encontrados. Para evitá-los, utiliza-se seqüestradores de radicais livres, nos quais se destacam butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), tri-hidroxi-butil-fenona (THBP) e galato de propila (GP). Porém estudos demonstram que antioxidantes sintéticos não são totalmente inócuos à saúde. Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (Sousa *et al.*, 2007).

Portanto, pode-se afirmar que os antioxidantes isolados de plantas apresentam importância não só farmacológica como também para a indústria alimentícia, na conservação dos alimentos (Skerget *et al.*, 2005).

## **1.5. Câncer**

O termo *câncer* é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações (INCA, 2011). O tumor surge de uma

única célula mutada, que se multiplicou por mitoses consecutivas. Suas descendentes podem acumular outras mutações até originarem uma célula cancerosa, fazendo com que a incidência de tumores se caracterize pela proliferação celular anormal. Suas causas são variadas, podendo ser externas (radiações, vírus e xenobióticos) e internas (predisposição genética, desequilíbrio hormonal e deficiências do sistema imunológico) (Lopes *et al.*, 2002).

Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2011). O tratamento do câncer pode ser realizado por excisão cirúrgica, irradiação e quimioterapia, dependendo do tipo de tumor e do estágio de desenvolvimento da doença. A quimioterapia pode ser utilizada como terapia propriamente dita ou como adjuvante de outros tipos de tratamento (Rang *et al.*, 2001).

Segundo estimativas realizadas bianualmente, em 2010 foram esperados 236.240 novos casos para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. Estimou-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) foi o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil). Os tumores mais incidentes para o sexo masculino foram devidos ao câncer de pele não melanoma (53 mil casos novos), próstata (52 mil), pulmão (18 mil), estômago (14 mil) e cólon e reto (13 mil). Para o sexo feminino, destacaram-se os tumores de pele não melanoma (60 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (15 mil) e pulmão (10 mil) (INCA, 2011).

As principais classes dos fármacos usados na quimioterapia do câncer atualmente incluem os antimetabólitos, que inibem principalmente a síntese de purinas (mercaptopurina, tioguanina, entre outros); agentes que inibem a formação de desoxirribonucleotídeos (hidroxiuréia, fluoruracila); agentes que modificam o DNA por alquilação (cisplatina); agentes que interagem com a topoisomerase II

(bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, etoposídeo); e agentes inibidores da síntese do RNA ou de proteínas (actinomicina D, vincristina e vimblastina) (Rang *et al.*, 2001).

Entretanto, para todos os grupos de agentes antitumorais apresentados existe uma alta incidência de efeitos adversos associados à elevada toxicidade. Ainda, a eficácia da sua terapia contra o câncer pode ser comprometida pela resistência aos fármacos disponíveis (MDR = *multidrug resistance* ou resistência a multifármacos). A ocorrência da MDR é muito acentuada, o que obriga o clínico a optar por terapias de associação de dois ou mais fármacos (Jendiroba *et al.*, 2002). A MDR clássica caracteriza-se por alterações no gene MDR1 que codifica a glicoproteína P, canal responsável pela entrada e saída do fármaco na célula tumoral (Aggarwal *et al.*, 2006). Outros mecanismos importantes de MDR incluem alterações na expressão e/ou síntese de enzimas-alvo (Beck, 1990), ativação ou degradação alterada do fármaco (Morrow & Cowan, 1990), reparo aumentado do DNA (Hammond *et al.*, 1989) e falência dos processos de apoptose (Hannun, 1977; Liu *et al.*, 2001). Deve-se destacar que alguns desses mecanismos de resistência a fármacos podem coexistir, promovendo um alvo tumoral refratário ao tratamento por fármacos (Teodori *et al.*, 2002).

### **1.6. Morte celular: apoptose e necrose**

A necrose e apoptose são responsáveis por remover as células danificadas ou indesejadas. Danos reversíveis ou irreversíveis levam a apoptose ou necrose, dependendo do tempo e da intensidade do estresse submetido à célula (Cotran *et al.*, 2000). Agentes mais brandos ou mais diluídos, geralmente levam à apoptose, enquanto lesões intensas ou agentes mais concentrados desencadeiam à necrose (Green & Reed, 1998; Kroemer *et al.*, 1998; Lemasters *et al.*, 1998; Pedersen *et al.*, 1999).

A necrose acontece em situações de estresse violento, geralmente em situações patológicas, fenômeno este impossível de ser controlado genética ou farmacologicamente. É caracterizada pela presença de vacúolos no citoplasma, pela perda da integridade das membranas plasmáticas e das organelas, pelo aumento do volume celular e por indução de inflamação ao redor da célula, em

conseqüência da liberação do conteúdo celular e de moléculas inflamatórias. As células que morrem por necrose freqüentemente exibem mudanças na morfologia nuclear, mas não na organização da cromatina e na fragmentação do DNA (Edinger & Thompson, 2004; Okada & Mak, 2004). Ocorre autodestruição celular por ativação de hidrolases quando há falta de nutrientes, oxigênio e, conseqüentemente, desorganização progressiva e desintegração progressiva e completa da região acometida (Brasileiro Filho, 1998).

No processo apoptótico é observada a redução dramática do volume celular, acompanhada de dilatação do retículo endoplasmático e convoluções da membrana plasmática. A membrana plasmática não se rompe, prevenindo a liberação de componentes celulares para o meio extracelular (Kerr *et al.*, 1994). A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos (Ziegler & Groscurth, 2004). A membrana celular, em sua porção externa, passa a expor o fosfolípido fosfatidilserina, mantido normalmente em seu folheto interno (Desagher & Martinou, 2000), que serve como sinal para fagocitose da célula apoptótica por macrófagos e células adjacentes. Desse modo a reação inflamatória é minimizada ou ausente, evitando o comprometimento de estruturas sadias dos tecidos (Fraser & Evan, 1996; Green & Kroemer, 1998; Israels & Israels, 1999). Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis (Saraste & Pulkki, 2000).

Genes protetores ou promotores de apoptose foram estudados. A família das proteínas BCL-2 (“B-cell lymphoma protein 2”) controla a via mitocondrial da apoptose. Algumas proteínas, membros desta família, constituem um grupo que exerce funções opostas. Algumas atuam como proteínas anti-

apoptóticas e protegem a célula da morte (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1 etc), outras proteínas pró-apoptóticas levam a célula a apoptose (BAX, BAK, BAD, BID, etc). Essas proteínas participam dos sinais de sobrevivência ou morte celular, em função da supressão ou promoção de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, controlando, assim, a liberação do citocromo c e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (Ghobrial *et al.*, 2005).

Os estímulos a apoptose ativam a via de ação das caspases (“cysteinil aspartate specific proteases”), grupo de enzimas proteolíticas sintetizadas na forma de pró-enzimas inativas (Murphy *et al.*, 2003). Existem duas vias principais que levam à ativação das caspases: a via extrínseca, ou via citoplasmática, e a via intrínseca, ou mitocondrial.

A via extrínseca é desencadeada por um dos membros da superfamília de receptores de necrose tumoral (TNF), que quando estimulados, associam-se, através de proteínas adaptadoras como a FADD, à caspase-8 e/ou à caspase-10, ativando-as e acionando as caspases executoras ou gerando sinais para a via intrínseca (Kiechle & Zhang, 2002; Amarante-Mendes, 2003; Riedl & Shi, 2004).

A via intrínseca ou mitocondrial é iniciada por sinais de estresse provenientes do interior da célula, detectados pelas mitocôndrias, responsáveis por decidir se a célula entrará em processo de morte ou não. Caso isso ocorra, as mitocôndrias sofrem um desacoplamento mitocondrial e liberam, para o citosol, o citocromo c, as proteínas SMAC/Diablo (segunda ativadora das caspases derivada da mitocôndria) e o AIF (fator indutor de apoptose). O citocromo c liberado liga-se à APAF-1 (fator ativador de proteases – 1). Esse complexo, na presença de ATP, ativa a caspase-9, que ativará a caspase-3. Por outro lado, a SMAC inativa as IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), ativa a caspase-3 e culmina em apoptose. Ambas as vias convergem à via final comum envolvendo a ativação da cascata de proteases chamadas caspases que clivam as moléculas reguladoras e estruturais, culminando na morte celular. As vias são ligadas; portanto a distinção entre elas é simplista (Scaffidi *et al.*, 1998).

Proteínas como a p-53, chamadas de “guardiãs do genoma”, são acionadas com o objetivo de reparar os danos no DNA. Quando o dano excede os mecanismos de reparo, essa proteína induz a

célula à apoptose (Brown & Attardi, 2005). Mutações da p53 foram encontradas em pelo menos 50% dos carcinomas humanos e também são associadas com a resistência à quimioterapia (Donehower *et al.*, 1992).

### 3. OBJETIVOS

Como parte de um programa de prospecção de produtos naturais bioativos, este estudo teve por objetivo a prospecção de metabólitos secundários com atividade antioxidante e antiproliferativa acumulados no extrato etanólico das folhas de *C. adamantium*.

Os objetivos específicos foram:

- Realizar o estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *C. adamantium*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto, frações e substância isolada;
- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato bruto, frações e substância isolada frente a linhagens tumorais;
- Avaliar se o efeito de morte celular da substância purificada ativa frente à linhagem tumoral PC-3 ocorre por apoptose, pelas análises da expressão do RNAm dos genes *BAX* e *Bcl-2* e fragmentação do DNA por citometria de fluxo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta e identificação do material vegetal

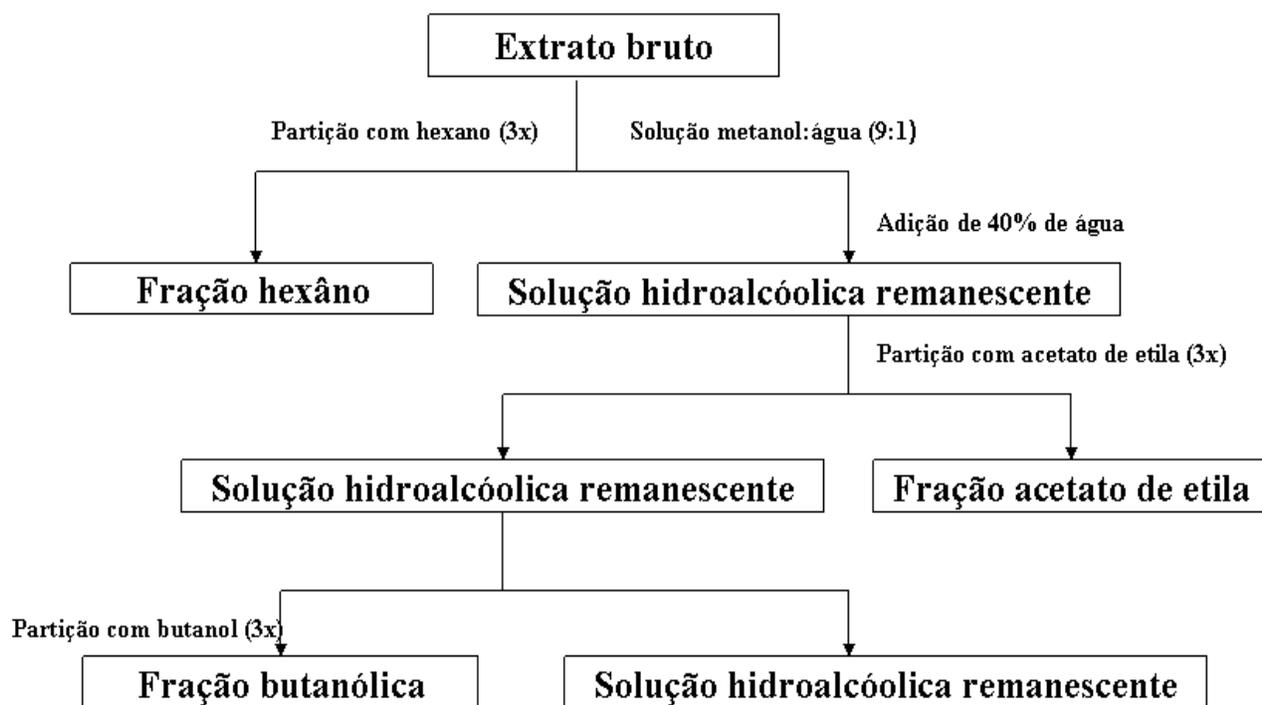
O material vegetal da espécie *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg foi coletado em seu hábitat natural em Curitiba (PR) pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Élide Alves Stefanello (Instituto de Química/Universidade Federal do Paraná - UFPR). A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Armando Carlos Cervi, da UFPR e uma exsicata do vegetal encontra-se depositada no Herbário da UFPR (UPCB 60503).

#### 3.2. Preparação do extrato bruto

O material vegetal (folhas) foi estabilizado e seco em estufa com ar circulante à temperatura de 40°C e posteriormente pulverizado. O pó foi submetido ao processo de maceração com etanol em uma proporção pó/solvente de 1:5 (m/v). O solvente das soluções obtidas foi removido sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato etanólico bruto das folhas.

#### 3.3. Fracionamento do extrato bruto

O extrato etanólico foi dissolvido em etanol-água na proporção 1:1 (v/v) e submetido à extração líquido-líquido com hexano, acetato de etila e butanol, como descrito por Salvador *et al.*, (2006) (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema do fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas de *Campomanesia adamantium* pela técnica da partição líquido-líquido, utilizando os solventes hexano, acetato de etila e butanol, separando classes de compostos conforme o incremento de polaridade.

### 3.4. Separação e análise de antioxidantes em cromatografia em camada delgada (TLC)

A amostra foi aplicada em placa de cromatografia em camada delgada (TLC) e eluída com butanol: ácido acético: água (BAW), sendo preparadas duas placas. Finalizada a corrida do cromatograma, uma das placas foi pulverizada com uma solução a 500 µg/mL de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) em etanol e após aproximadamente 5 minutos a atividade antioxidante foi verificada pelo aparecimento de mancha amarela sobre fundo violeta, conforme descrito por Cavin *et al.* (1998). As manchas com tempo de retenção equivalente ao das substâncias com atividade antioxidante segundo ensaio com DPPH foi raspada da cromatoplaça não revelada com o DPPH, dissolvida em metanol, filtrada, obtendo-se uma amostra denominada “fração rica em antioxidantes” (FRA), que posteriormente foi analisada por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS).

### 3.5. Análise do perfil químico por HPLC-DAD e ESI-MS

O extrato bruto etanólico das folhas de *C. adamantium* e as frações obtidas foram diluídos em uma solução contendo 50% (v/v) de metanol grau cromatográfico e 50% (v/v) de uma solução de água deionizada e 0,5% de hidróxido de amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha). As análises ESI-MS foram realizadas por injeção direta no Espectrômetro de Massas Quadrupolar – Micromass da Waters, por eletrospray em modo negativo e as condições gerais foram: temperatura da fonte de 100°C, a tensão capilar de 3,0 kV e a tensão do cone de 30 V. Foi realizada por infusão direta com uma vazão de 10 µL/min. A análise estrutural de íons no espectro de massa de extrato e frações foram realizadas pela avaliação dos fragmentos gerados após a colisão com um gás inerte (ESI-MS/MS). Os íons com relação massa/carga ( $m/z$ ) de interesse foram selecionados e submetidos a colisões com argônio. A pressão do gás de colisão foi otimizado para a produção de fragmentação extensa do íon sob investigação. Os constituintes foram identificados por comparação de seus espectros de fragmentação ESI-MS/MS com espectro de amostras-padrão autênticas do banco de substâncias padrão do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia, Tecnologia Fitofarmacêutica e Bioensaios do IB-Unicamp (substâncias Ca1, Ca5, Ca6 e Ca7) e com dados da literatura (Tiberti *et al.*, 2007).

As análises por HPLC foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu SPD-proeminência (Shimadzu Corp, Nakagyoku, Kyoto, Japão) com detector de arranjo de diodos. As separações foram feitas em uma coluna LiChrospher RP-18e (250 mm de comprimento x 4 mm ID x 5µm, Merck (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel foi constituída de um gradiente linear combinando solvente A (acetonitrila) e solvente B (água / ácido acético, 99:1, v/v, pH 2,88) com 15% de A (15 minutos), 15-40% de A (5 minutos), 40-60% de A (5 minutos), 60-100% de A (5 minutos), 100-15% de A (5 minutos), 15% de A (5 minutos). As análises foram realizadas em triplicata, com um fluxo de 0,8 mL/min e um volume de injeção de 20 µL. O detector de arranjo de diodo (DAD) foi configurado

para leitura da absorvância entre 200 e 600 nm. Os cromatogramas foram monitorados a 254 e 330 nm. As amostras analisadas foram o extrato bruto, as frações acetato de etila e butanólica e amostra padrão de isoquercitrina a 1 mg/mL. O perfil químico foi comparado entre os extratos e a substância padrão, considerando-se o tempo de retenção e perfil do espectro UV, bem como procedendo-se análise dos extratos dopados e co-injetados com a amostra-padrão.

### **3.6. Isolamento do constituinte químico**

A fração acetato de etila da partição do extrato etanólico bruto foi submetida a uma coluna a vácuo (sílica-gel, 5 partes para 1 de material) e eluída com a seguinte fase móvel com incremento da polaridade do sistema solvente: hexano-acetato de etila 1:1, 1:2, 1:5; acetato de etila-diclorometano 5:1; acetato-metanol 8:2, 2:1, 1:5 e, finalmente, metanol puro. Foram recolhidas 47 frações de 15 mL cada. O maior rendimento foi obtido nas frações 6 a 9, eluídas com hexano-acetato 1:1. Essas frações foram submetidas a uma nova coluna de sílica e eluídas com diclorometano puro e diclorometano-metanol nas proporções 99,5:0,5, 99:1 e 98:2. As subfrações 12 a 20 foram purificadas por cromatografia em camada delgada preparativa (TLC) e eluídas com hexano-acetona 3:2, duas eluições.

### **3.7. Identificação do constituinte químico isolado**

A substância purificada foi identificada pela análise dos seus dados espectrais (RMN  $H^1$ , RMN  $C^{13}$ , HMQC e HMBC) e ESI-MS/MS) e comparação com informações da literatura (Itokawa *et al.*, 1981).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e Carbono, uni e bidimensionais foram obtidos em equipamento Bruker 250 pertencente à Central analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas com a amostra dissolvida em solvente deuterado (clorofórmio/acetona, proporção 1:2, v/v).

### 3.8. Ensaio para avaliação da atividade antioxidante

No monitoramento e avaliação da atividade antioxidante, foram utilizados os ensaios abaixo relacionados:

#### 3.8.1. Ensaio para avaliação da redução do radical DPPH

O radical DPPH é estável, de coloração púrpura, e quando reduzido, passa a ter coloração amarela. Neste ensaio, avaliou-se a capacidade das amostras-teste e amostra-padrão de reduzir o radical DPPH. Para tanto, 2,6 mg das amostras (extrato e frações acetato de etila e butanólica) foram dissolvidos em etanol (0,5 mL), obtendo-se uma solução estoque. Várias diluições foram preparadas (de 1,56 a 50 µg/mL) em etanol. Em uma placa de 96 poços, adicionou-se amostra (10 µL), 100 µL de tampão acetato, 100 µL de etanol e 50 µL de solução de DPPH (10 mg/mL). Decorridos 20 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 517 nm e a porcentagem de atividade anti-radical calculada (Cuendet *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2005). Como controle positivo, utilizou-se o flavonóide quercetina (de 1,56 a 50 µg/mL) e como controle negativo, o diluente. Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela equação:

$$\%AA = \{ [Abs_{amostra} - (Abs_{controle} - Abs_{branco})] \times 100 \} / Abs_{controle}$$

Onde  $Abs_{controle}$  é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH e  $Abs_{amostra}$  é a absorbância da mistura reacional mais DPPH adicionado à amostra (Sousa *et al.*, 2007). Assim, a concentração capaz de reduzir o radical em 50% foi calculada, utilizando o programa Origin 8.0.

#### 3.8.2. Ensaio ORAC<sub>FL</sub>

A capacidade antioxidante dos extratos, frações e substância isolada, foram mensuradas utilizando-se o *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC<sub>FL</sub>) com fluoresceína como sonda

fluorescente e 2,2'-Azobis (2-amidiopropane) dihydrochloride (AAPH) como fonte de radical livre. Os experimentos foram realizados em placas de microdiluição com 96 poços como descrito por Prior *et al* (2003) com modificações. Para tanto foram preparadas soluções estoques dos extratos e frações (50 mg/mL) em tampão fosfato/dimetil-sulfóxido (DMSO) (99:1) e diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão fosfato. O Trolox (substância de referência (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid - análogo da vitamina E) foi utilizado como padrão e analisado nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200  $\mu$ M. A leitura foi realizada utilizando-se filtro fluorescente (excitação a 485 nm e emissão a 528nm) em leitor de microplaca (Synergy-2) monitorando a cinética de reação a cada 2 min por um período de 70 min (temperatura a 37°C). Os resultados foram expressos como  $\mu$ mol de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato ou fração em base seca ( $\mu$ mol de TE/g). Para as substâncias isoladas a atividade antioxidante é expressa em termos de Trolox equivalente relativo (RTE).

### **3.9. Quantificação de compostos fenólicos solúveis totais - Ensaio com reagente de Folin-Ciocalteu (FCR)**

As amostras com atividade antioxidante (extrato e frações) foram analisadas quanto ao seu conteúdo de compostos fenólicos totais solúveis utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Piccinelli *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004). O reagente consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6<sup>+</sup>. Porém em presença de determinados agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (Ikawa *et al*, 2003; Naczki & Shahidi, 2004).

Para tanto, os extratos e frações foram solubilizados em etanol, sendo preparadas diluições em concentrações de 200  $\mu$ g/mL. Para a substância de referência (ácido gálico), elaborou-se curva analítica

na concentração de 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL. As absorvâncias das amostras e amostra-padrão foram medidos em espectrofotômetro a 730 nm e os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalentes (GAE) por grama de extrato ou fração em base seca (mg de GAE/g). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.10. Ensaio em cultura celular**

#### **3.10.1. Ensaio de citotoxicidade em cultura de células precursoras de fibroblastos de camundongos 3T3**

As células precursoras de fibroblastos 3T3 foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 5% de soro fetal bovino, com 0,1% de penicilina/estreptomicina em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram distribuídas em placas com 96 poços e cultivadas por 24 horas. As drogas-testes (extrato bruto e frações) foram aplicadas nas concentrações crescentes de 0,25 a 250 µg/mL. Após 48 horas, o meio foi retirado e aplicada a solução de *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, tetrazol (MTT)* (solução estoque de 0,3 mg/mL em meio não suplementado) e voltou-se a placa à estufa por 4 horas. Após esse período o meio de cultura foi retirado de cada poço e adicionou-se 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os sais de formazan gerados a partir da redução do MTT, procedendo-se à leitura das absorvâncias em 570 nm. Como controle negativo utilizou-se o diluente DMSO/RPMI-1640 (0,1%). Cada droga-teste foi analisada em triplicata. Foi calculada a porcentagem de células viáveis para cada amostra e concentração testada.

#### **3.10.2. Ensaio para avaliar atividade antiproliferativa frente a linhagens tumorais humanas**

As drogas testes (extrato, frações e substância isolada) foram avaliadas quanto a sua atividade antiproliferativa em painel de células tumorais humanas, com a inibição de crescimento calculada a partir da dosagem de proteínas, utilizando o ensaio da sulforrodamina B (SBR B). A SBR B é um

corante aniônico de coloração rosa brilhante, capaz de se ligar às terminações básicas de aminoácidos de células vivas, sendo assim, um ensaio independente do metabolismo celular (Skehan *et al.*, 1990). Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: melanoma (UACC-62); mama (MCF-7); ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES); rim (786-0); pulmão, tipo não pequenas células (NCI-H460); próstata (PC-3); ovário (OVCAR-3); cólon (HT-29); leucemia (K562).

As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, com 5% de soro fetal bovino a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram inoculados 100 µL de células em RPMI 1640/SFB 10%/gentamicina 50 µg/mL, em placas de 96 poços. Após 24 horas, as amostras foram adicionadas em concentrações crescentes de 0,25 a 250 µg/mL. Após 48 horas, as células foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 50% e a 4°C, sendo incubadas por 1 hora à mesma temperatura. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada e mantidas em temperatura ambiente até a secagem. A coloração foi então realizada pela adição de 50 µL de SBR B a 0,4%, dissolvido em ácido acético a 1%, durante um período de 30 minutos. As placas foram incubadas a 4°C, lavadas quatro vezes com ácido acético a 1% e secas novamente em temperatura ambiente. O corante foi solubilizado com solução de Trizma base (10 µM, pH 10,5) e a leitura espectrofotométrica realizada a 540 nm em um leitor de microplacas. Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico Doxorrubicina e como controle negativo, o diluente DMSO/RPMI-1640 (0,1%). Também foram analisados, em cada placa teste, um branco do meio de cultura (sem células), um branco da suspensão celular (controle do inóculo) e o branco das amostras teste. Cada droga-teste foi analisada em triplicata.

Calcularam-se as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e, através das fórmulas a seguir, foi determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra testada.

Se  $T > C$ , a droga estimulou o crescimento e não apresentou IC. Se  $T \geq T_0$  e  $< C$ , a droga foi citostática e a fórmula utilizada foi  $100 \times [(T-T^0)/(C-T^0)]$ .

Se  $T < T_0$ , a droga foi citocida e a fórmula utilizada foi  $100 \times [(T-T^0)/(T^0)]$

Onde T é a média da absorbância da célula tratada; C é o controle de célula sem adição de drogas depois das 48h; T<sup>0</sup> é o controle das células no dia da adição das drogas. O resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de crescimento. Com esses resultados, foram produzidos gráficos relacionando a concentração da amostra e seu efeito. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50%, preferencialmente apresentando seletividade para os tipos celulares.

Para comparar a potência das amostras e evidenciando a seletividade, calculou-se a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (TGI, *total growth inhibition*) para cada amostra testada em cada linhagem celular. Para esse cálculo, utilizou-se o programa Origin 8.0 para a construção da regressão sigmóide das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento.

### **3.10.3. Análise da expressão dos genes *BAX* e *BCL-2* em cultura de células PC-3**

### **3.10.4. Tratamento de células de PC-3 para análise de RNAm**

As células PC-3 foram incubadas em placas de 6 poços por 24 horas antes dos tratamentos, em estufa úmida, a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, na concentração de 1x10<sup>5</sup> células/mL. Após a adição das drogas-testes as células permaneceram em estufa úmida, a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 6, 12, 24 e 48 horas numa concentração final de 20 µg/mL da chalcona Ca5 isolada e doxorubicina, como controle negativo utilizou-se o diluente DMSO/RPMI-1640 (0,1%).

### **3.10.5. Extração e quantificação de ácidos ribonucléicos (RNA)**

O RNA total foi extraído da cultura de células PC-3 das amostras tratadas com as drogas-teste e controles utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) conforme recomendações do

fabricante. A seguir as amostras foram quantificadas espectrofotometricamente por UV (Gene Quant pro – Amersham Bioscience) (Sambrook & Russel, 2001).

### **3.10.6. Síntese de cDNA**

A análise da expressão dos RNAm dos genes BAX e BCL-2 foi realizada por transcrição reversa do RNAm seguida de PCR semiquantitativo. A síntese de cDNA necessária para os experimentos de PCR semiquantitativo foi realizada utilizando a enzima SuperScriptIII™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Califórnia, USA). Dois microgramas do RNA extraído foram incubados com 250ng de primers randômicos (Invitrogen, Califórnia, USA), 1µL de dNTP mix (10mM) e água para um volume de 14µL, a 65°C por 5 minutos, e então resfriado em gelo. A seguir foram adicionadas à reação: 4µL de 5x First-Strand Buffer, 1µL de DTT (0,1M) e 50U da enzima Superscript III RT, sendo a amostra incubada a 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

### **3.10.7. PCR semiquantitativo**

A reação de amplificação de fragmentos específicos de c-DNA foi feita pelo método do PCR. Foram utilizados primers humanos para β-Actina, BCL-2 e BAX. A reação de PCR consistiu em: tampão de PCR 10 vezes concentrado, MgCl<sub>2</sub> a 1,5mM, dNTP a 200µM, primers a 200nM, 2,5 µL da amostra de cDNA (concentração de 100ng/ml) e 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen).

Os primers utilizados para a PCR foram:

BAX Senso =5` GGTGATGGACGGGTCCG 3`;

BAX Antisenso =5` GGATGAAACCCTGAAGC 3`;

BCL2 Senso = 5' GGACAACATCGCCCTGTG 3`;

BCL2 Antisenso = 5' AGTCTTCAGAGACAGCCAGGA 3`.

β-actina Senso =5' GCACCACACCTTCTACA 3`;

β-actina Antisenso = 5'AGGAAGGCTGGAAGAGTG 3`.

A fase exponencial da PCR foi determinada pelas condições acima descritas, testando os ciclos 25, 30, 35 e 38. Como controle endógeno, para normalização dos dados, foi utilizado um gene de expressão constitutiva, a  $\beta$ -Actina.

Após a amplificação, seus produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com 17  $\mu$ L de SYBR Safe (Invitrogen, Califórnia, USA) e fotografados sob luz ultravioleta. A quantificação foi obtida por densitometria usando o software “UN-SCAN-IT gel” versão 6.1. A quantidade relativa de cada gene em cada amostra foi determinada pela razão: IOD gene específico/IOD  $\beta$ - Actina, onde IOD é densidade óptica específica.

### **3.10.8. Análise da fragmentação do DNA por citometria de fluxo de cultura de células PC-3**

Células PC-3 foram semeadas em placas com 6 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) e submetidas aos tratamentos com a chalcona Ca5 isolada (20  $\mu$ g/mL) e doxorrubicina (20  $\mu$ g/mL) por 6, 12, 24 e 48h. Como controle negativo foram utilizadas células tratados com o diluente RPMI/DMSO na proporção 95:5. Após estes procedimentos, as células foram removidas dos poços através do uso de *scraper*. A fragmentação de DNA foi avaliada utilizando citometria de fluxo de acordo com o método previamente descrito por Nicoletti-Carvalho *et al.* (2010). As células contidas em 1 mL de suspensão em tampão fosfato foram centrifugadas e o precipitado suspenso em 300  $\mu$ L de uma solução hipotônica de PI contendo iodeto de propídio (50  $\mu$ g/mL a 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100). Em seguida, as amostras foram incubadas *overnight* a 4°C e analisadas no citômetro do fluxo FACS Scalibur. Os histogramas das amostras foram analisados através do programa *Cell Quest Pro*.

### **3.11. Análise estatística**

Foi utilizado o teste estatístico ANOVA ( $p < 0,05$ ) seguido pelo teste de Tukey. Os resultados foram apresentados como média seguido de desvio padrão ou coeficiente de variação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando a busca de antioxidantes e agentes antiproliferativos em *C. adamantium*, procedeu-se o estudo que apresentou os seguintes resultados:

### 4.1. Estudo fitoquímico e identificação dos constituintes químicos

#### 4.1.1. Fracionamento do extrato bruto e análise do perfil químico por HPLC-DAD e ESI-MS

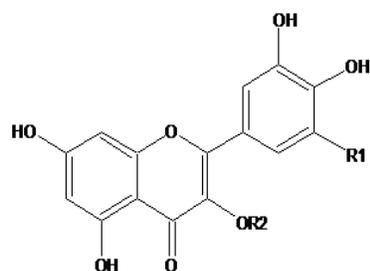
A técnica de caracterização do perfil de amostras por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS) conhecida como *fingerprinting* já foi empregada na análise de diversas matrizes complexas, tais como vinho, azeite, cerveja e extratos de origem natural (Moller *et al.*, 2007, Roesler *et al.*, 2007, Tiberti *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007) e também em estudos de desreplicação. Em geral, as moléculas de baixo peso molecular (<1.000 Da), contendo sítios ácidos ou básicos, têm espectros de massa simples produzidos por ESI, onde um único íon correspondente desprotonado (M-H)<sup>-</sup> ou protonado (M +H)<sup>+</sup> é detectado. Uma análise estrutural mais detalhada da composição química dos extratos pode ser obtida por comparação de amostras autênticas ou por espectrometria de massa MS/MS (Moller *et al.*, 2007, Roesler *et al.*, 2007, Tiberti *et al.*, 2007). Neste estudo, o extrato bruto e as frações acetato de etila, butanólica e da amostra FRA foram analisados por ESI-MS em modo negativo [ESI(-)-MS] (tabela 1 e figuras 2, 3 e 4). Nesta análise ficou evidenciado que as massas dos constituintes majoritários das amostras de folhas de *C. adamantium*, incluindo o extrato bruto etanólico e da amostra FRA, coincidiram com as massas das chalconas 2',4'-diidroxí-6'-metoxichalcona, 2',4'-diidroxí-5'-metil-6'-metoxichalcona e 2',4'-diidroxí-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona e com os flavonóides isoquercitrina, quercitrina, quercetina e miricetina. As chalconas (Ca3, Ca4 e Ca5) foram previamente descritas em *C. adamantium* coletadas na região Centro-Oeste (Coutinho *et al.*, 2008), enquanto alguns flavonóides glicosilados já foram identificados em algumas espécies de *Campomanesia* por Schmeda-Hirschmann (1995).

Para confirmar a presença do flavonóide isoquercitrina, foi realizada a análise por HPLC do padrão isoquercitrina e do extrato bruto etanólico. Observou-se a formação de um pico com tempo de retenção coincidente com o pico do padrão e com mesmo pico de absorção a 353 nm. Ainda, a identidade da isoquercitrina como principal constituinte também foi confirmada através da co-eluição com a amostra e o padrão autêntico (Figura 5). Este flavonóide pode ser um dos responsáveis pela atividade antioxidante do extrato das folhas de *C. adamantium*, uma vez que um íon com mesma massa também foi encontrada na fração FRA, amostra obtida de CCD, revelada com DPPH na placa cromatográfica.

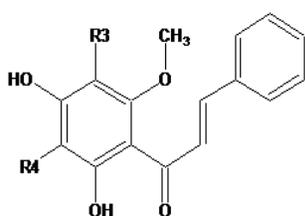
Os flavonóides isoquercitrina e mirecitina foram identificados pela primeira vez na espécie *C. adamantium*. Diferenças entre a composição e concentração de metabólitos secundários de espécies cultivadas em regiões diferentes podem ser justificadas pelo fato de que eles exercem papel importante na interação entre a planta e o ambiente e sua biossíntese pode ser alterada conforme as condições em que a planta é submetida, como alterações de temperatura, disponibilidade, água e tipo de solo (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

**Tabela 1.** Substâncias identificadas no extrato etanólico das folhas de *Campomanesia adamantium* (CAE), frações acetato de etila (CAEA), butanólico (CAEB) e rica em antioxidantes raspada da CCD (FRA).

Substâncias	Análises ESI-MS ( $m/z$ )				$[M-H]^-$ $m/z$	Fragmentos MS/MS $m/z$
	Amostras de <i>C. adamantium</i>					
	CAE	CAEA	CAEB	FRA		
<b>Ca1</b>	+	+	+	+	463	25 eV: 463→301, 255, 151
<b>Ca2</b>	+	+	-	+	447	25 eV: 447→301
<b>Ca3</b>	+	-	-	+	317	25 eV: 317→287
<b>Ca4</b>	+	+	+	-	301	25 eV: 301→271, 255
<b>Ca5</b>	+	+	-	+	269	25 eV: 269→253, 226, 198, 184, 177, 165, 150, 139, 122, 108, 97, 94, 65
<b>Ca6</b>	+	+	-	+	283	25 eV: 283→268, 240, 198, 179, 164, 136, 108, 79
<b>Ca7</b>	+	+	-	+	297	25 eV: 297→282, 254, 191, 178, 163, 150, 134, 122

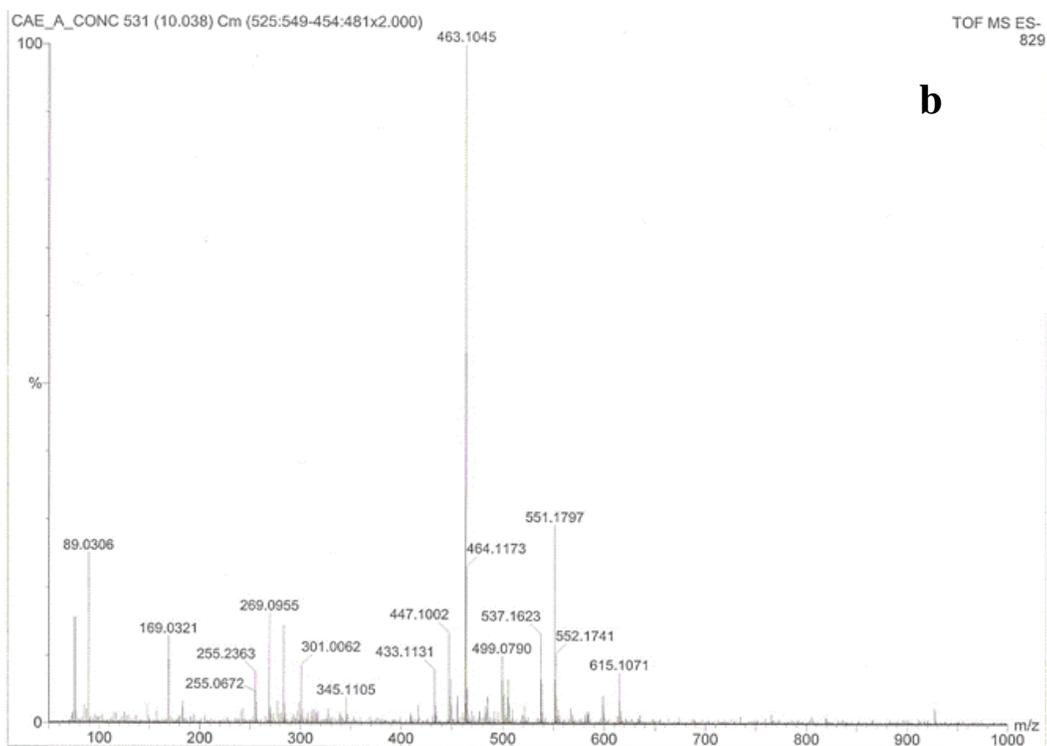
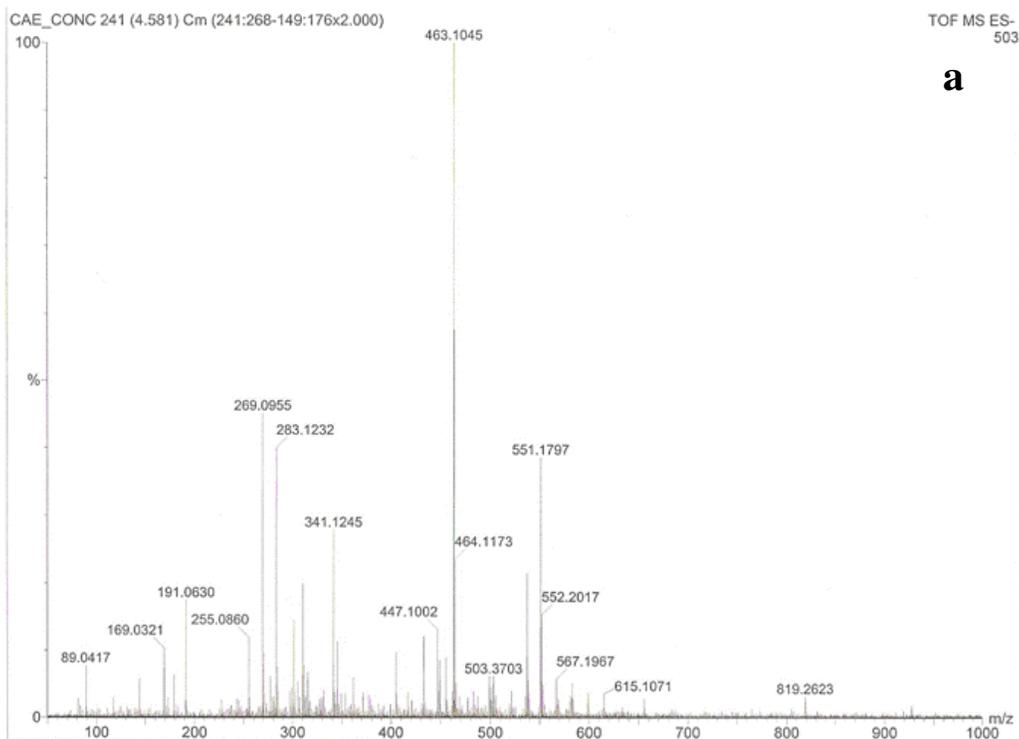


Ca1	Isoquercitrina	R1=H, R2=glucose
Ca2	Quercitrina	R1=H, R2=ramnose
Ca3	Miricetina	R1=OH, R2=H
Ca4	Quercetina	R1=R2=H

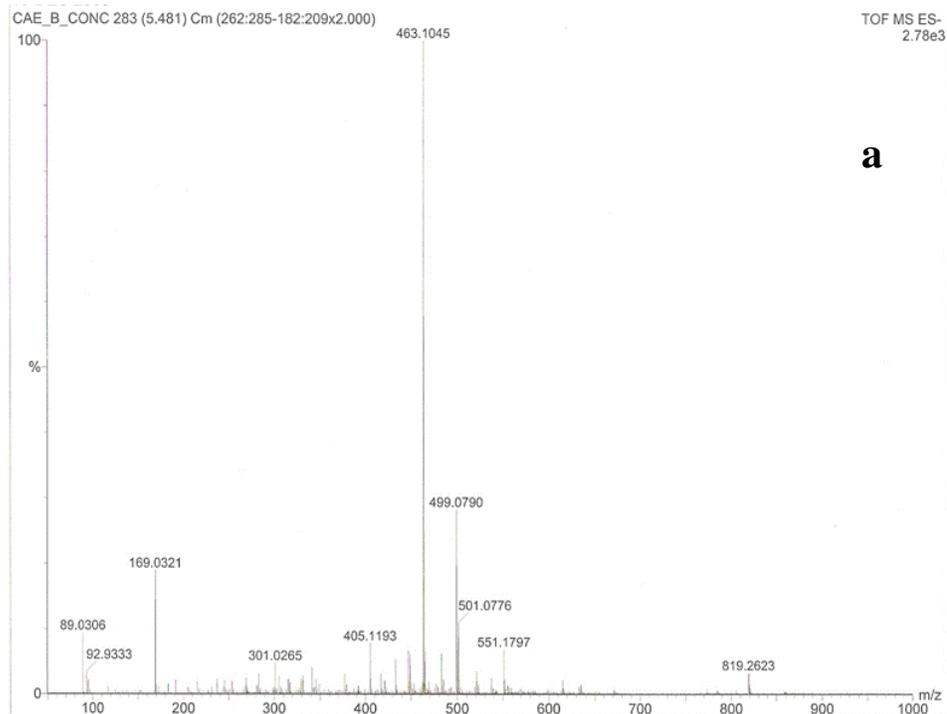


Ca5	2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona	R3=R4=H
Ca6	2',4'-dihidroxi-5'-metil-6'-metoxichalcona	R3=CH <sub>3</sub> , R4=H
Ca7	2',4'-dihidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona	R3=R4=CH <sub>3</sub>

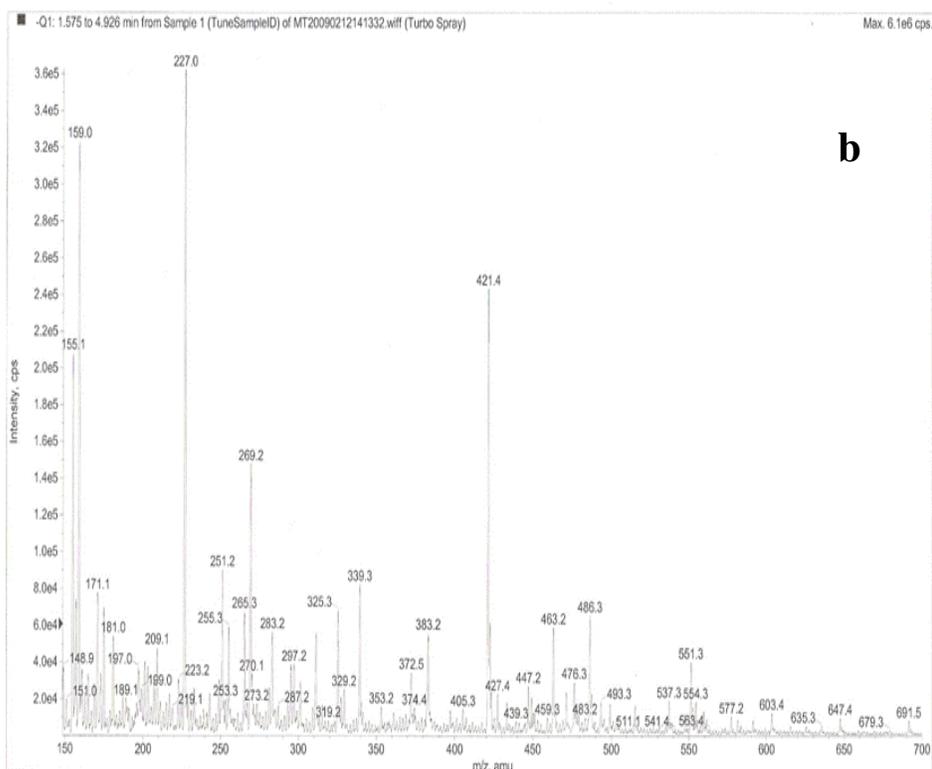
**Figura 2.** Estruturas das substâncias identificadas no extrato etanólico das folhas de *Campomanesia adamantium* e em suas frações. A substância Ca5 foi isolada e identificada da fração acetato de etila do extrato etanólico.



**Figura 3.** Espectro após injeção direta em modo negativo em espectrômetro de massas do extrato bruto das folhas (CAE) (a) e fração acetato de etila (CAEA) (b).

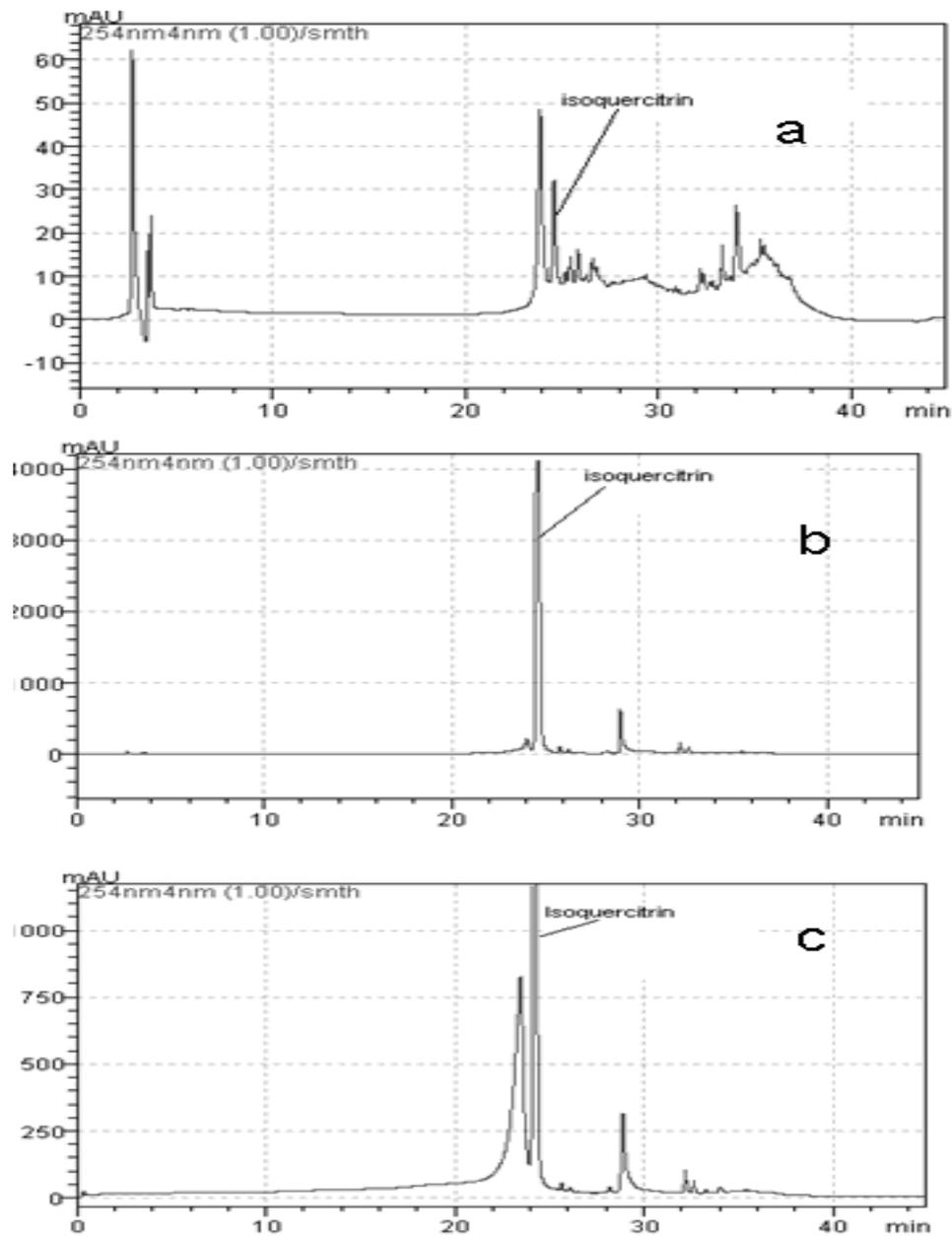


**a**

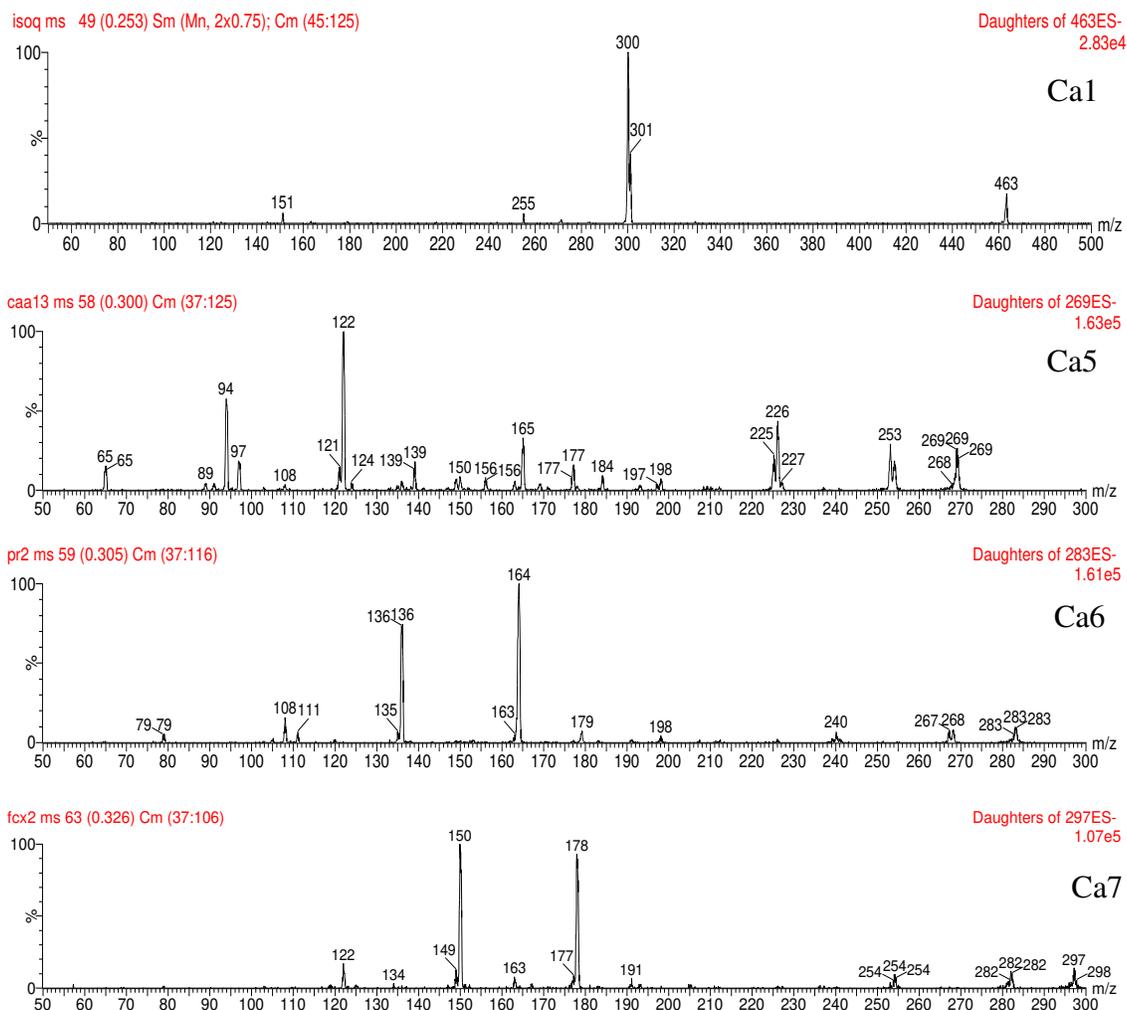


**b**

**Figura 4.** Espectro após injeção direta em modo negativo em espectrômetro de massas do extrato fração butanólica (CAEB) (a) e amostra “rica em antioxidantes” (FRA) (b).



**Figura 5.** Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) do extrato bruto das folhas de *Campomanesia adamantium* e do padrão de isoquercitrina 1mg/mL, (a) extrato etanólico; (b) padrão de isoquercitrina e (c) solução de extrato bruto acrescida de padrão de isoquercetrina.



**Figura 6.** Espectro ESI-MS-MS das substâncias padrão Ca1, Ca5, Ca6 e Ca7 detectadas no extrato etanólico das folhas de *Campomanesia adamantium* e suas frações.

#### 4.1.2. Isolamento e identificação de constituinte químico

A partir da fração acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *C. adamantium*, isolou-se e identificou-se a chalcona Ca5. Os dados espectrais da substância isolada são:

**2',4'-diidroxi-6'-metoxichalcona (Ca5):** RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$  mais acetona- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  (mult ( $J$  em Hz); H): 3,92 ( $s$ ; 3H, 6'- $\text{OCH}_3$ ), 5,97 ( $d$  (2,2); 1H, H-3'), 6,01 ( $d$  (2,2); 1H, H-5'), 7,41 ( $m$ ; 3H, H-3, H-4 e H-5), 7,61 ( $m$ ; 2H, H-2 e H-6), 7,75 ( $d$  (15,6); 1H, H- $\beta$ ), 7,91 ( $d$  (15,7); 1H, H- $\alpha$ ). RMN

de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$  mais acetona- $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 135,4 (C-1), 128,2 (C-2 e C-6), 128,7 (C-3 e C-5), 129,9 (C-4), 127,6 (C- $\alpha$ ), 141,9 (C- $\beta$ ), 192,5 (C=O), 105,8 (C-1', observado apenas através do HMBC), 163,2 (C-2'), 91,6 (C-3'), 164,9 (C-4'), 96,1 (C-5'), 163,2 (C-6'), 55,7 (6'-OCH $_3$ ). Fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^-$  269 uma. Todos os dados espectrais descritos (anexo 1) estão de acordo com os dados da literatura (Itokawa *et al.*, 1981).

#### 4.2. Atividade antioxidante

As atividades antioxidantes do extrato bruto etanólico e frações acetato de etila e butanólica foram determinadas pelos métodos de seqüestro de radicais livres por DPPH e por ORAC<sub>FL</sub>. Já o conteúdo de fenóis totais solúveis foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu.

DPPH é um radical livre com faixa de absorção entre 515 a 528 nm. O radical perde sua absorção quando recebe um elétron, resultando na mudança de coloração de púrpura para amarelo. Por este método ser simples e rápido, possibilitando análises de inúmeras amostras, é extensamente usado para análise inicial da atividade antioxidante de compostos ou de extrato de plantas (Zou *et al.*, 2004). No presente trabalho, a concentração que inibiu 50% do radical DPPH (IC<sub>50</sub>) esteve entre 7,77 e 13,35 de  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o extrato bruto e frações. Pelo método ORAC<sub>FL</sub>, os resultados obtidos variam de 2648 a 3502  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalentes/g de massa seca dos extratos e das frações. A chalcona isolada apresentou atividade antioxidante, com resultado de 0,96 Trolox equivalente relativo (RTE). Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método Folin-Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por massa de extrato bruto e da fração em base seca, são apresentados na Tabela 2. O extrato e frações das folhas apresentaram altos teores de compostos fenólicos quando comparados a dados de outras espécies descritas na literatura (Velioglu *et al.*, 1998, Kähkönen *et al.*, 1999). O menor teor de FT foi registrado na fração butanólica, já o maior teor, na fração acetato de etila.

Os resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método do DPPH foram confirmados pelo ORAC<sub>FI</sub> e podem ser relacionadas com o conteúdo de fenóis totais ( Sousa *et al.*, 2007).

O flavonóide isoquercitrina pode ser um dos responsáveis pela atividade antioxidante apresentada pelo extrato bruto, visto que o padrão deste composto apresentou uma atividade antioxidante de 5,21 Trolox equivalente relativo (Tabela 2). O potencial antioxidante da isoquercitrina já foi avaliado e descrito na literatura. Este composto foi capaz de anular o efeito negativo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre cultura de células RCC-5 (Jung *et al.*, 2010), assim como apresentou alta atividade antioxidante quando avaliado pelo método do DPPH (Olszewska & Michel, 2011). Estudos têm demonstrado que muitos flavonóides e outras substâncias fenólicas contribuem de maneira significativa para a atividade antioxidante de frutas e vegetais (Vinson *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2002).

**Tabela 2.** Conteúdo fenólico e capacidade antioxidante (determinada pelos ensaios DPPH e ORAC<sub>FL</sub>) do extrato bruto em etanol das folhas de *Campomanesia adamantium* (CAE) e de suas frações acetato de etila (CAEA) e butanólica (CAEB) e avaliação da atividade antioxidante da chalcona isolada (Ca5).

Amostra	Conteúdo fenólico mg GAE/g*	Ensaio DPPH, IC <sub>50</sub> µg/mL*	Ensaio ORAC <sub>FL</sub> µmol TE/g*	Ensaio ORAC <sub>FL</sub> RTE*
CAE	35,04 (5,48)	13,00 (5,03)	2648 (1,77)	-
CAEA	74,83 (10,77)	13,35 (16,85)	3150 (6,66)	-
CAEB	15,78 (15,29)	7,77 (5,00)	3502 (5,71)	-
Ca5	-	-	-	0,96 (1,57)
Quercetina	-	12,80 (2,00)	-	5,62 (0,89)
Isoquercitrina	-	-	-	5,21 (1,60)
Trolox	-	2,55 (1,40)	-	-

-: não avaliado.

\*os resultados são expressos como média seguido da % coeficiente de variação (CV) dos ensaios em triplicata.

mg GAE/g: fenóis totais expressos em termos de miligrama de ácido gálico equivalente por grama de extrato ou fração em base seca.

IC<sub>50</sub>: concentração que inibe 50% do radical DPPH em micrograma por mililitro (µg/mL).

µmol TE/g: micromol de Trolox equivalentes por grama de extrato ou fração em base seca.

RTE: Trolox equivalente relativo.

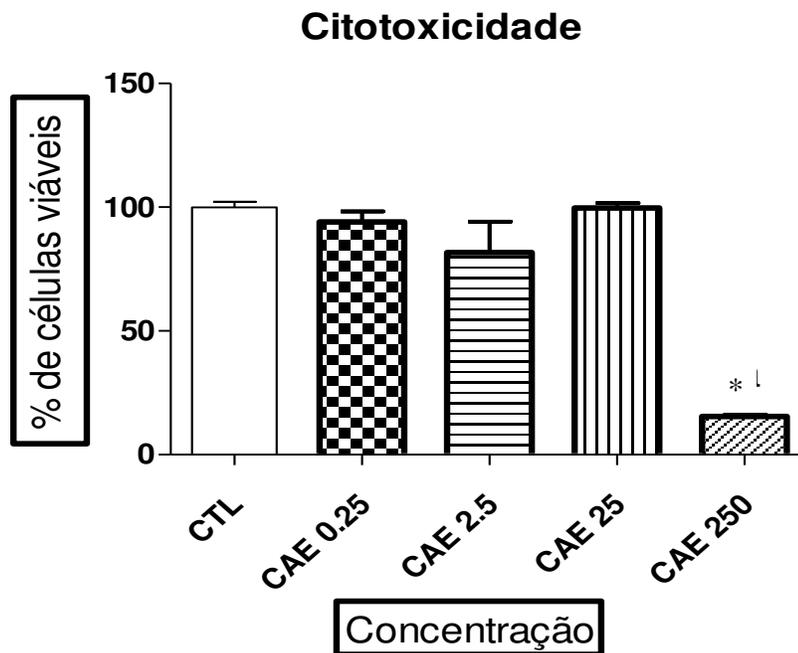
### 4.3. Ensaio em cultura celular

#### 4.3.1. Ensaio de citotoxicidade em cultura de células precursoras de fibroblastos de camundongo

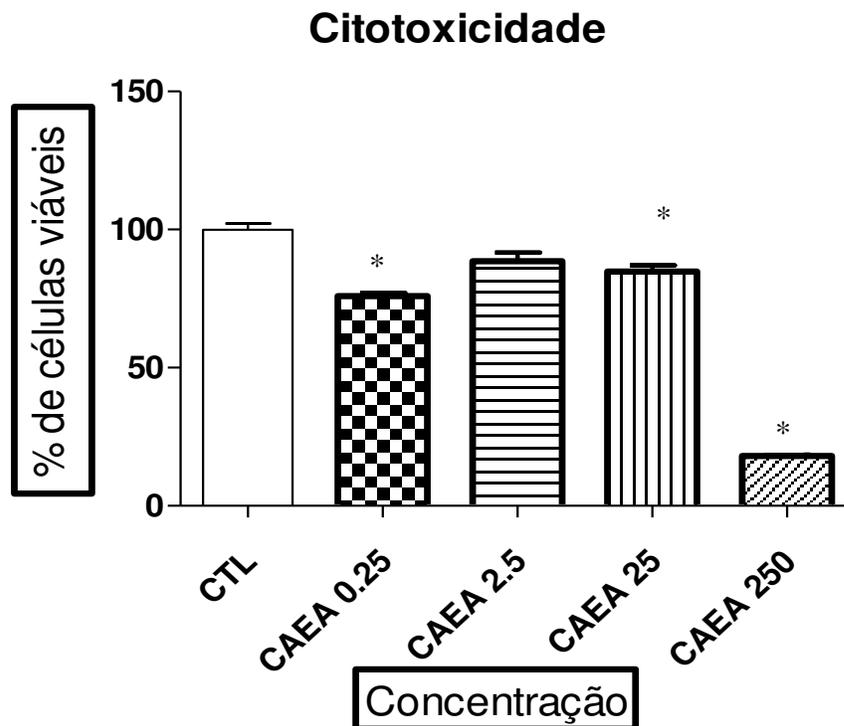
##### 3T3

Inicialmente o extrato bruto e frações foram avaliados quanto à citotoxicidade em células precursoras de fibroblastos - 3T3, pelo método do MTT, nas concentrações que posteriormente foram estudados em linhagens celulares cancerosas. Os quimioterápicos geralmente não tem efeito seletivo, isto é, atacam tanto células cancerosas quanto células normais, principalmente as que se dividem rapidamente, produzindo efeitos colaterais agressivos ou tóxicos (Bonassa, 1996).

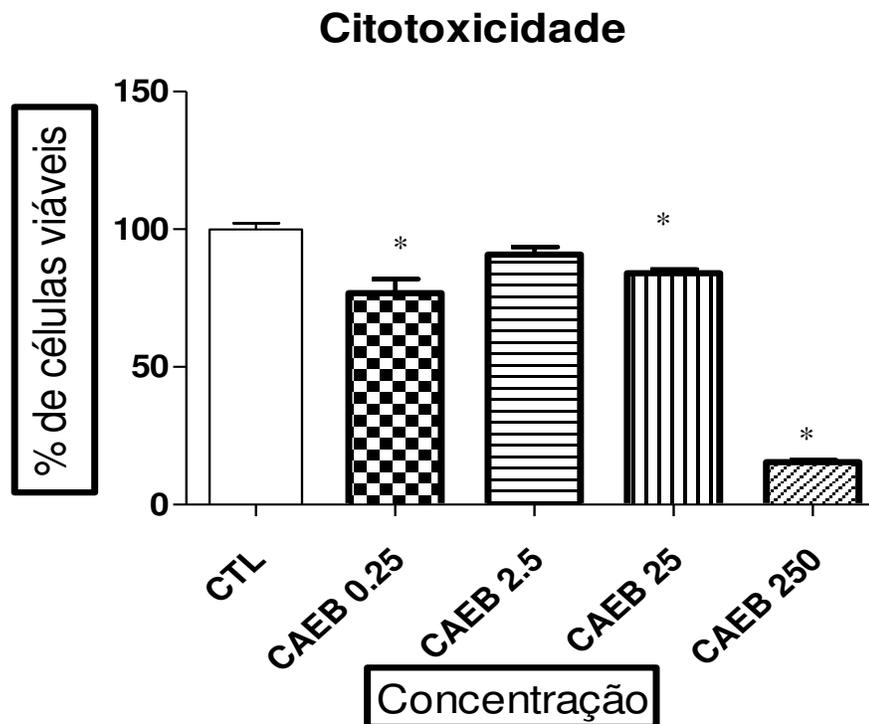
Portanto, na busca de novas substâncias com atividade antiproliferativa, é interessante a avaliação do perfil de toxicidade em células não cancerosas em estágios iniciais para que estudos sejam conduzidos no sentido de se buscar o desenvolvimento de agentes terapêuticos menos tóxicos que os disponíveis atualmente na terapia. Neste ensaio com células precursoras de fibroblastos-3T3, observou-se que apenas na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  o extrato bruto foi capaz de diminuir a viabilidade celular para 15,44% (CV= 0,08). Nas células tratadas com a fração acetato de etila nas concentrações de 0,25 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , a porcentagem de células 3T3 viáveis esteve entre 75,91 e 84,80, porém com 250  $\mu\text{g/mL}$  a porcentagem de células viáveis foi de 18,03 (CV= 0,05). Para células tratadas com a fração butanólica, com 250 $\mu\text{g/mL}$ , apenas 15,40% das células estavam viáveis. Nas concentrações inferiores a viabilidade celular esteve entre 80,99% e 90,87% (figuras 7 a 9).



**Figura 7.** Viabilidade celular de células 3T3, células cultivadas com diluente (RPMI 1640: DMSO 99:1 - CTL), células tratadas com o extrato bruto (CAE) com concentrações entre 0,25 e 250  $\mu\text{g/mL}$  após 48h (\* $p < 0,05$ , ANOVA, seguido do Teste de Tukey, comparado com o controle negativo).



**Figura 8.** Viabilidade celular de células 3T3, células cultivadas com diluente (RPMI 1640: DMSO 99:1 - CTL), células tratadas com a fração acetato de etila (CAEA) com concentrações entre 0,25 e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  após 48h (\* $p < 0,05$ , ANOVA, seguido do Teste de Tukey, comparado com o controle negativo).

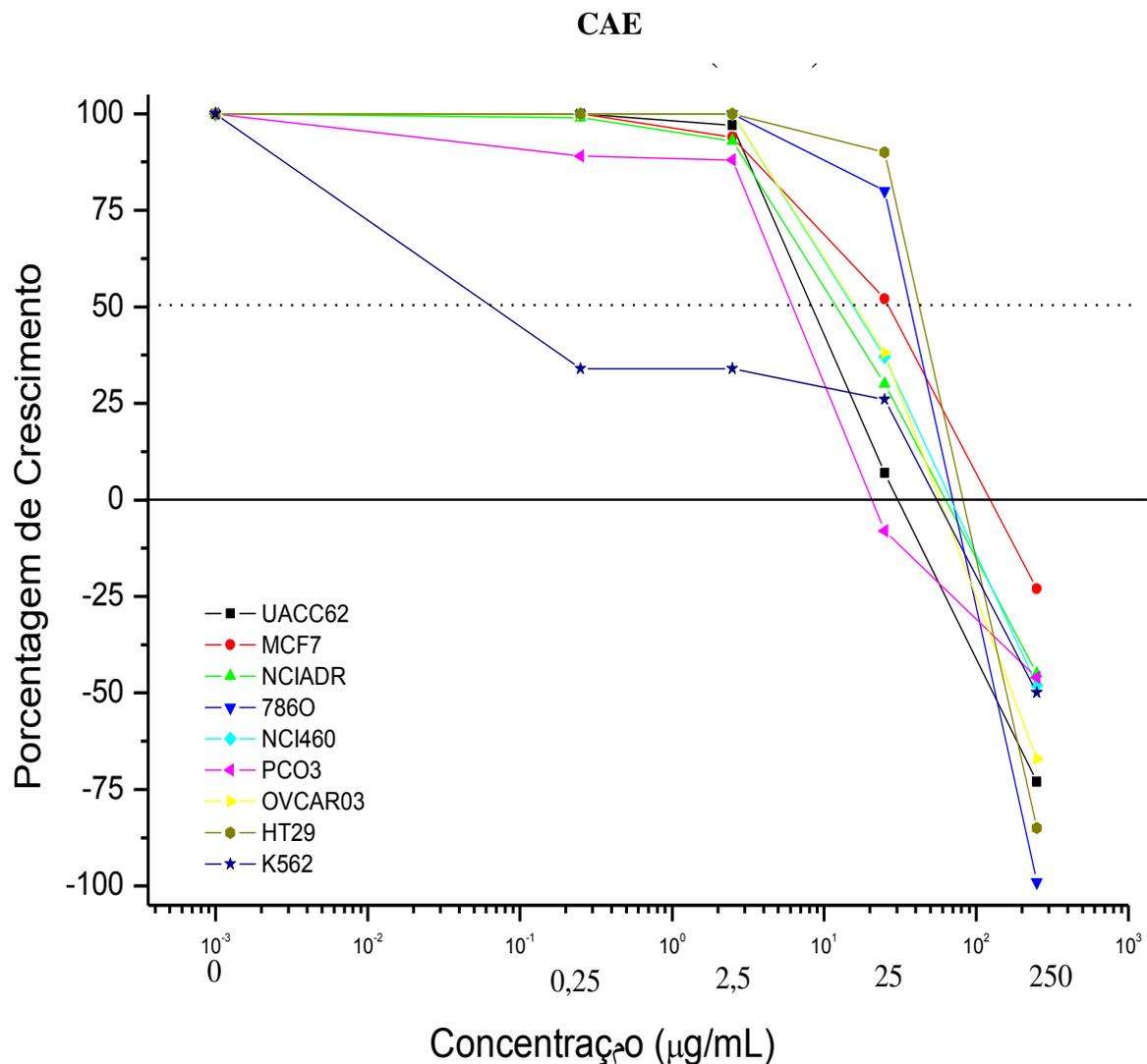


**Figura 9.** Viabilidade celular de células 3T3, células cultivadas com diluente (RPMI 1640: DMSO 99:1 - CTL), células tratadas com a fração butanólica (CAEB) com concentrações entre 0,25 e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  após 48h (\* $p < 0,05$ , ANOVA, seguido do Teste de Tukey, comparado com o controle negativo).

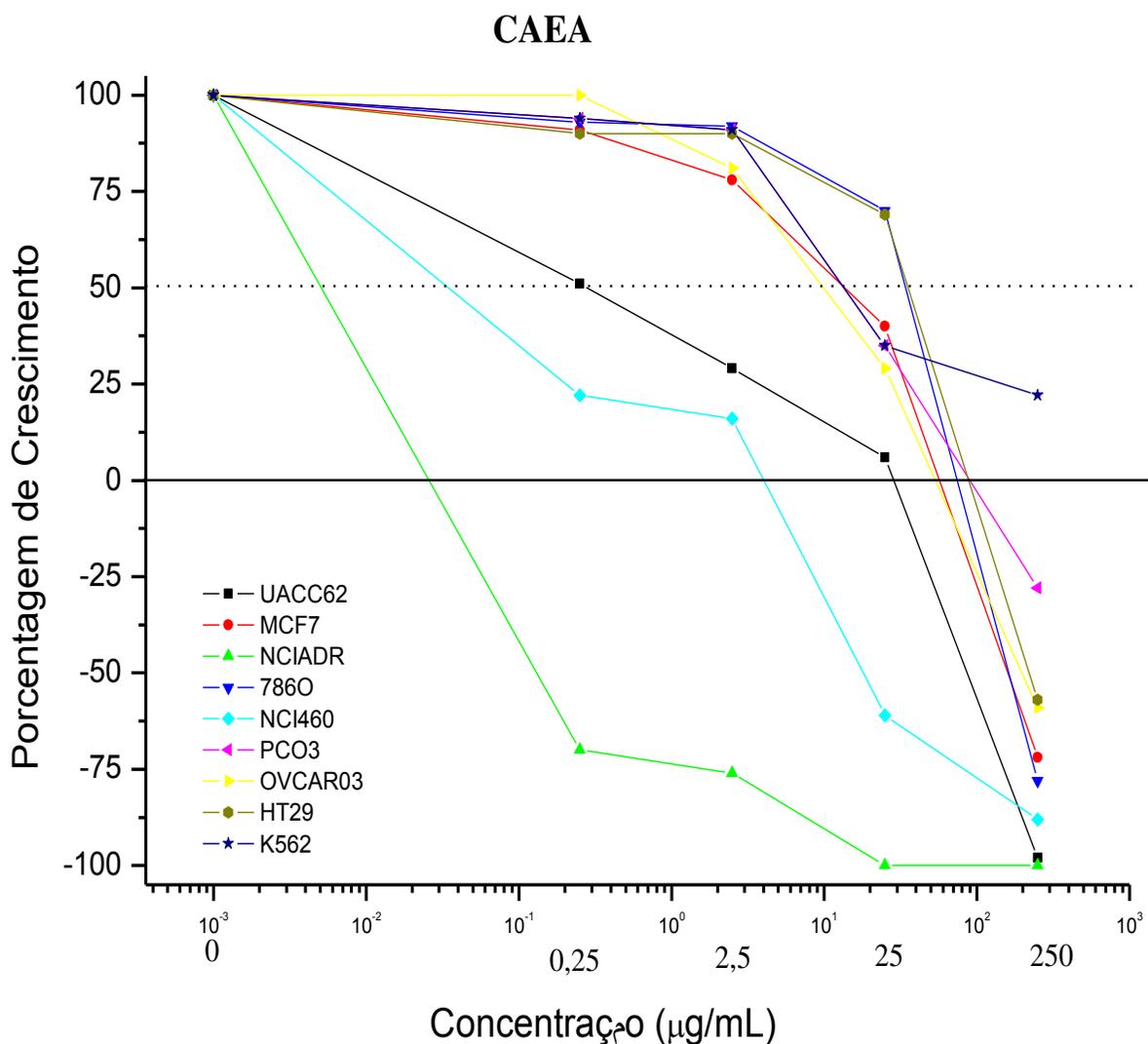
### 4.3.2. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais

Nas figuras 10 a 14, pode-se observar a ação do extrato etanólico de *C. adamantium*, fração acetato de etila, fração butanólica, da chalcona isolada (Ca5) e do quimioterápico doxorubicina em cultura de células tumorais humanas e o relacionamento da porcentagem de crescimento com a concentração do extrato, pelo ensaio da sulforrodamina B. Os valores abaixo de 100% e acima de zero representam inibição de crescimento, enquanto os negativos (abaixo de zero por cento) representam morte celular, uma vez que a quantidade de células (aferida pela absorvância no final do experimento), no segundo caso, é menor do que aquela no início do experimento (absorvância do T<sup>0</sup>).

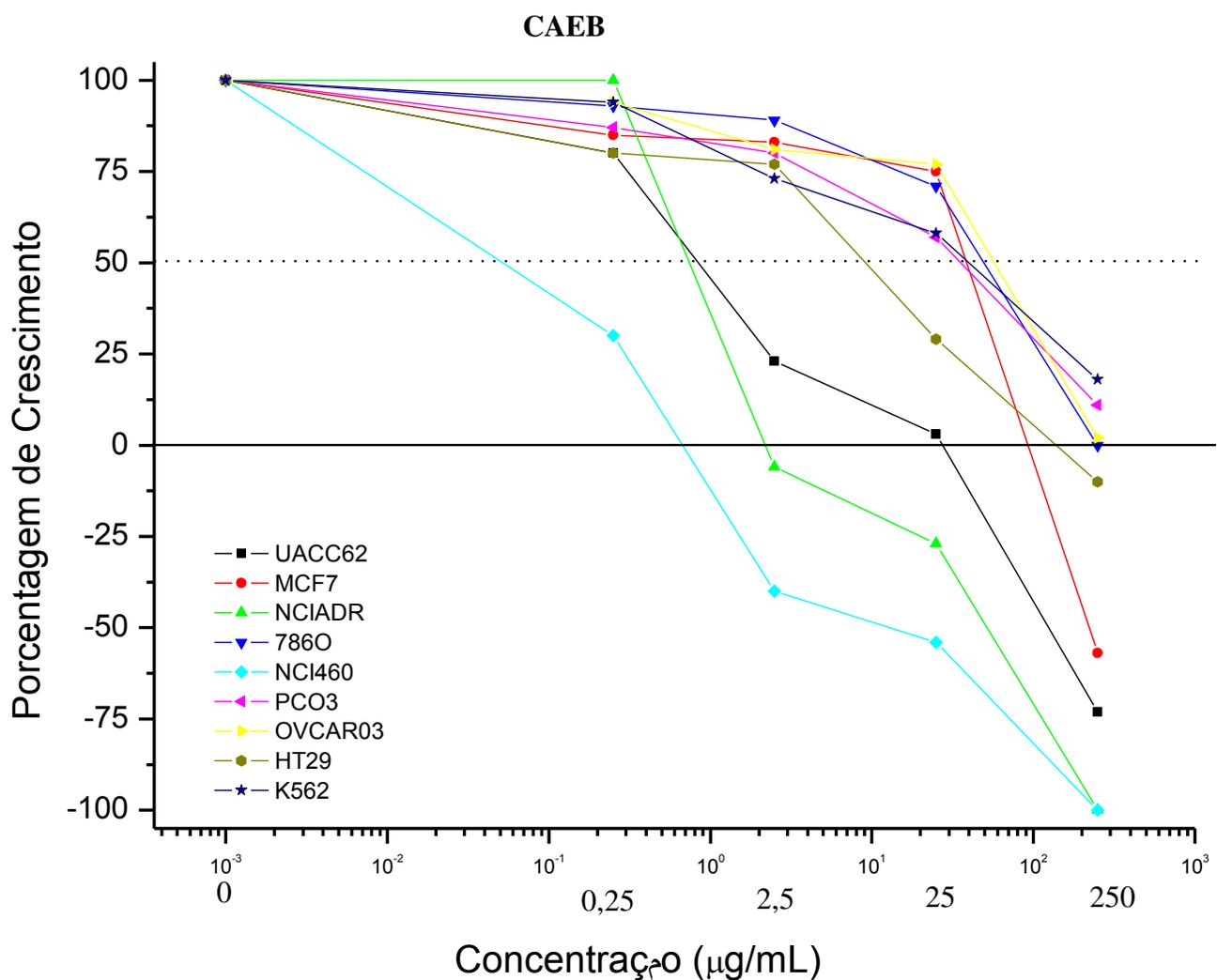
A Tabela 3 apresenta as concentrações que levaram à inibição de crescimento total (TGI) das linhagens celulares para o extrato etanólico, frações acetato de etila e butanólica e substância isolada. Os valores de TGI do extrato bruto, frações e substância isolada variaram de 2,17 a 141,79 µg/mL. A concentração de Ca5 necessária para inibir o crescimento total da linhagem de melanoma (UACC-62) foi de 2,17 µg/mL, para a linhagem ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES) o TGI foi igual 2,85 µg/mL e na linhagem de rim (786-0), o TGI foi igual a 5,46µg/mL. Avaliou-se o efeito citotóxico da chalcona frente à linhagem não cancerosa VERO (TGI igual a 5,99 µg/mL). Para as linhagens UACC-62, NCI-ADR/RES e 786-0, a concentração da chalcona isolada foi menor que a concentração citotóxica para a linhagem não cancerosa (VERO).



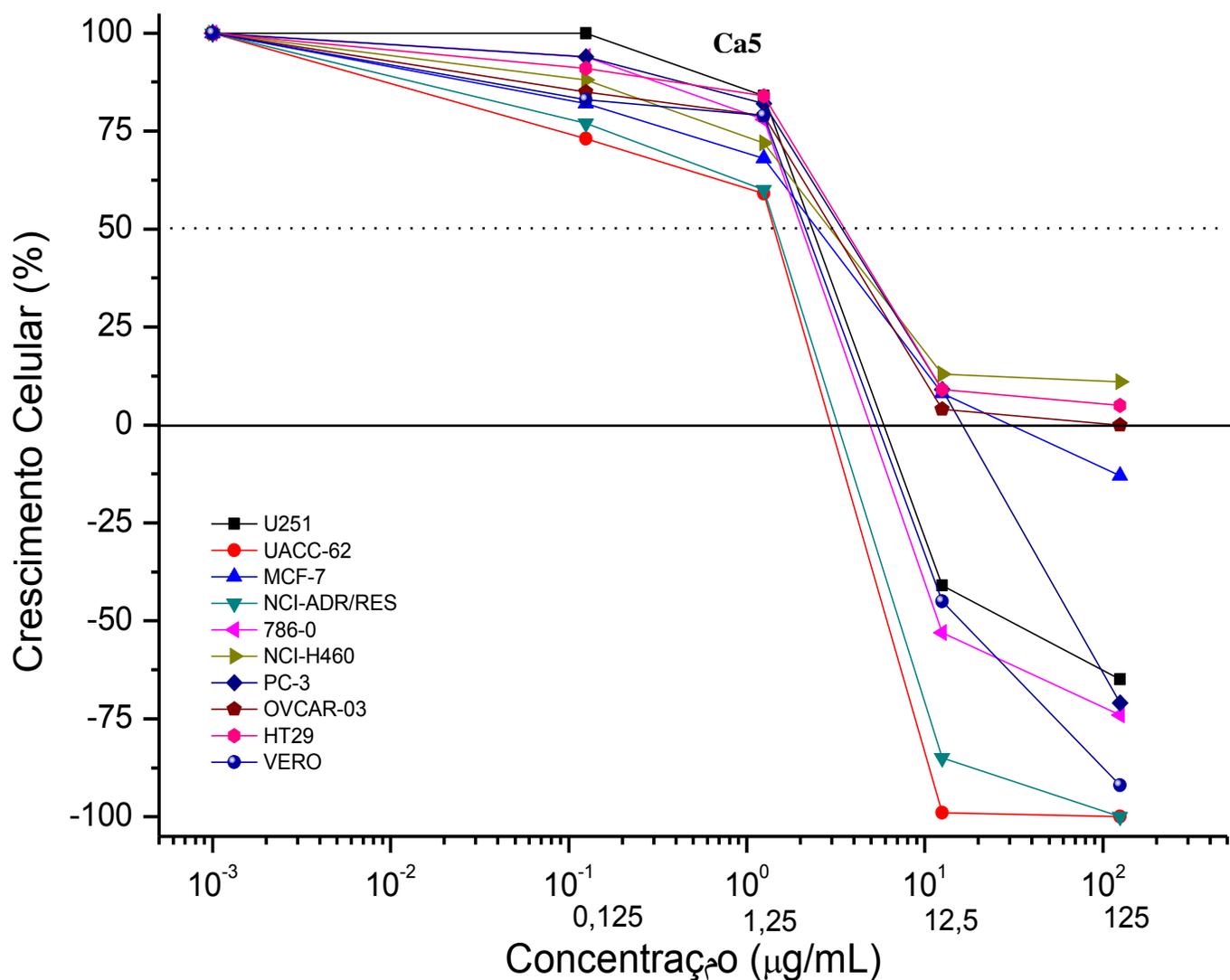
**Figura 10.** Gráfico da atividade antiproliferativa do extrato bruto etanólico das folhas de *C. adamantium* (CAE) em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato. Linhagens utilizadas: UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); 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); K562 (leucemia).



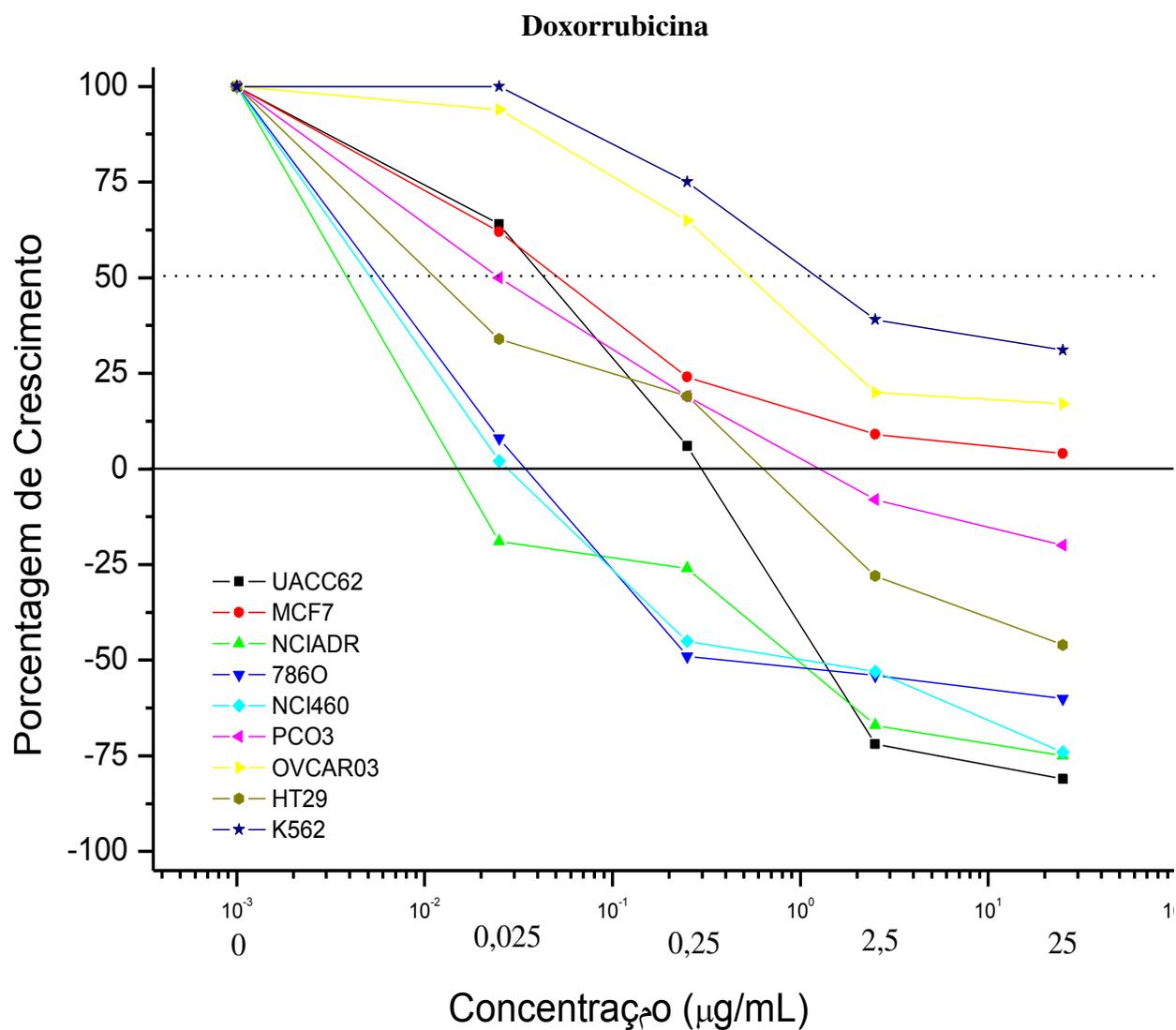
**Figura 11.** Gráfico da atividade antiproliferativa da fração acetato de etila do extrato bruto etanólico das folhas de *C. adamantium* (CAEA) em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do fração. Linhagens utilizadas: UACC-62 (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); K562 (leucemia).



**Figura 12.** Gráfico da atividade antiproliferativa da fração butanólica das folhas de *C. adamantium* (CAEB) em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da fração. Linhagens utilizadas: 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); K562 (leucemia).



**Figura 13.** Gráfico da atividade antiproliferativa da chalcona isolada (Ca5) a partir da fração acetato de etila das folhas de *C. adamantium* em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da substância isolada. Linhagens utilizadas: 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); K562 (leucemia).



**Figura 14.** Gráfico da atividade antiproliferativa do quimioterápico Doxorrubicina em cultura de células tumorais humanas tratadas por 48h, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do quimioterápico. Linhagens utilizadas: 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); K562 (leucemia).

**Tabela 3.** Valores de concentração que leva a inibição de crescimento total (TGI) em µg/mL do extrato bruto etanólico (CAE), frações acetato de etila (CAEA) e butanólica (CAEB), chalcona isolada (Ca5) e doxorubicina.

<b>Amostra Linhagem</b>	<b>CAE µg/mL</b>	<b>CAEA µg/mL</b>	<b>CAEB µg/mL</b>	<b>Ca5 µg/mL</b>	<b>Doxorrubicina µg/mL</b>
<b>UACC-62</b>	31,41 (±5,1)	8,98 (±8,3)	13,21 (±6,9)	2,17 (±1,5)	0,26 (±0,05)
<b>MCF-7</b>	129,5 (±11,1)	50,48 (±11,4)	98,02 (±27,2)	41,66 (±21,4)	>25,00
<b>NCI-ADR/RES</b>	64,70 (±9,9)	<0,25	4,66 (±3,4)	2,85 (±0,8)	0,01 (±0,008)
<b>786-O</b>	49,12 (±0,04)	70,89 (±9,5)	250,0 (±10,3)	5,46 (±1,6)	0,02 (±0,002)
<b>NCI-H460</b>	69,55 (±11,9)	1,75 (±1,1)	0,76 (±0,3)	>125	0,02 (±0,001)
<b>PC-3</b>	33,14 (±15,4)	94,60 (±17,4)	>250,0	15,70 (±0,8)	2,14 (±0,86)
<b>OVCAR-03</b>	54,10 (±5,0)	49,68 (±3,2)	>250,0	125,0 (±0,8)	>25,00
<b>HT-29</b>	86,60 (±0,07)	91,35 (±14,9)	141,8 (±48,1)	>125,0	0,51 (±0,19)
<b>K562</b>	25,00 (±1,2)	>250,0	>250,0	-	>25,00
<b>VERO</b>	-	-	-	5,99 (±1,2)	-

- não avaliado; \*TGI – *Total Growth Inhibition* – Concentração que leva a inibição de crescimento total (100%), em µg/mL; Resultados apresentados em média (%DP, desvio padrão) de ensaios em triplicata; Linhagens: melanoma (UACC-62); mama (MCF-7); ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES); rim (786-0); pulmão, tipo não pequenas células (NCI-H460); próstata (PC-3); ovário (OVCAR-3); cólon (HT-29); leucemia (K562); linhagem de célula não cancerosa (VERO).

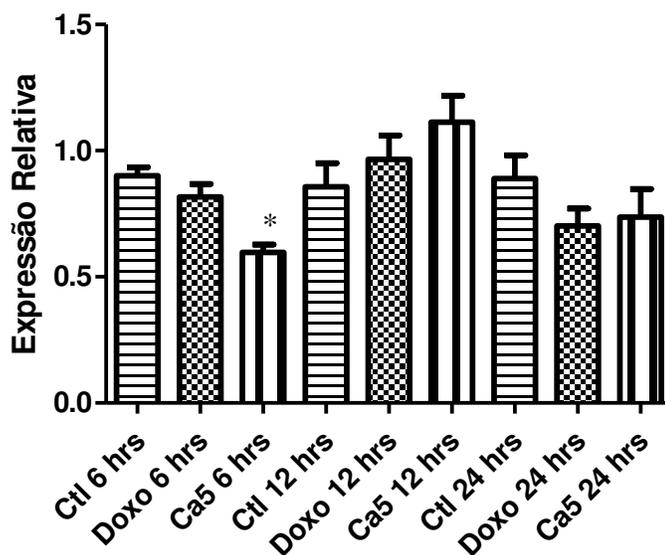
A partir dos resultados obtidos, observou-se que os extratos apresentaram atividade antioxidante e atividade antiproliferativa em algumas linhagens estudadas. Pelos estudos fitoquímicos esses extratos são ricos em compostos fenólicos, e alguns deles foram identificados, entre eles, flavonóides e chalconas. Estudos anteriores indicam que flavonóides apresentam tanto a atividade antioxidante, quanto a atividade antiproliferativa e, para isso, necessitam de alguns requisitos em sua estrutura, como a presença de grupo catecol como substituinte no anel B e da dupla ligação entre os carbonos 2 e 3, C2=C3 (Kawaii *et al.*, 1999; Plochmann *et al.*, 2007). Nem sempre isto é aplicável, uma vez que a atividade antioxidante depende da sua capacidade de doar hidrogênio, transferir elétrons ou formar complexos com íons metálicos (Rice-Evans *et al.*, 1996; Mira *et al.*, 2002), sendo influenciada principalmente pelo número ou posição dos grupos hidroxila no esqueleto fundamental da aglicona flavonoídica. Já a citotoxicidade de flavonóides pode ser causada por múltiplos mecanismos, como inibição da quinase específica do ciclo celular, esgotamento de glutatona reduzida (GSH), ação sobre

as mitocôndrias, regulação das proteínas de apoptose ou por efeitos pró-oxidantes (Kachadourian *et al.*, 2007; Shen *et.al.*, 2007).

#### **4.3.3. Análise da Expressão dos genes *BAX* e *BCL-2*:**

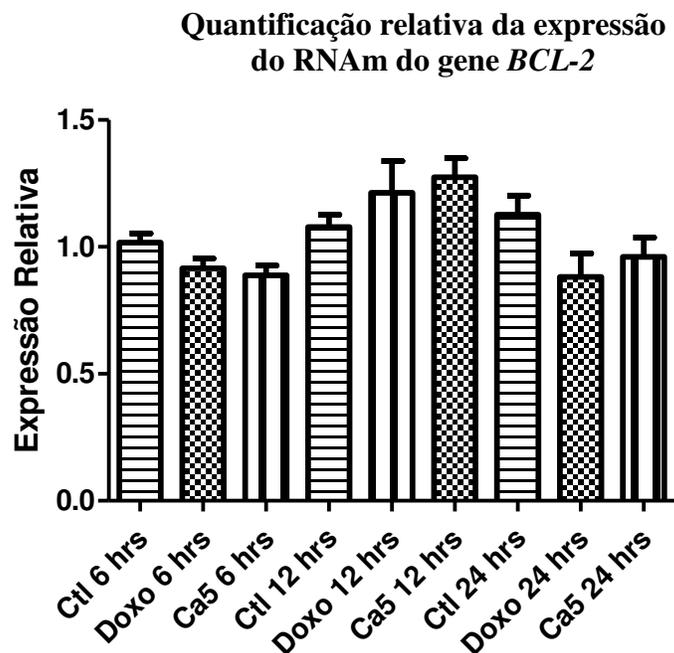
A fim de se avaliar como a chalcona isolada (Ca5) pode interagir e induzir a morte celular nas linhagens que sofreram uma diminuição do número de células cancerosas viáveis, optou-se por escolher uma que apresentasse um TGI < 20 µg/mL. Essa concentração foi convencionada pelo grupo de pesquisa na triagem de agentes antiproliferativos promissores. Os genes analisados, relacionados com apoptose, foram *BAX* e *BCL-2* em cultura de células PC-3, após serem tratadas com chalcona isolada (Ca5), sendo também empregado o quimioterápico doxorubicina e como o controle negativo meio de cultura com 0,1% de DMSO. Os membros da família BCL-2, como BCL-2 e BCL-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, BAX, BIDE BAK são proteínas pró-apoptóticas (Borner, 2003). A quantidade relativa de cada gene em cada amostra foi determinada pela razão: IOD gene específico/IOD β-Actina. O aumento da expressão do RNAm do gene *BAX* nas células tratadas em relação às células não tratadas é um indicativo de morte celular por apoptose.

### Quantificação relativa da expressão do RNAm do gene *BAX*



**Figura 15.** Gráfico da análise de expressão do gene *BAX* em células não tratadas (Ctl - diluente RPMI 1640: DMSO, 99:1), células tratadas com a chalcona Ca5 e células tratadas com o quimioterápico doxorubicina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (\* $p < 0,05$ , ANOVA, seguido do Teste de Tukey, comparados com o controle negativo).

Pela análise de expressão do gene *BAX* (gene pró-apoptótico) observou-se uma diminuição na expressão, significativa, nas células que foram tratadas com a Ca5 por 6 horas em relação às células não-tratadas. Todos os demais grupos não apresentaram diferenças significativas quando comparadas às células que foram cultivadas com o diluente.



**Figura 16.** Gráfico da análise de expressão do gene *BCL-2* em células não tratadas (Ctl - diluente RPMI 1640: DMSO, 99:1) (Ctl), células tratadas com chalcona isolada Ca5 e células tratadas com o quimioterápico doxorrubicina 20  $\mu\text{g/mL}$  (\* $p < 0,05$ , ANOVA, seguido do Teste de Tukey, comparados com o controle negativo).

Na análise do gene anti-apoptótico *BCL-2*, comparando as células não tratadas com as células que sofreram tratamento não houve alterações estatisticamente significativas.

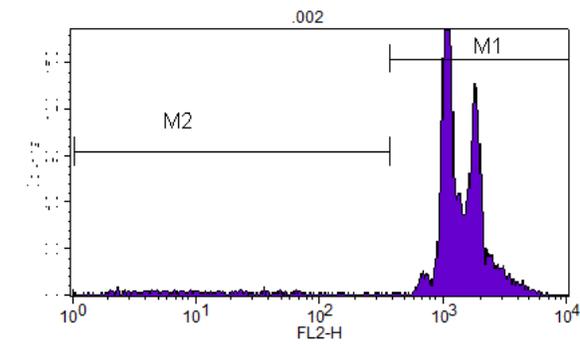
A expressão do gene *BCL-2* é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (Vander-Heiden & Thompson, 1999). Porém, quando a célula sofre estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. A proteína BAX pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas anti-apoptóticas (Petros *et al.*, 2004).

As vias de ativação da morte celular por apoptose podem ocorrer de duas maneiras. Em determinadas células, a mitocôndria amplifica o estímulo extrínseco. Em células do tipo I, a caspase 8 ativada é suficiente para ativar outros membros da família caspase. Em células do tipo II, a ativação das caspases efetoras depende da alça de amplificação via clivagem da proteína BID em duas partes. A parte clivada BID com domínio BH3 torna-se ativa, migra para a mitocôndria e se liga à proteína BAX. Isto leva à liberação de fatores mitocondriais pró-apoptóticos (Peres & Curi, 2005).

Portanto, a morte celular por apoptose não pode ser descartada, já que esta pode estar sendo ativada pela via extrínseca, via receptores TNF, visto que não houve alterações na expressão dos genes *BAX* e *BCL-2* relacionados à via intrínseca da apoptose.

#### **4.3.4. Análise por citometria de fluxo da fragmentação do DNA em cultura de células PC-3:**

A fase irreversível do processo apoptótico é a fragmentação nuclear que é causada por endonucleases (Eastman, 1995), que clivam o DNA em fragmentos de 180-200 pares de base (pb) ou maiores (Thompson, 1998). O iodeto de propídio é um agente que intercala na molécula de DNA (corante de ácidos nucléicos) e emite uma fluorescência amarela e vermelha. O iodeto de propídio não penetra na membrana de células viáveis, portanto usa-se triton, um detergente que rompe a membrana celular, para determinação da porcentagem de células com DNA fragmentado. As células rompidas pelo tampão de lise, expõem os núcleos, permitindo que iodeto de propídio se ligue ao DNA (Peres & Curi, 2005). As células com núcleos íntegros emitem alta fluorescência, já que o iodeto de propídio é excitável por laser de argônio e emite fluorescência na faixa de 560-580 nm. A condensação da cromatina e a fragmentação do DNA podem ser observadas pela ocorrência de eventos com baixa fluorescência (Peres & Curi, 2005). As células PC-3 tratadas com a chalcona isolada (Ca5) e doxorubicina foram analisadas quanto à fragmentação do DNA após o tratamento em 6, 12, 24 e 48 horas (figuras 17 a 25).

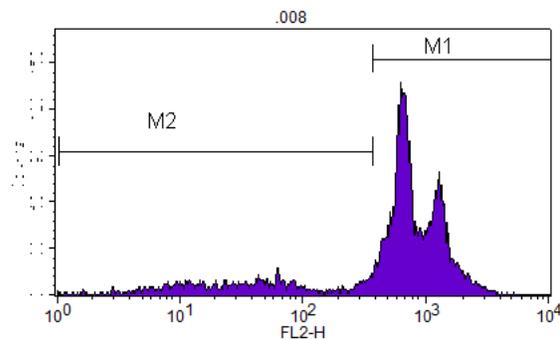


Histogram Statistics

File: .002 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: Patient ID:  
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube Lis  
 Acquisition Date: 06-Oct-11 Gate: No Gate  
 Gated Events: 10014 Total Events: 10014  
 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 991C	10014	100.00	100.00	1380.39	1155.64	46.05	1191.71	1018
M1	368, 991C	9718	97.04	97.04	1421.46	1326.37	42.16	1218.81	1018
M2	1, 368	293	2.93	2.93	32.35	12.87	179.98	10.65	2

**Figura 17.** Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3 (controle negativo, células tratadas com diluente- RPMI 1640/DMSO 99:1) em citômetro de fluxo, cultivadas por 48 horas. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado.

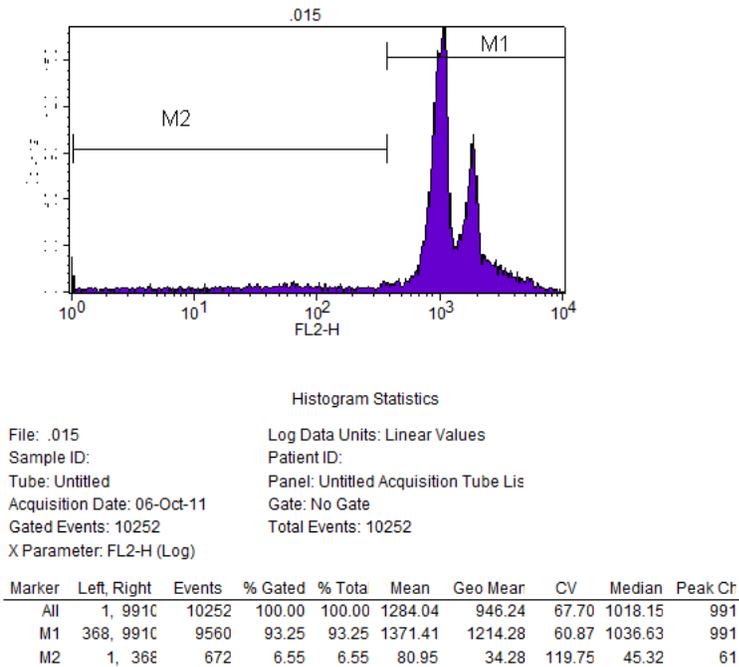


Histogram Statistics

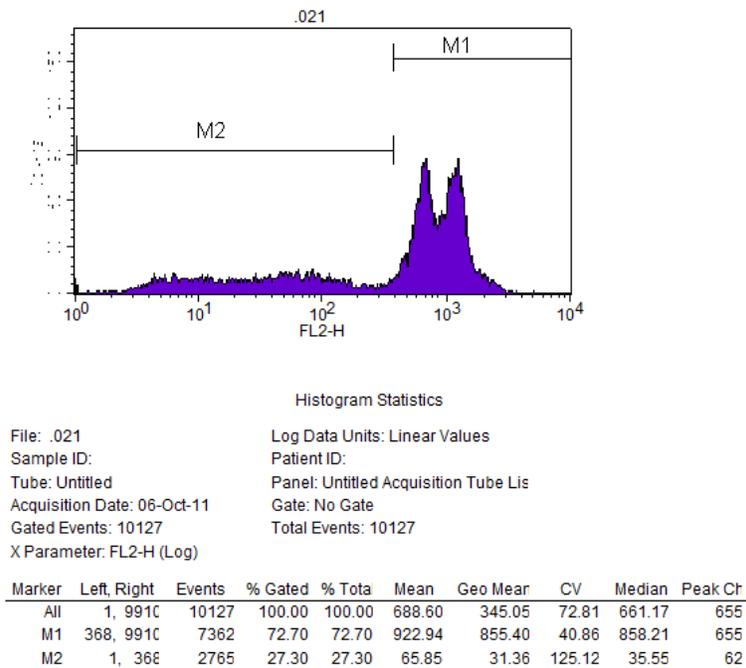
File: .008 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: Patient ID:  
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube Lis  
 Acquisition Date: 06-Oct-11 Gate: No Gate  
 Gated Events: 10098 Total Events: 10098  
 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 991C	10098	100.00	100.00	740.59	486.24	65.96	643.57	588
M1	368, 991C	8462	83.80	83.80	866.61	786.50	49.55	691.58	588
M2	1, 368	1646	16.30	16.30	90.95	41.26	124.14	41.79	365

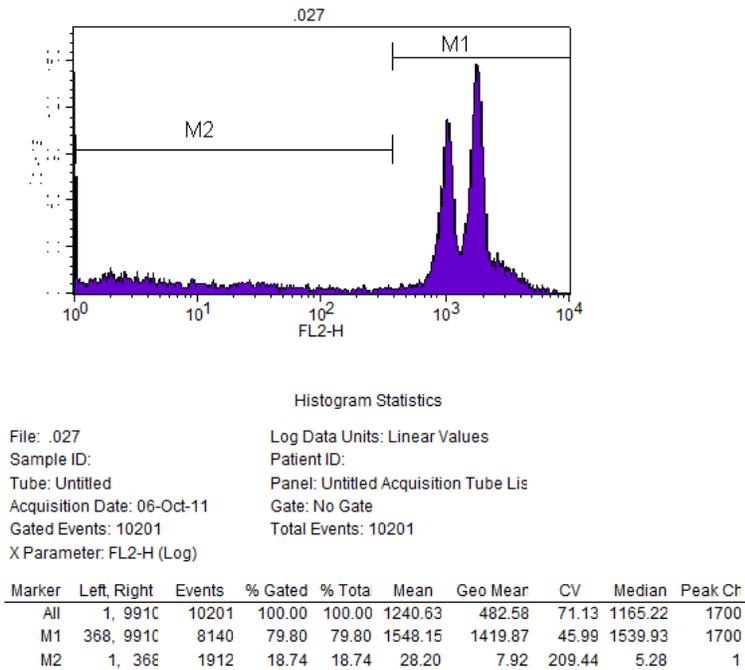
**Figura 18.** Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com doxorubicina por 48h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado.



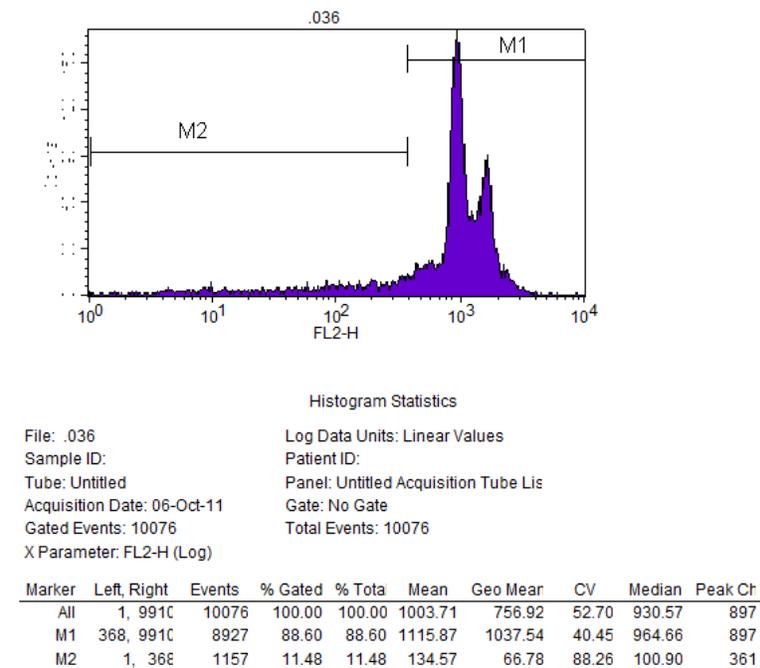
**Figura 19.** Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com a chalcona Ca5 por 48h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado.



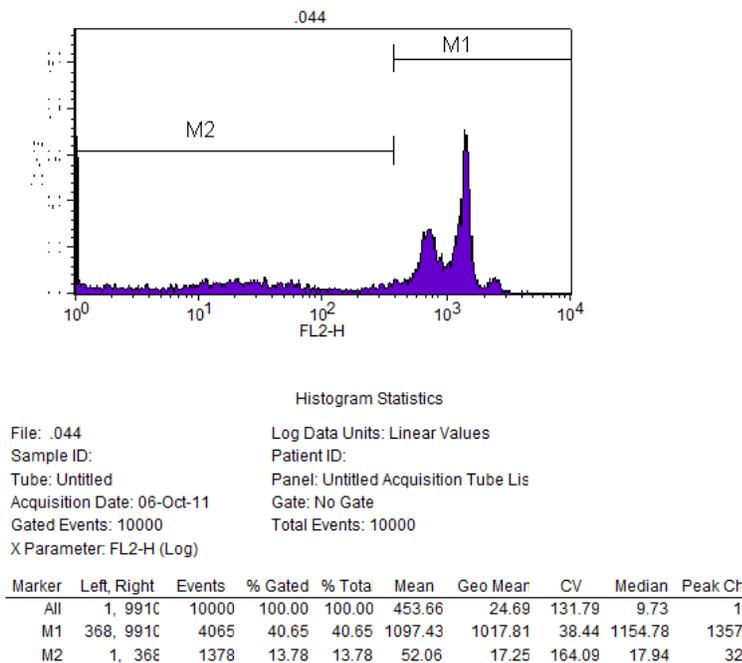
**Figura 20.** Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com doxorubicina por 24h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado.



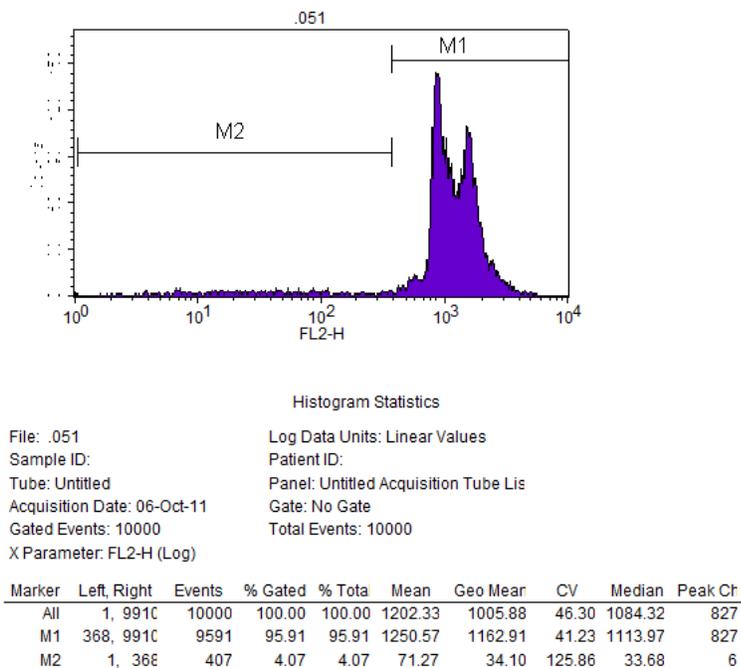
**Figura 21.** Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com a chalcona Ca5 por 24h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado.



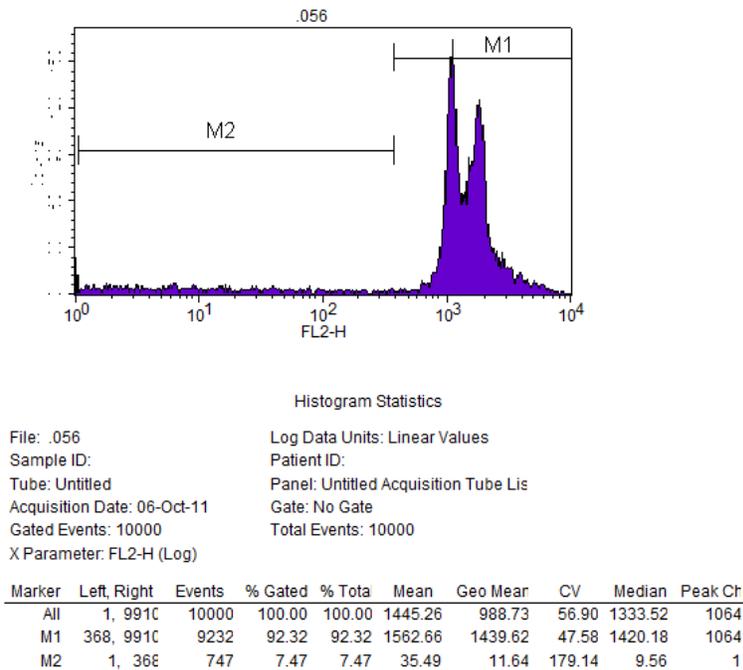
**Figura 22.** Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com doxorubicina por 12h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado.



**Figura 23.** Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com a chalcona Ca5 por 12h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado.



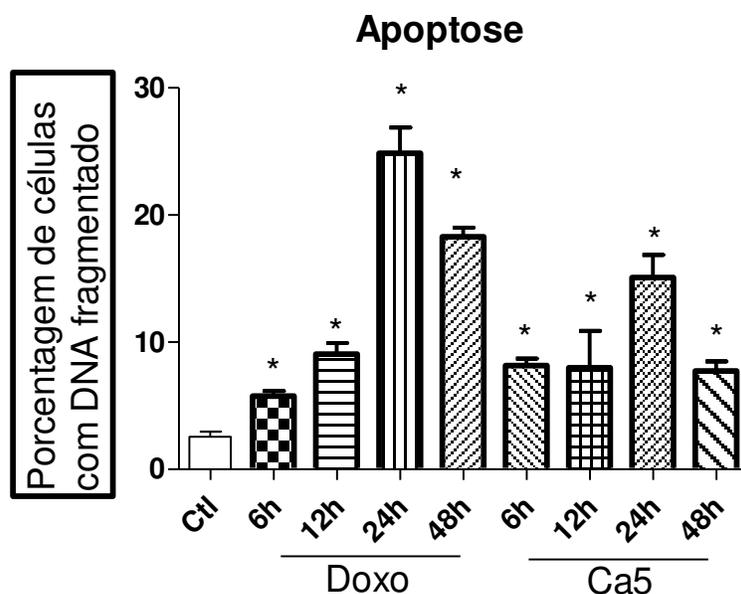
**Figura 24.** Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com doxorubicina por 6h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado.



**Figura 25.** Representação em histograma da fragmentação do DNA de células PC-3, tratadas com a chalcona Ca5 por 6h em citômetro de fluxo. A região M1 do histograma corresponde às células com DNA íntegro e a região M2 corresponde às células com DNA fragmentado.

Nas células tratadas por 6 horas com a chalcona Ca5 e doxorrubicina houve uma porcentagem de 8,15 % ( $\pm 1,38$ ) e 5,75 % ( $\pm 1,00$ ) de células com DNA fragmentados, porém a maior porcentagem de fragmentação foi apresentado em 24 horas de tratamento com 15,09 % ( $\pm 3,96$ ) para Ca5 e 24, 86% ( $\pm 4,93$ ) para doxorrubicina (Figura 26).

Quando comparadas às células tratadas com o diluente, houve um aumento no processo de apoptose (estatisticamente significativo,  $p < 0,05$ ) em todos os tempos analisados. Após 24 horas houve um decaimento da porcentagem de células em apoptose, provavelmente pela metabolização e inativação da droga presente no meio. Com esses dados observa-se que a chalcona Ca5, assim como a doxorrubicina, induzem morte celular por apoptose em células PC-3, já que a fragmentação do DNA é o passo final da apoptose.



**Figura 26.** Porcentagem de células com DNA fragmentado por análise em citômetro de fluxo. Ctl: controle negativo, células PC-3 cultivadas por 48h com o diluente (RPMI 1640/DMSO 99:1); Doxo: doxorubicina 20 $\mu$ g/mL tratadas por 6, 12, 24 e 48h; Ca5: chalcona isolada 20 $\mu$ g/mL tratadas por 6, 12, 24 e 48h. (\* $p$ <0,05, ANOVA, seguido do Teste de Tukey, comparado com o controle negativo).

Estudos anteriores apontam que as chalconas apresentam efeitos quimiopreventivos e antitumorais, assim como atividade antioxidante (Rahman, 2011). Algumas chalconas, como exemplo, xanthoangelol licochalcone-A, isoliquiritigenin, flavokawain e chalcona (1,3-difenil-2-propenona), induziram a apoptose, inibiram a promoção de tumor e metástases em diversas linhagens de células de câncer ou promoveram a parada do ciclo celular em algumas linhagens celulares cancerosas (Kimura & Baba, 2003; Tabata *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2004; Zi e Simoneau, 2005; Hu *et al.*, 2006). Assim a chalcona isolada Ca5 (2',4'-diidroxí-6'-metoxichalcona) apresentou atividade antiproliferativa para algumas linhagens celulares e a induziu a apoptose, mesmo não ativando os genes *BAX* e *BCL-2*. A indução da apoptose pela chalcona Ca5 foi confirmada pela análise da fragmentação do DNA, que é passo final deste processo, nas células PC-3, já que a via extrínseca pode estar sendo ativada. Estes resultados são inéditos para esta substância. Assim, as chalconas e seus derivados têm despertado a

atenção crescente dos cientistas para a busca de novos agentes farmacologicamente ativos neste grupo de princípios ativos naturais.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos pode-se sugerir que:

- O extrato bruto etanólico das folhas de *C. adamantium* e suas frações acetato de etila e butanólica apresentaram atividade antioxidante tanto pelo método indireto DPPH (baseado em mecanismos de transferência de elétrons), quanto pelo ensaio ORAC<sub>FL</sub> (método direto, cinético, baseado em mecanismos de transferência de hidrogênio) e apresentaram relação com o alto teor de compostos fenólicos totais solúveis estimado pelo método colorimétrico Folin Ciocalteu;
- O extrato bruto etanólico das folhas de *C. adamantium* e suas frações em acetato de etila e butanólica apresentaram atividade antiproliferativa frente linhagens tumorais humanas;
- Análise fitoquímica empregando a HPLC-DAD, ESI-MS e MS-MS sugeriu a presença no extrato etanólico das folhas de *C. adamantium* e suas frações de flavonóides como isoquercitrina (Ca1), quercitrina (Ca2), miricetina (Ca3), quercetina (Ca4) e das chalconas 2',4'-diidroxí-6'-metoxichalcona (Ca5); 2',4'-diidroxí-5'-metil-6'-metoxichalcona (Ca6) e 2',4'-diidroxí-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona (Ca7);
- O estudo fitoquímico da fração acetato de etila levou ao isolamento e identificação da chalcona Ca5, que apresenta promissora atividade citotóxica frente a algumas das linhagens de células tumorais humanas estudadas e também apresentou atividade antioxidante pelo ensaio ORAC<sub>FL</sub>;
- Pelas análises de expressão do RNAm do gene *BAX* (gene pró-apoptótico) e do gene anti-apoptótico *BCL-2*, comparando as células não tratadas com as células que sofreram tratamento, não se observou alterações significativas na expressão destes genes nas amostras das células tratadas com a chalcona Ca5 e com o quimioterápico doxorrubicina quando comparadas com o controle negativo que indicassem indução de apoptose;
- As análises da fragmentação do DNA por citometria de fluxo indicam que a chalcona Ca5 induz a morte celular por apoptose em células PC-3 assim como o quimioterápico doxorrubicina.

Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as atividades antioxidante e antiproliferativa de *C. adamantium* podem estar relacionadas com a presença de flavonóides acumulados no extrato etanólico das folhas deste vegetal. Os estudos ainda indicam que a chalcona isolada Ca5 apresenta atividade antioxidante e atividade antiproliferativa, porém, esta não foi capaz de alterar a expressão do RNAm dos genes *BAX* e *BCL-2* em células PC-3 analisadas pelo método de PCR semiquantitativo. Portanto, a via dos receptores TNF, via extrínseca, poderia estar sendo ativada. Para confirmar a indução de apoptose realizaram-se as análises em citometria de fluxo, sendo possível observar a fragmentação do DNA das células PC-3 tratadas com a Ca5 pelo método do iodeto de propídeo, sugerindo a indução de apoptose, já que a fragmentação do DNA é o último passo do processo apoptótico.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS:

Assim, este trabalho com *C. adamantium* abre perspectivas para outros estudos com novas abordagens, tais como:

- Isolamento de outras substâncias identificadas na desreplicação e avaliação da sua atividade biológica;
- Desenvolvimento de procedimentos analíticos para a quantificação de substâncias bioativas nos extratos e frações;
- Avaliação da atividade antiproliferativa e antioxidante *in vivo* dos extratos e frações empregando modelos experimentais com animais e investigação de sua toxicidade;
- Avaliação do efeito das amostras bioativas por PCR em Tempo Real de genes relacionados à apoptose como os genes anti-apoptóticos BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 e os pró-apoptóticos BAX, BAK, BAD, BID e TNF;
- Avaliação do efeito de morte celular por Anexina V ou outros ensaios que possa dar maiores informações sobre mecanismos de ação das amostras bioativas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, B.B.; Ichikawa, H.; Garodia, P.; Weerashinghe, P.; Sethi, G.; Bhatt, I.D.; Pandey, M.K.; Shishodia, S.; Nair, M.G., 2006. From traditional ayurvedic medicine to modern medicine: Identification of Therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. *Expert Opinion Therapeutics Targets*, 10, 87-118.
- Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F., 1998. Cerrado: Espécies vegetais úteis. Planaltina, EMBRAPA-CPAC, 464p.
- Alscher, R.G.; Erturk, N.; Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1331-1341.
- Amarante-Mendes, G.P. & Green, D.R., 1999. The regulation of apoptotic cell death. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 1053-1061.
- Atoui, A.K.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P., 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, 27-36.
- Baker, D.D.; Chu, M.; Oza, U.; Rajgarhia, V., 2007. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Products Reports*, 24, 1225-1244.
- Barreiro, E.J. & Fraga, C.A.M., 1999. Utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafrás, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. *Química Nova*, 22, 744-759.
- Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M., David, J.P., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29, 113-123.
- Barroso, G.M. & Perón, V., 1994. Myrtaceae. In Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ. Aspectos florísticos das espécies vasculares, M.P.M. Lima & R.R. Guedes-Bruni, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 261-302.

- Barroso, G.M. 1991. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2, 309p.
- Beck, W.T., 1990. Mechanisms of multidrug resistance in human tumor cells. The roles of Pglycoprotein, DNA topoisomerase II, and other factors. *Cancer Treatment Reviews*, 17, 11-20.
- Bonassa, E.M.A., 1996. *Enfermagem em quimioterapia*. São Paulo: Atheneu, 279p.
- Bonilla, A.; Duque, C.; Garzon, C.; Takaishi, Y.; Yamaguchi, K.; Hara, N.; Fujimoto, Y., 2005. Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Phytochemistry*, 66, 1736-1740.
- Borner C., 2003 The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, 39, 615–647.
- Brasileiro Filho, G., 1998. *Patologia geral*. 2 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 312p.
- Brown, J.M. & Attardi, L.D., 2005. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature*, 5, 231-237.
- Canivenc-Lavier, M.C.; Vernevault, M.F.; Totis, M.; Siess M.H., Magdalou, J.; Suschetet, M., 1996. Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*, 114, 19-27.
- Cárdenas, M.; Marder, M.; Blank, V.C.; Roguin, L.P., 2006. Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14, 2966-2971.
- Cavin, A.; Potterat, O.; Wolfender, J.L.; Hostettmann, K.; Dyatmyko W., 1998. Use of On-flow LC/1H NMR for the Study of an Antioxidant Fraction from *Orophea enneandra* and Isolation of a Polyacetylene, Lignans, and a Tocopherol Derivative. *Journal of Natural Products*, 61, 1497-1501.
- Chin, Y.W.; Balunas, M.J.; Chai, H.B.; Kinghorn D., 2006. Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*, 8, 239-253.

- Cordell, G.A.; Beecher, C.W.W.; Pezzuto, J.M., 1991. Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 32, 117-133.
- Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T., 2000. Robbins: Patologia estrutural e Funcional, 6 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1251p.
- Coutinho, I.D.; Coelho, R.G.; Kataoka, V.M.F.; Honda, N.K.; Silva, J.R.M.; Vilegas, W; Cardoso, C.A.L., 2008. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. *Eclética Química*, 33, 53-60.
- Cruz, A.V.M. & Kaplan, M.A.C., 2004. Medicinal uses of species from Myrtaceae and Melastomataceae families in Brazil. *Floresta e Ambiente*, 11, 47-52.
- Cuendet, M.; Hostettmann, K.; Potterat, O.; Dyatmiko, W., 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80, 1144-1152.
- Desagher, S. & Martinou, J.C., 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biology*, 10, 369-377.
- Donehower, L.A.; Harvey, M.; Slagle, B.L., 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356, 215-221.
- Durigan, G.; Baitello, J.B.; Franco, G.A.D.C.; Siqueira, M.F. 2004 *Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada*. São Paulo Páginas & Letras, São Paulo, 455p.
- Edinger, A.L. & Thompson, C.B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 663-669.
- Ferreira, S.H. *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*, 2011. Disponível: <http://www.abc.org.br/arquivos/medicamentos.pdf> . Acesso em: 25 novembro 2002.
- Fournet, A. & Munoz, V., 2002. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Current Topics Medical Chemistry*, 2, 1215-1237.
- Fraser, A. & Evan, G., 1996. A license to kill. *Cell*, 85, 781-784.

- Fu, Y.; Hsieh, T.C.; Guo, J.; Kunicki, J.; Lee, M.Y.; Darzynkiewicz Z.; Wu, J.M., 2004. Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322, 263–270.
- Garcia, E.S., 1995. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. *Caderno de Saúde Pública*, 11, 495-500.
- Ghobrial, I.M.; Witzig, T.E.; Adjei, A.A., 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Cancer Journal for Clinicians*, 55, 178-194.
- Gobbo-Neto, L. & Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30, 374-381.
- Green D.R. & Reed J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
- Hammond, J.R.; Johnstone, R.M.; Gros, P., 1989. Enhanced efflux of (3H) vinblastine from Chinese hamster ovary cells transfected with a full-length complementary DNA clone for the *mdr1* gene. *Cancer Research*, 49, 3867-3871.
- Hannun, Y.A., 1977. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*, 89, 1845-1853.
- Haslam, E., 1996. Natural Polyphenols as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.
- Hodek, P.; Trefil, P.; Stiborova, M., 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological Interactions*, 139, 1-21.
- Hsu, Y.L.; Kuo, P.L.; Chiang, L.C.; Lin, C.C., 2004. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human nonsmall cell lung cancer A549 cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31, 414–418.
- Hsu, Y.L.; Kuo, P.L.; Tzeng, W.S.; Lin, C.C., 2006. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 704–713.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity essays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

- Ikawa, M.; Schaper, T.D.; Dollard, C.A.; Sasner, J.J., 2003. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1811-1815.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer, 2011. Disponível: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 11 de janeiro de 2011.
- Israels, L.G. & Israels, E.D., 1999 Apoptosis. *Stem Cells*, 17, 306-313.
- Itokawa, H.; Morita, M.; Mihashi, S., 1981. Phenolic compounds from the rhizomas of *Alpinia speciosa*. *Phytochemistry*, 20, 2503-2506.
- Jendiroba, D.B.; Klostergaard, J.; Keyhani, A; Paliaro, L.; Freireich, E.J., 2002. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapy-resistant leukemia cell lines by N-N-dimethylsphingosine. *Leukemia Research*, 26, 301-310.
- Kachadourian, R.; Leitner, H.M.; Day, B.J., 2007. Selected flavonoids potentiate the toxicity of cisplatin in human lung adenocarcinoma cells: A role for glutathione depletion. *International Journal of Oncology*, 31, 161-168.
- Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonem, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954 -3962.
- Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M., 1999. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63, 896–899.
- Kerr, J.; Witerford, C.; Harmon, B., 1994. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73, 2013-2026.
- Kiechle, F.L. & Zhang, X., 2002. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta*, 326, 27-45.

- Kimura, Y. & Baba, K., 2003. Antitumor and antimetastatic activities of *Angelica keiskei* roots, part 1: Isolation of an active substance, xanthoangelol. *International Journal of Cancer*, 106, 429–437.
- Ko, R.J., 1999. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. *Clinical Toxicology*, 37, 697-708.
- Kozłowski, D.; Trouillas, P.; Calliste, C.; Marsal, P.; Lazzaroni, R.; Duroux, J., 2007. Density functional theory study of the conformational, electronic, and antioxidant properties of natural chalcones. *Journal of Physical Chemistry A*, 111, 1138-1145.
- Kroemer, G.; Dallaporta, B.; Resche-Rigon, M., 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 619-642.
- Jung, S.H.; Kim, B.J.; Lee, E.H.; Osborne, N.N., 2010. Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant *Thuja orientalis* and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells). *Neurochemistry International*, 57, 713–721.
- Landrum, L.R. & Kawasaki, M.L., 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, 49, 508-536.
- Lemasters, J.J.; Nieman, A.L.; Qian, T.; Trsot, L.C.; Elmore, S.P.; Nishimura, Y.; Crowe, R.A.; Cascio, W.E.; Bradham, C.A.; Brenner, D.A.; Herman, B., 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366, 177-196.
- Limberger, R.P.; Apel, M.A.; Sobral, M.; Moreno, P.R.H.; Henriques A.T.; Menut C., 2001. Aromatic plant from Brazil: chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 13, 113-115.
- Liu, M.; Wilairat, P.; Go, M.L., 2001. Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalconas: structure–activity relationship analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 4443-4452.
- Lopes, A.A.; Oliveira, A. M.; Prado, C.B.C., 2002. Principais genes que participam da formação de tumores. *Rev. de Biologia e Ciências da Terra*, 2, 1519-5228.

- Lorenzi, H., 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa, 252p.
- Luo, X.D.; Baslie, M.J.; Kennelly, E.J., 2002. Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum Cainito* L. (star apple). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 1379-1382.
- Manthey, J.A.; Grohmann, K., 2001. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Current Medicinal Chemistry, 8, 135-153.
- Marchiori, J.N.C. & Sobral, M., 1997. Dendrologia das angiospermas - Myrtales. Editora da UFSM, Santa Maria, 304p.
- Marder, M. & Paladini, A.C., 2002. GABA(A)-Receptor ligands of flavonoid structure. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2, 853-867.
- Marroni, N.P., 2002. Estresse oxidativo e antioxidante. Editora da ULBRA, Canoas, 189p.
- Meagher, E.A. & Fitzgerald, G.A., 2000. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. Free Radical Biology and Medicine, 26, 202-226.
- Mendonça, R.C.; Felfili, J.M.; Walter, B.M.T.; Silva Júnior, M.C.; Rezende, A.V.; Filgueiras, T.S.; Nogueira, P.E., 1998. Flora vascular do cerrado. In: M.S.& S.P. Almeida, Cerrado: ambiente e flora. Embrapa- CPAC. Planaltina, pp.287- 556.
- Menezes-de-Lima Jr., O.; Rosas, E.C.; Henriques, M.G.M.O.; Branquinho, L.F.; Ramos, M.F.S.; Siani, A.C., 1997 . Avaliação da atividade antiinflamatória de óleos essenciais de espécies de Myrtaceae e Compositae. II Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. CPQBA-UNICAMP. Campinas, Brasil.
- Mira, L.; Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florêncio, M.H.; Jennings, K.R., 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. Free Radical Research, 36, 1199–1208.

- Moller, J.K.S.; Catharino, R.R.; Eberlin, M.N., 2007. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils: species from the Labiatae family. *Food Chem.*, 100, 1283–1288.
- Morrow, C.S. & Cowan, K.H., 1990. Glutathione S-transferases and drug resistance. *Cancer Cells*, 2, 15-22.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Murphy, B.M. & Martim, S.J., 2003. Caspases. In: Yin X. M., Dong Z., *Essential of Apoptosis: a guide for basic and clinical research*, Humana Press, New Jersey, pp3-12.
- Naczk, M. & Shahidi, F., 2004. Extractions and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054, 95-111.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Reporter*, 17, 215-234.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002 . *Natural Products Reporter*, 66, 1022-1037.
- Nicoletti-Carvalho, J.E.; Nogueira, T. C. A.; Gorjão, R.; Bromati, C. R.; Yamanaka, T. S.; Boschero, A. C.; Velloso, L. A.; Curi, R.; Anhê, G. F.; Bordin, S., 2010. UPR-mediated TRIB3 expression correlates with reduced AKT phosphorylation and inability of interleukin 6 to overcome palmitate-induced apoptosis in RINm5F cells. *Journal of Endocrinology*, 206, 183–193.
- Nogueira, P.E., 1998. Flora vascular do cerrado. *Cerrado, Ambiente e Flora*. EMBRAPA CPAC. Planaltina, 556p.
- Oberlis, N.H. & Kroll, D.J., 2004. Camptothecin and taxol: historic achievements in products research. *Journal of Natural Products*, 67, 129-135.
- Okada H. & Mak T. W., 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature*, 4, 592-603.

- Olszewska, M.A. & Michel, P., 2011. Activity-guided isolation and identification of free radical scavenging components from various leaf extracts of *Sorbus aria* (L.) Crantz. Natural Product Research, DOI:10.1080/14786419.2010.537271.
- Pavan, F.R.; Leite, C.Q.F; Coelho, R.G.; Coutinho, I.D.; Honda, N.K.; Cardoso, C.A.L.; Vilegas, W; Leite, S.R.A.; Sato, D.N., 2009. Evaluation of anti-mycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). Química Nova, 32, 1222-1226.
- Pedersen, P.L., 1999. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 31, 291-304.
- Peng, J.; Jones, G.L.; Watson, K., 2000. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. Free Radical Biology and Medicine, 28, 1598-1606.
- Peres, C. M.; Curi, R., 2005. Como cultivar células. 1 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 281p.
- Petros, A.M.; Olejniczak, E.T.; Fesik, S.W., 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. Biochimica et Biophysica Acta, 1644, 83-94.
- Piccinelli, A.L.; De Simone, F.; Passi, S.; Rastrelli, L., 2004. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (burrito), a folk Paraguayan tea. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 5863-5868.
- Plochmann, K.; Korte, G.; Koutsilieris, E.; Richling, E.; Riederer, P.; Rethwilm, A.; Schreier, P.; Scheller, C., 2007 Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. Archives of Biochemistry and Biophysics, 460, 1-9.
- Prior, R.L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R., 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 3273-3279.
- Rahman, M.A., 2011. Chalcone: A Valuable Insight into the Recent Advances and Potential Pharmacological Activities. Chemical Sciences Journal, 29, 1-16.

- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M., 2001. Farmacologia, 4 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 692p.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G., 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolics acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20, 933-956.
- Riedl, S.J. & Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 897-907.
- Roesler, R.; Catharino, R.; Malta, L.; Eberlin, M.; Pastore, G., 2007. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 104, 1048-1054.
- Salvador, M.J.; Ferreira, E.O.; Mertens-Talcott, S.U.; Castro, W.V.; Butterweck, V.; Derendorf, H.; Dias, D.A., 2006. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Z. Naturforschung*, 61, 19-25.
- Sambrook, J. & Russel, D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3 ed. Cold Spring harbor Laboratory, 88p.
- Santos, M.A.C. & Elisabetsky E., 1999. Etnofarmacologia como ferramenta na seleção de espécies de plantas medicinais para triagem de atividade antitumoral. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2, 7-17.
- Saraste, A. & Pulkki, K., 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45, 528-537.
- Scaffidi, C.; Fulda, S.; Srinivasan, A.; Friesen, C.; Li, F.; Tomaselli, K.M.; Krammer, P.H.; Peter, M.E., 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal*, 17, 1675-1687.
- Schmeda-Hirschmann, G., 1995. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoterapia*, 66, 373-374.
- Shen, K.H.; Chang, J.K.; Hsu, Y.L.; Kuo, P.L., 2007. Chalcone arrests cell cycle progression and induces apoptosis through induction of mitochondrial pathway and inhibition of nuclear factor

- kappa B signaling in human bladder cancer cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 101, 254-261.
- Shih, H.; Pickwell, G.V.; Quattrochi, L.C., 2000. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 373, 287-294.
- Simões, C.M.O. & Guerra, M.P., 2004. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Editora da UFSC, Florianópolis, 1102p.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*, 82, 1107-1118.
- Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A.R.; Simoncic, M.; Knez, Z., 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.
- Sousa, C.M.M.; Silva, H.R.; Vieira-Jr, G.M.; Ayres, M.C.C.; Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H., 2007. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Química Nova*, 30, 351-355.
- Taiz, L. & Zeiger, E., 2004. *Fisiologia vegetal*. 3 ed., Artmed, Porto Alegre, 719p.
- Tavares, W., 1996. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: Tavares W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos*. 2 ed., Atheneu, São Paulo, pp3-13.
- Teodori, E.; Dei, S.; Scapecchi, S.; Gualtieri F., 2002. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MRD) reversing drugs. *II Farmaco*, 57, 385-414.
- Thayer, A., 2003. Bristol-Myers to settle suits. *Chemical & Engineering News*, 81, 6-11.
- Tiberti, L.A.; Yariwake, J.H.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K., 2007. On-line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 100-105.

- Tyler, V.E. 1996. Natural products and medicine: an overview. In: Balick, M.J.; Elisabetsky, E.; Laird, S.A., eds. Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health. Columbia University Press, New York, pp3-10.
- Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C.; Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular Cell Biochemistry*, 266, 37-56.
- Vander-Heiden, M.G.V.; Thompson, C.B., 1999. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology*, 1, 209-216.
- Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D., 1998. Anti-oxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and gram products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.
- Vinson, J.; Jang, J.; Yang, J.; Dabbagh, Y.; Liang, X.; Serry, M.; Proch, J.; Cai, S., 1999. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich low density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2502–2504.
- Wilson, P.G.; O'Brien, M.M.; Heslewood, M.M.; Quinn, C.J., 2005. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. *Plant Systematics and Evolution*, 251, 3-19.
- Wink, M., 1990. Physiology of secondary product formation in plants. In: Charlwood, B.V & Rhodes, M.J.C. Secondary products from plant tissue culture. Oxford University Press, Oxford, pp23–42.
- Wu, X.; Beecher, G.R.; Holden, J.M., Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Prior R.L., 2004. Lipophilic and hydrophilic capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.
- Ye, M.; Han, J.; Chen, H.; Zhen, J.; Guo, D., 2007. Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 18, 82–91.

- Zi, X. & Simoneau, A.R., 2005. Flavokawain A, a novel chalcone from kava extract, induces apoptosis in bladder cancer cells by involvement of Bax protein-dependent and mitochondria-dependent apoptotic pathway and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Research*, 65, 3479–3486.
- Ziegler, U. & Groscurth, P., 2004 Morphological features of cell death. *News Physiology Sciences*, 19, 124- 128.
- Zou, Y.; Lu, Y.; Wei, D., 2004. Antioxidant activity of a flavonoid rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5032-5039.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Dados espectrais da substância isolada e identificada de *Campomanesia adamantium* com atividade antiproliferativa e antioxidante: 2',4'-diidroxí-6'-metoxichalcona (Ca5).

Dados:

RMN  $^1\text{H}$  – 3.92, s, 3H  
5.97, d (2,2), 1H  
6.01, d (2,2), 1H  
7.41, m, 3H  
7.61, m, 2H  
7.75, d (15,6), 1H  
7.91, d (15,6), 1H.

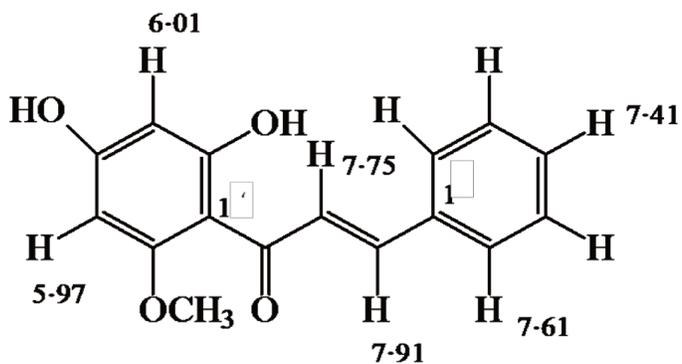
RMN  $^{13}\text{C}$  – 55,7; 91,6; 96,1; 127,7; 128,2; 128,7; 129,9; 141,9; 163,2; 164,9; 167,2; 192,5.

HSQC – correlações

$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
3,92	55,7
5,97	91,6
6,01	96,2
7,41	128,7 e 129,9
7,61	128,2
7,75	141,9
7,91	127,6

HMBC – correlações principais

$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
3,92	163,2
5,97	96,2; 105,8, 163,2 e 164,9
7,41	128,2 e 135,4
7,61	129,9, 141,9
7,91	135,4, 141,9, 192,5



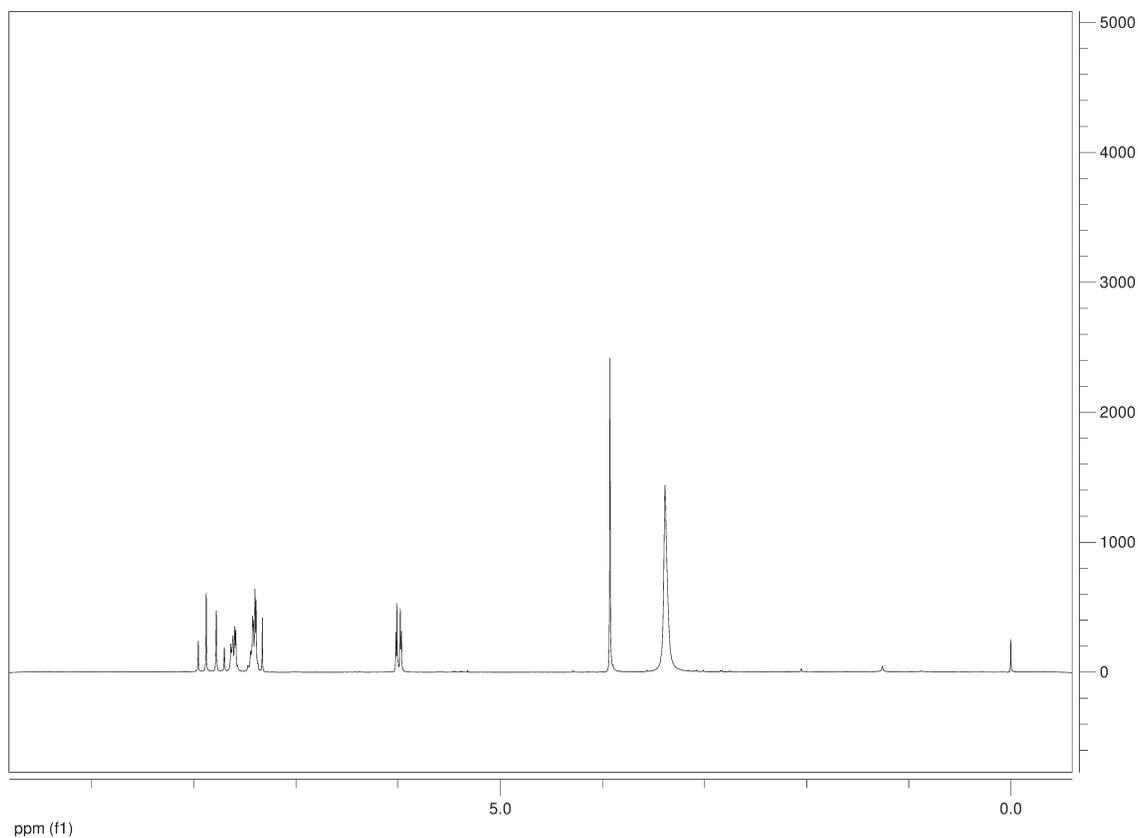
**Figura 1.** Carbonos quaternários: 135,4 (1') e 105,8 (1, observado apenas através do HMBC).

### Espectros da amostra Ca5

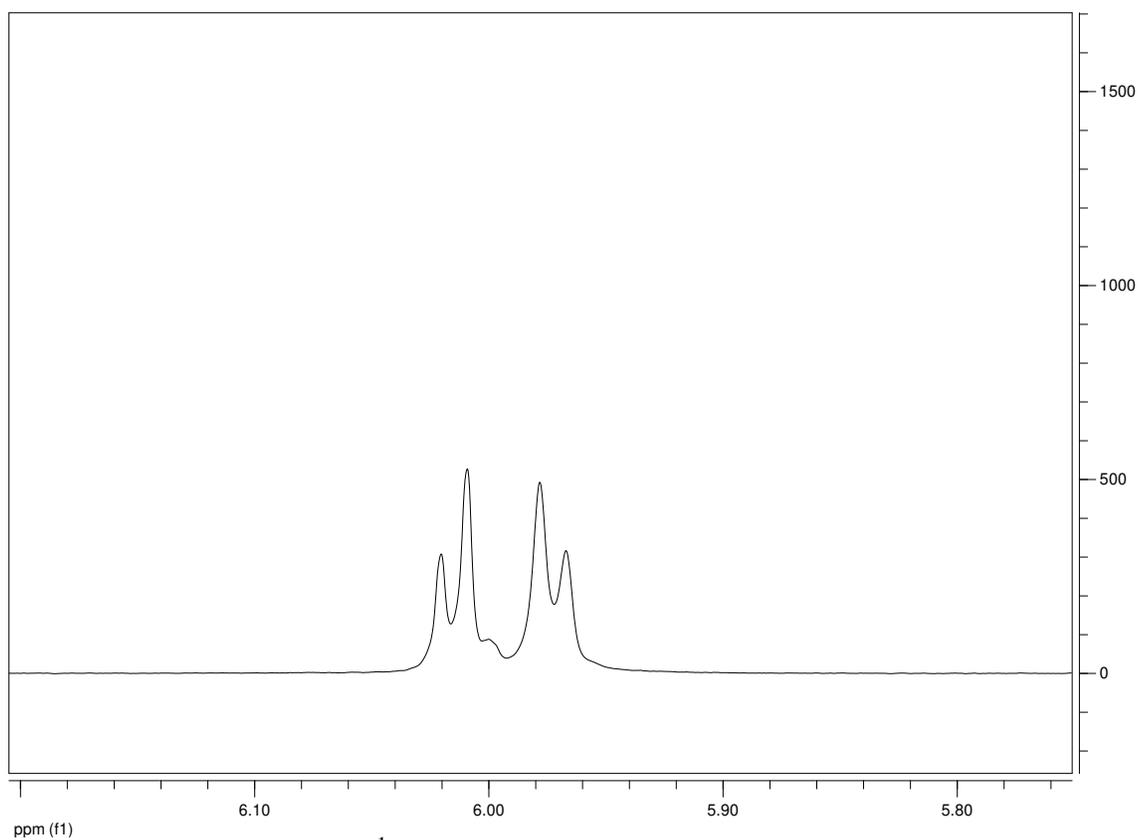
RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C – aparelho operando a 200 e 50 MHz, respectivamente

RMN 2D- aparelho operando a 400 MHz

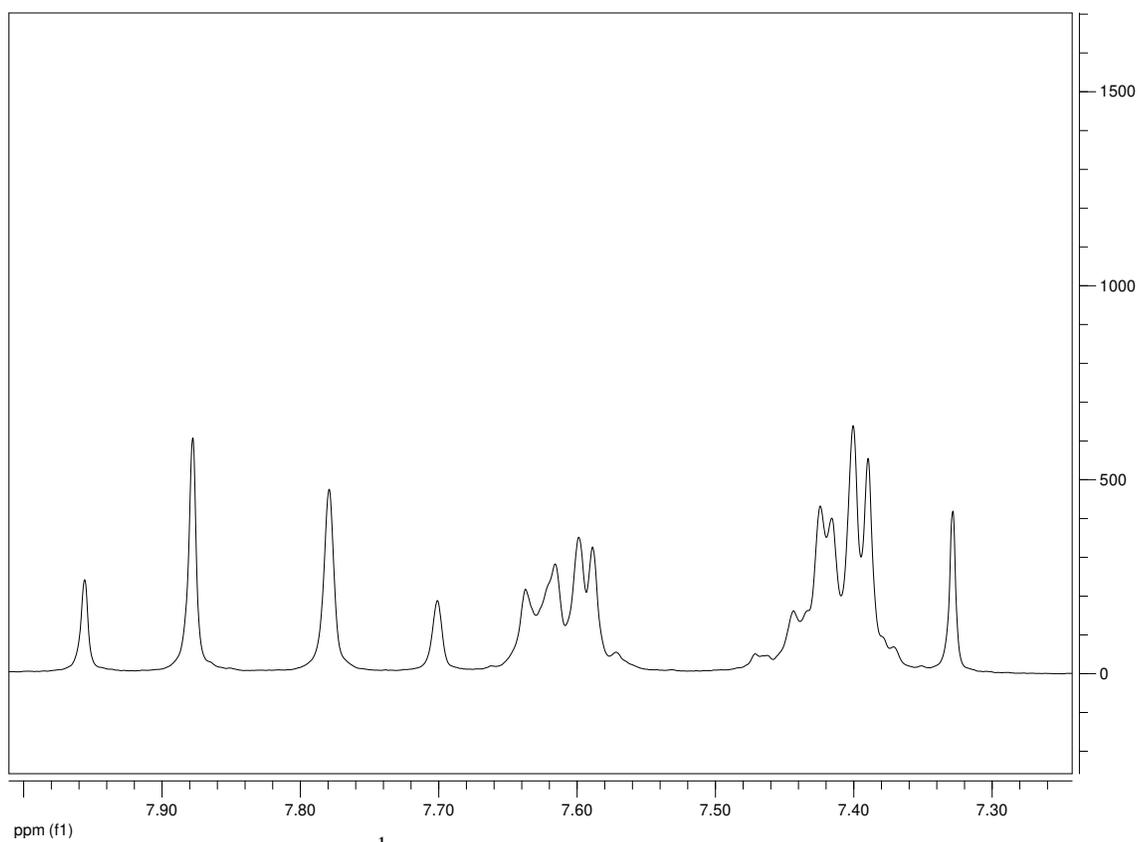
Solvente: CDCl<sub>3</sub> mais acetona-d<sub>6</sub>



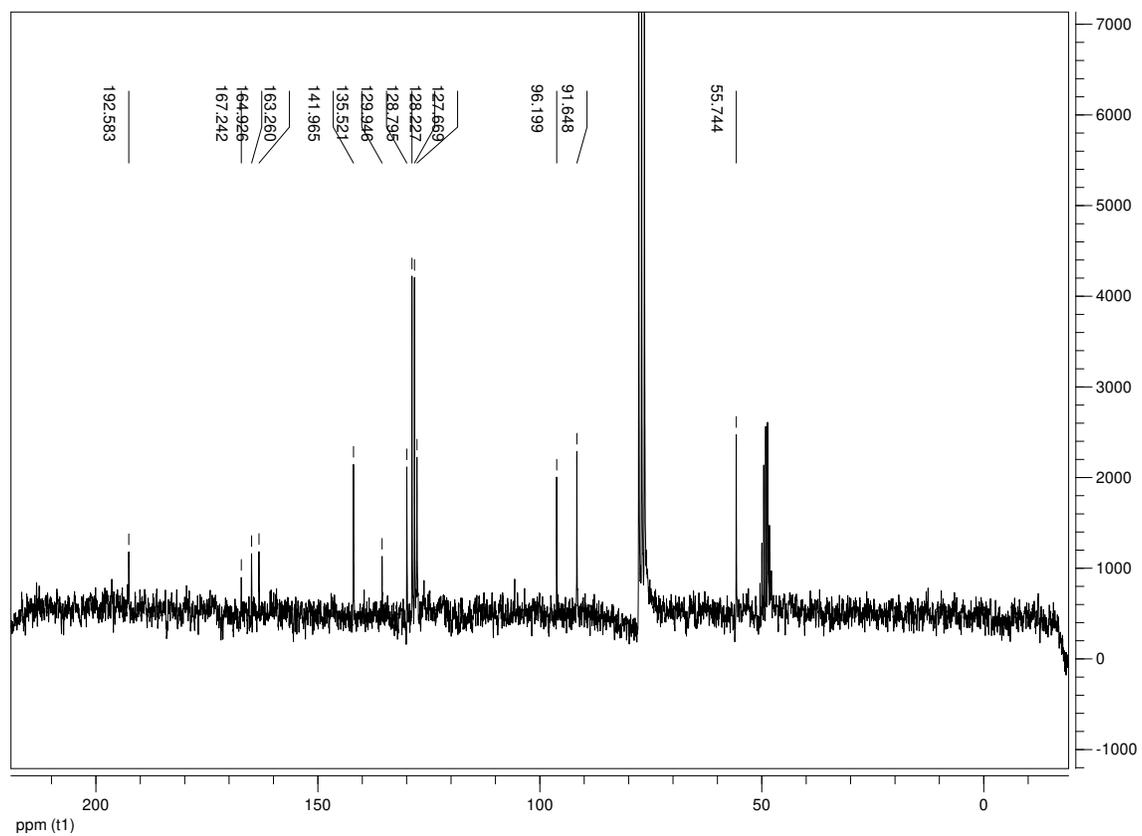
**Figura 2.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H da amostra Ca5.



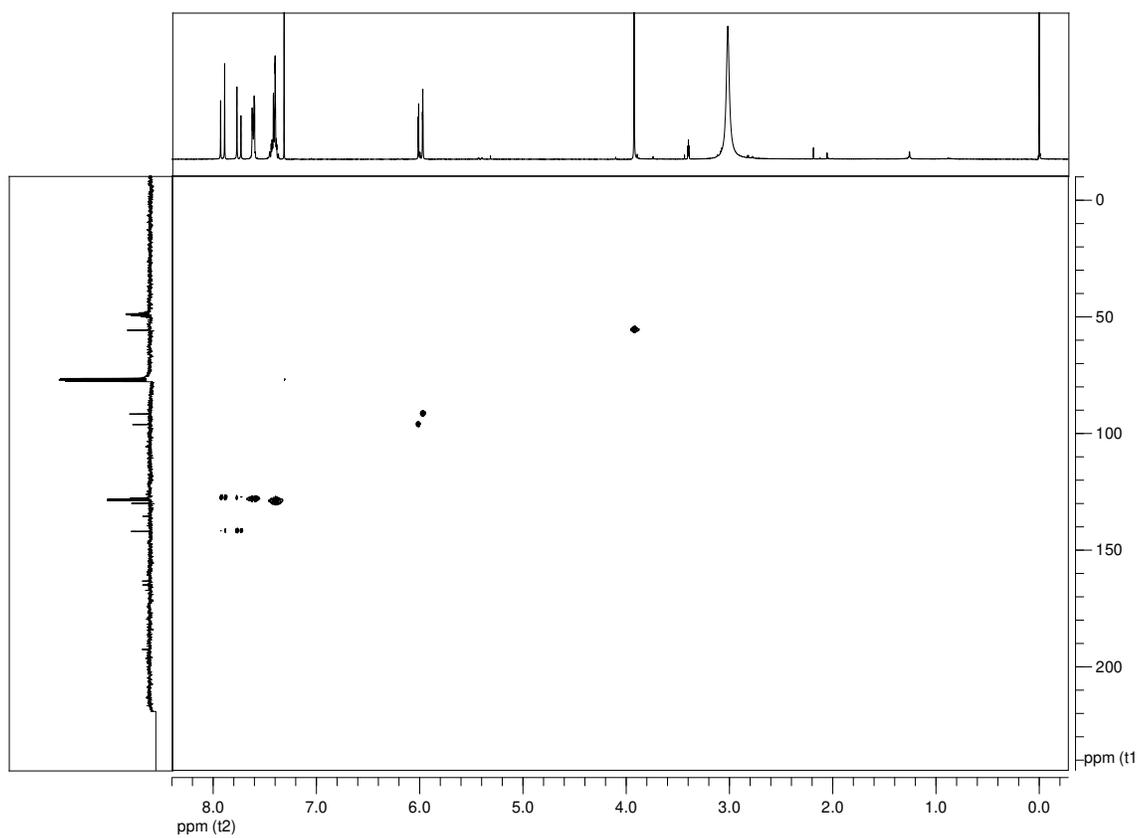
**Figura 3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  – ampliação da 1<sup>a</sup>. região aromática.



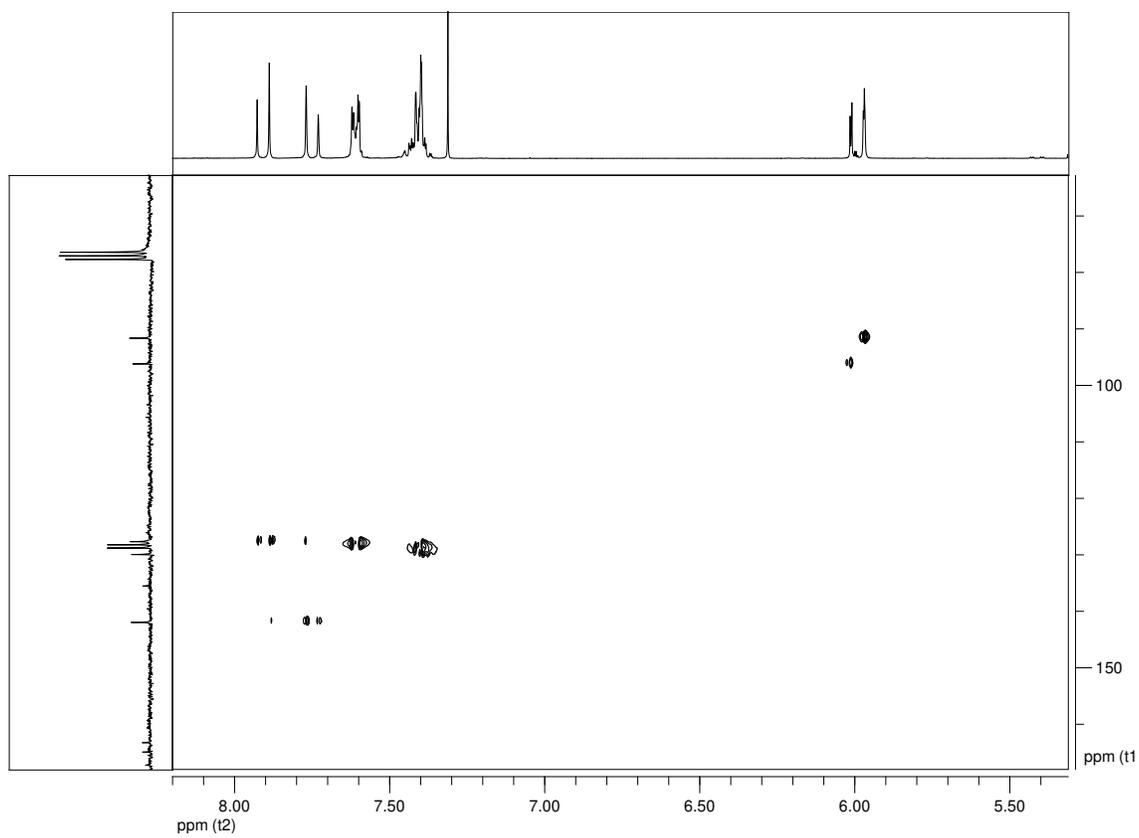
**Figura 4.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Ca5 – ampliação da 2<sup>a</sup> região aromática.



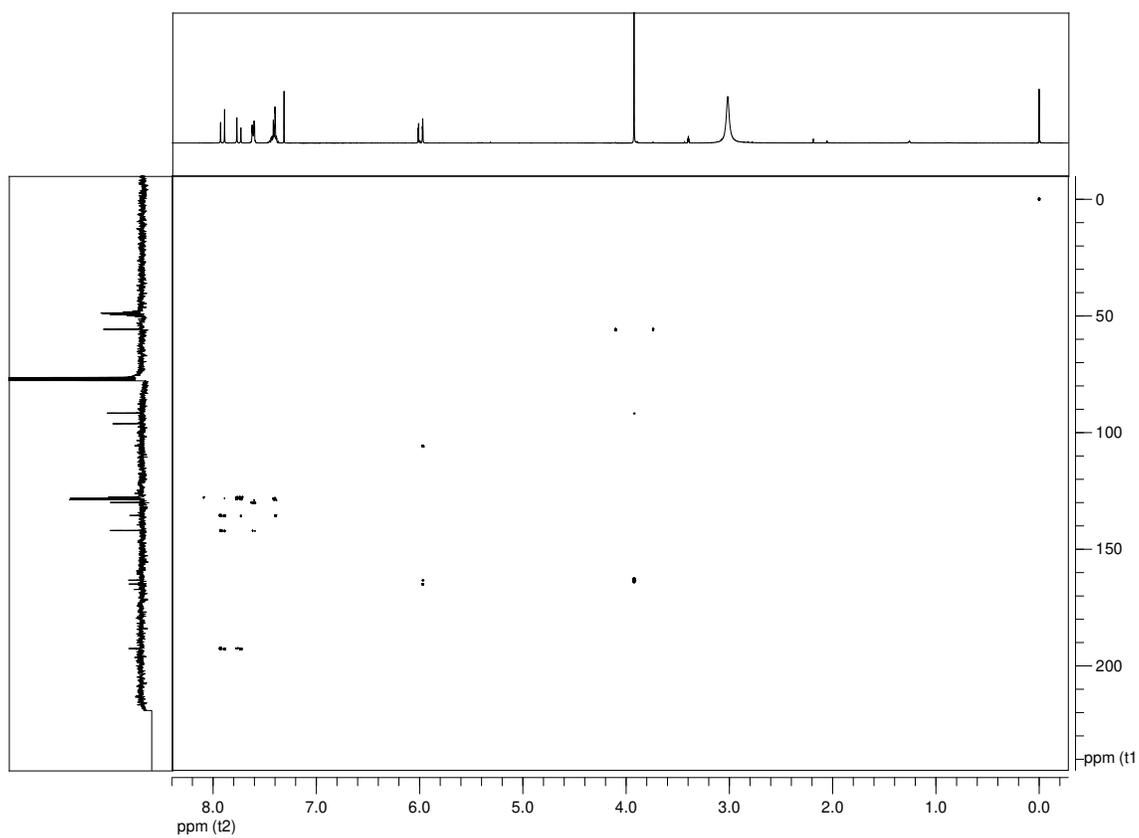
**Figura 5.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da amostra Ca5



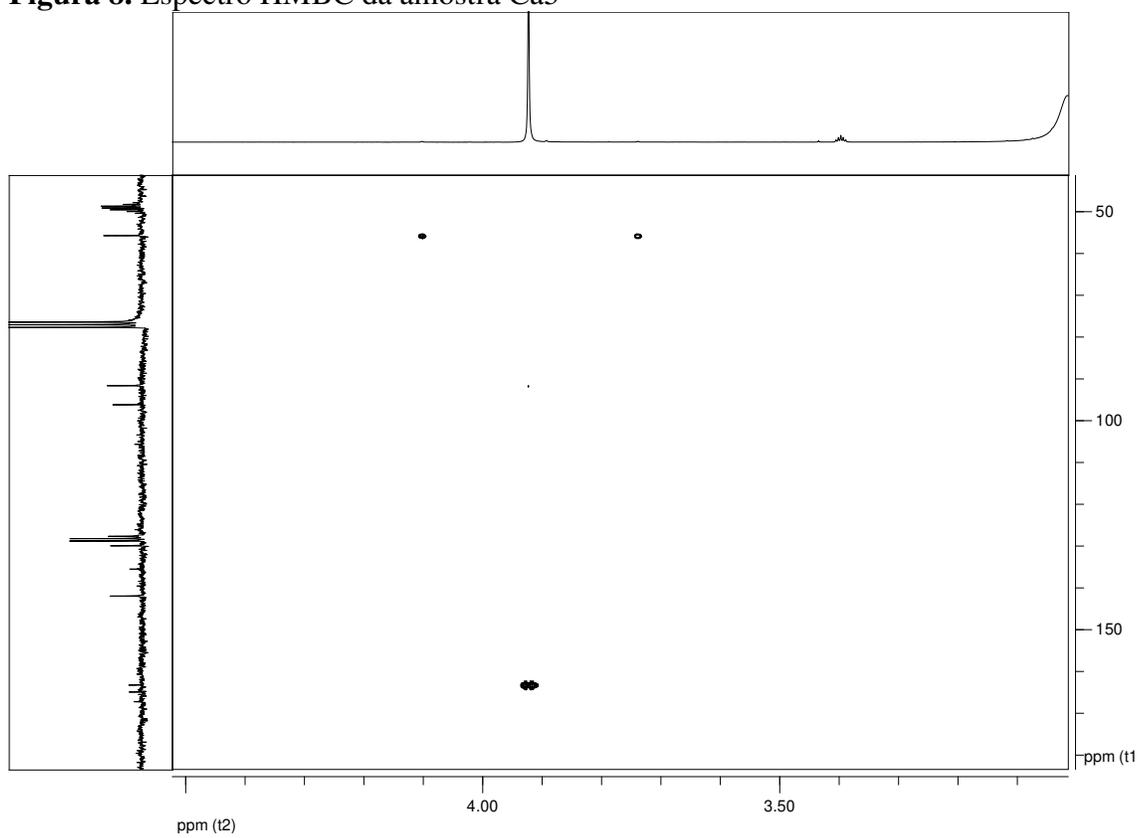
**Figura 6.** Espectro HSQC da amostra Ca5



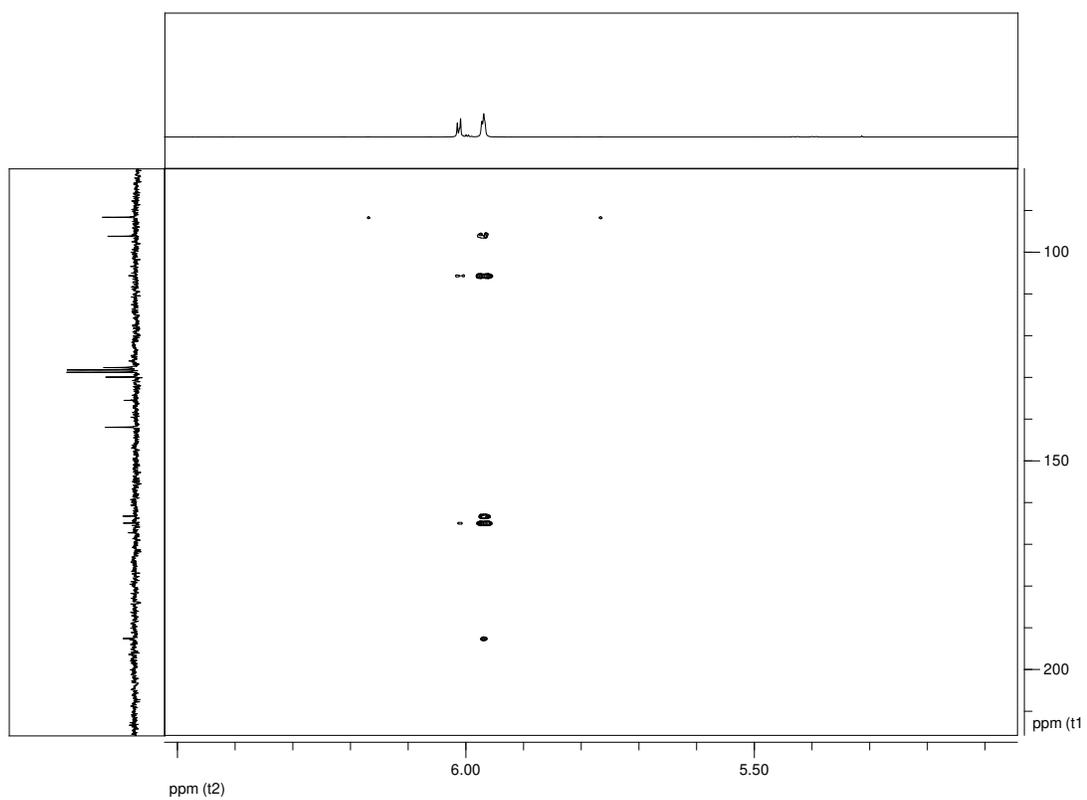
**Figura 7.** Espectro HSQC da amostra Ca5 – ampliação da região aromática



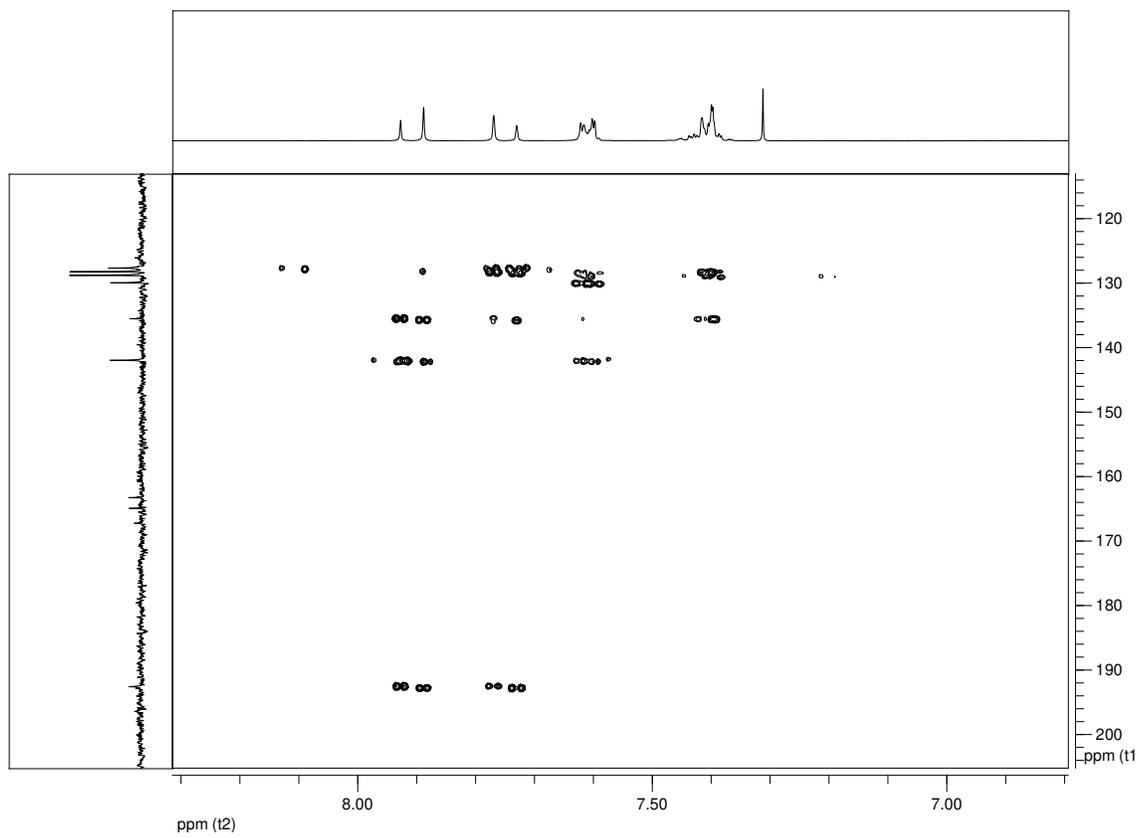
**Figura 8.** Espectro HMBC da amostra Ca5



**Figura 9.** Espectro HMBC da amostra Ca5 – ampliação da região da metoxila.



**Figura 10.** Espectro HMBC da amostra Ca5 – ampliação da 1ª região aromática



**Figura 11.** Espectro HMBC da amostra Ca5 – ampliação da 2ª região aromática

## Free Radical Scavenging Activity, Determination of Phenolic Compounds and HPLC-DAD/ESI-MS Profile of *Campomanesia adamantium* Leaves

Aislan C.R.F. Pascoal<sup>a</sup>, Carlos Augusto Ehrenfried<sup>b</sup>, Marcos N. Ebertin<sup>c</sup>,  
Maria Élide Alves Stefanello<sup>b</sup> and Marcos José Salvador<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Pharmacy School, Department of Plant Biology, Institute of Biology,  
State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 13083-970, Brazil

<sup>b</sup>Department of Chemistry, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, 81531-990, Brazil

<sup>c</sup>Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, State University of Campinas  
(UNICAMP), Campinas, SP, 13083-970, Brazil

marcosjs@unicamp.br

Received: December 10<sup>th</sup>, 2010; Accepted: March 16<sup>th</sup>, 2011

Numerous diseases are induced by free radicals via lipid peroxidation, protein peroxidation and DNA damage. It has been known that a variety of plant extracts have antioxidant activity to scavenge free radicals. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) is a small tree with edible fruit, commonly known as “guavira” or “guabiroba-branca” that has been used in popular medicine as depurative anti-diarrhoeic, anti-inflammatory, anti-rheumatic and to liver diseases. In this study, the antiradical activities of ethanol crude extract of the leaves from *C. adamantium* and the ethyl acetate and butanol fractions obtained by partition, were determined using DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) and ORAC-FL (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assays. The total phenol content in the samples was estimated by Folin Ciocalteu method (FCR). In an initial evaluation the ethanolic extract and the fractions ethyl acetate and butanol have shown levels of phenolic compounds between 15- 74 mg GAE/g in FCR assay, showed DPPH free-radical scavenging activity with  $SC_{50}$  in the range of 7.77-13.35  $\mu$ g/mL and demonstrated antioxidant capacity between 2648-3502  $\mu$ mol TE/g of extract and fractions in the ORAC-FL assay. HPLC-DAD and ESI-MS analysis revealed were that the extract of the leaves of *C. adamantium* studied appears to contain flavonoids as major constituents, including isoquercetrin and quercetin that exhibit proven antioxidant activity.

**Keywords:** radical scavenger, DPPH, Myrtaceae, *Campomanesia adamantium*, HPLC- DAD/ESI-MS.

The organic and inorganic molecules and atoms that contain one or more unpaired electrons, with independent existence, can be classified as free radicals [1]. Free radicals are responsible for lipid peroxydation occurred during production and storage of nutrients [2], and are directly involved in some cancers, cardiovascular disorders, diabetes [3], Alzheimer's disease, atherosclerosis and others human pathologies [4]. The radicals  $O_2^{\bullet}$  and their reduction products,  $H_2O_2$ , and especially the radical  $OH^{\bullet}$ , are some of those responsible for cell damage by promoting lipid peroxidation, with damage to mitochondria, lysosomes and cell membrane itself, leading to cell death. In animal, different biochemical routes involve free radicals formation, but in these cases defense mechanisms against the oxidative process propagation are also involved. These mechanisms do not show a constant efficacy [3]. However, exogenous antioxidant compounds act as an auxiliary function in this defense processes. Antioxidants block the free radicals formation through different ways and establish important control function in some oxidative stress diseases [4] and in food conservation [5]. Thus, new natural antioxidants, mainly those isolated

from medicinal plants, acquire great pharmacological importance and the research on these classes of compounds has been increased in the last years [6-8].

The genus *Campomanesia* (Myrtaceae) comprises around 30 species of shrubs or small trees, aromatic, distributed mainly in tropical and subtropical South America [9]. Most species produce edible fruits that are widely used to make liqueur, juices and jellies [10]. Several species are considered medicinal and have been used in folk medicine mainly against digestive problems and diarrhea [11]. *Campomanesia adamantium* Camb. is a small tree, known as “guavira” or “guabiroba-branca”, largely spread in Brazil. It can be found growing wild in the Midwest, Southeast and South regions of Brazil, and frequently is cultivated in home gardens for its fruits [12]. Its leaves and fruits have been used against rheumatism, liver and urinary diseases [13]. Previous phytochemical studies in *Campomanesia* have reported the identification of quercetin, myricetin and rutin in *C. xanthocarpa* [14] and  $\beta$ -triketone type compounds, named champanones in *C. lineatifolia* [15]. Recently it was reported the isolation of

flavonoids in *C. adamantium* [16,17] as well as the antioxidant activity of extracts and fractions [17,18]. However, these studies were carried on specimens growing in Midwest region that can have a chemical profile different from those growing in other regions of country. These facts prompted us to investigate the antioxidant capacity of the ethanolic extract and fractions of *C. adamantium* from South region of Brazil and, characterize the major constituents responsible for antioxidant activity.

The samples analyzed in the present study showed a total phenol content in the range of 15.78 – 74.83 mg GAE/g extract (Table 1). Phenolic compounds are recognized as one of most important class responsible for antioxidant capacity in plants [19].

Ethanol extract, ethyl acetate and butanol fractions exhibited antioxidant activity concentration-dependent in DPPH assays, with  $SC_{50}$  varying from 7.77 to 13.35  $\mu\text{g/mL}$ . The highest antioxidant activity was exhibited by butanol fraction. In ORAC-FL kinetic assay, based on hydrogen transfer mechanism, the extracts showed antioxidant capacity between 2648 and 3502  $\mu\text{M}$  of TROLOX equivalent per gram of extract (Table 1) In comparison with previous studies [16,18], our extracts and fractions showed higher antioxidant activity and there were chemical differences between *C. adamantium* leaves analyzed in this study of South region of Brazil and *C. adamantium* growing in Midwest region of Brazil [16-18]. The chalcones were previously reported in *C. adamantium* growing in Midwest region of Brazil [16], while the flavonols isoquercitrin, myricetin, quercitrin and quercetin are being reported for the first time in this plant. Myricetin had been already identified in *C. xanthocarpa* [14].

**Table 1:** Total phenol content and antioxidant capacity by the DPPH and ORAC assays of ethanol extract of *Campomanesia adamantium* leaves and its fractions ethyl acetate (EtOAc) and butanolic (BuOH).

Samples	Phenol content <sup>a</sup> (mg of GAE/g) <sup>b</sup>	DPPH assay, $SC_{50}$ <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>c</sup>	ORAC <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) <sup>d</sup>
Ethanol extract	35.04(5.48)	13.00 (5.03)	2648 (1.77) <sup>d</sup>
EtOAc fraction	74.83(10.77)	13.35 (16.85)	3150 (6.66) <sup>d</sup>
BuOH fraction	15.78(15.29)	7.77 (5.00)	3502 (5.71) <sup>d</sup>
Quercetin*	-	12.80 (2.00)	5.62 (0.89) <sup>e</sup>
Isoquercitrin*	-	-	5.21 (1.60) <sup>e</sup>
Trolox*	-	2.55 (1.40)	-

\*Experimental positive controls.

-: not evaluated.

<sup>a</sup>Mean (%RSD, relative standard deviation) of triplicate assays.

<sup>b</sup>Total phenolics data expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram (mg of GAE/g) of extract or fractions.

<sup>c</sup>DPPH assay data expressed as  $SC_{50}$  (concentration that inhibited 50% of the DPPH radical) in micrograms per milliliters ( $\mu\text{g/mL}$ ).

<sup>d</sup>ORAC data expressed as micromol of Trolox equivalents per gram ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) of extract or fractions.

<sup>e</sup>ORAC data expressed as relative Trolox equivalent, mean (%RSD, relative standard deviation) of triplicate assays

The ESI-MS technique has been applied in the analyze of several complex matrix, such as wine, oil, beer and extracts from natural sources. In this study, the samples presented high content of phenolic compounds and were

analyzed by ESI (-)-MS [20-21]. The analysis by ESI(-)-MS showed that major constituents in the samples of *C. adamantium* leaves, including the crude ethanol extract and TLC yellow spot sample, were coincided with the mass of the chalcones 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-chalcone, 2',4'-dihydroxy-5'-methyl-6'-methoxychalcone and, 2',4'-dihydroxy-3',5'-dimethyl-6'-methoxychalcone together with the flavonols isoquercitrin, quercitrin, quercetin, and myricetin (Table 2, Figure 1). Structural analysis of single ions in the mass spectra from extract and fractions were performed by ESI-MS/MS. The compounds were identified by comparison of their ESI-MS/MS fragmentation spectra with fragmentation spectra of the authentic standard samples (compounds 1, 5, 6 and 7) and with literature data [21].

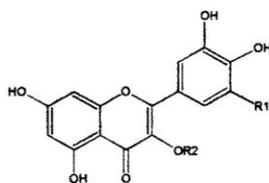
To confirm the presence of the flavonoid isoquercitrin were made the HPLC-UV/DAD analysis of standard isoquercitrin and of the crude extract. We noted the formation of a peak with a retention time coincident with the same pattern and absorption peaks. Furthermore, the identity of major constituent isoquercitrin was also confirmed through co-elution with authentic standard sample. These results are enough to confirm that one of the major constituents and the responsible for antioxidant activity is the flavonoid isoquercitrin, since that the same mass was also found in the analysis of TLC spot yellow sample that was revealed with solution of DPPH.

Thus, the results of the present study suggest that the antioxidant capacity of *C. adamantium* is correlated to the content of flavonoids, including isoquercitrin, which is present in the crude ethanolic extract and TLC spot yellow sample. Moreover, this activity presents a positive correlation with the total phenolic soluble content measured by FCR assay. However, further investigations are necessary to confirm if this plant and its constituents represent a source of powerful antioxidant products useful *in vivo*.

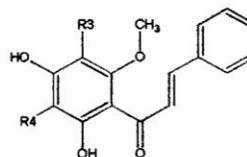
## Experimental

**Plant Material:** The leaves of *Campomanesia adamantium* were collected from wild specimen growing in Curitiba, Paraná State, Brazil (25°25'48" S, 49°16'15" W) at 934 m of altitude. The plant was identified by Dr. Armando Carlos Cervi, which deposited a voucher specimen at the herbarium of UFPR (UPCB 60503).

**Extracts preparation:** The powder was subjected to the process of maceration with ethanol at a ratio of powder / solvent of 1:5 (weight / volume). The ethanolic crude extract was suspended in methanol/water (9:1, v/v) and fractionated by liquid-liquid extraction with hexane and ethyl acetate. The hydroalcoholic phase remaining was partitioned with *n*-butanol and water to afford an *n*-butanol-soluble portion. This procedure yielded the fractions of hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc) and butanol (BuOH).



- 1 Isoquercitrin R1=H, R2=glucose  
 2 Quercitrin R1=H, R2=rhamnose  
 3 Myricetin R1=OH, R2=H  
 4 Quercetin R1=R2=H



- 5 2',4'-dihydroxy-6'-methoxychalcone R3=R4=H  
 6 2',4'-dihydroxy-5'-methyl-6'-methoxychalcone R3=CH<sub>3</sub>, R4=H  
 7 2',4'-dihydroxy-3',5'-dimethyl-6'-methoxychalcone R3=R4=CH<sub>3</sub>

**Figure 1:** Structure of the compounds identified in ethanol extract from the leaves of *Campomanesia adamantium* of the South of Brazil and its fractions

**Table 2:** Compounds identified in ethanol extract from the leaves of *Campomanesia adamantium* and its fractions using ESI(-)-MS/MS.

Compounds	<i>Campomanesia adamantium</i> samples				ESI-MS ions ( <i>m/z</i> )	
	Ethanol extract	EtOAc fraction	BuOH fraction	TLC yellow spot	Deprotonated ions [M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i>	MS/MS ions <i>m/z</i>
1	+	+	+	+	463	25 eV: 463→301, 255, 151
2	+	+	-	+	447	25 eV: 447→301
3	+	-	-	+	317	25 eV: 317→287
4	+	+	+	-	301	25 eV: 301→271, 255
5	+	+	-	+	269	25 eV: 269→253, 226, 198, 184, 177, 165, 150, 139, 122, 108, 97, 94, 65
6	+	+	-	+	283	25 eV: 283→268, 240, 198, 179, 164, 136, 108, 79
7	+	+	-	+	297	25 eV: 297→282, 254, 191, 178, 163, 150, 134, 122

+: detected, -: not detected

**Radical scavenging activity by DPPH assay:** The antiradical activity of extract and fractions of EtOAc and BuOH were determined using the stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) [22]. Fifty microliters of a 250  $\mu$ M DPPH solution in ethanol was added to a range of solutions of different concentrations (seven serial 3-fold dilutions to give a final range of 100 to 1.6  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) of extracts to be tested in ethanol (10  $\mu$ L). Absorbance at 517 nm was determined 20 min after the addition of each of the compounds tested, and the percentage of activity was calculated. Quercetin and Trolox were used as positive controls. The antioxidant activity was expressed as the SC<sub>50</sub> value in  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. All samples were tested in triplicate.

**Evaluation of antioxidant capacity by ORAC assay:** The antioxidant capacity of the ethanolic extract and AcOEt and BuOH fractions were assessed through the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) [23]. In this assay, measures the antioxidant scavenging activity against peroxy radicals using fluorescein as the fluorescent probe. ORAC assays were carried out on a Synergy-2 multi-detection microplate reader system. The temperature of the incubator was set at 37 °C. The data were expressed as micromoles of Trolox equivalents (TE) per gram of extract or fraction on dry basis ( $\mu$ mol of TE/g) and as relative Trolox equivalent for pure compounds. The analyses were performed in triplicate.

**Quantitative determination of total soluble phenols:** The dried ethanolic extract and its EtOAc and BuOH fractions, dissolved in ethanol, were analyzed for their total soluble phenolic content according to the Folin-Ciocalteu colorimetric method [24]. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of

extract or fraction (mg of GAE/g). The analyses were performed in triplicate.

**Separation and analysis of antioxidants on thin layer chromatography:** The sample was applied on TLC and eluted with BAW (butanol: acetic acid: water), after that we sprayed with a solution 500  $\mu$ g/mL of DPPH in ethanol. After solvent evaporation (about 5 minutes), the potential anti-free radical was verified by the appearance of yellow spots on violet background, according to the described in the literature [25]. The yellow spot was scraped, dissolved in methanol, filtered and this was called TLC yellow spot sample.

**HPLC-UV/DAD/ESI-MS profile:** The TLC yellow spot sample, crude extracts and fractions of *C. adamantium* leaves were diluted in a solution containing 50% (v/v) methanol (chromatographic grade), 50% (v/v) deionized water and, 0.5% of ammonium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany). In the fingerprinting ESI-MS analysis, the general conditions were: source temperature of 100 °C, capillary voltage of 3.0 kV and cone voltage of 30 V. For measurements were performed according to the described in the literature [20,21]. Structural analysis of single ions in the mass spectra from extract and fractions were performed by ESI-MS/MS. The ion with the *m/z* of interest was selected and submitted to 25 eV collisions with argon in the collision quadrupole. The compounds were identified by comparison of their ESI-MS/MS fragmentation spectra.

HPLC analyses were conducted using a RP-18 column (Lichrospher<sup>®</sup>, 5  $\mu$ m, 225/4.6 mm, Merck). The mobile phase consisted of a linear gradient combining solvent A

(acetonitrile) and solvent B (water/acetic acid, 99:1, v/v, pH 2.88) as follows: 15% A (15 min), 15-40% A (5 min), 40-60% A (5 min), 60-100% A (5 min), 100-15% A (5 min), 15% A (5 min). The analyses were carried out in triplicate at a flow rate of 0.8 mL/ min and an injection volume of 20  $\mu$ L. UV-DAD detector was set to record between 200 and 600 nm, and the UV chromatograms were measured at 254 and 350 nm. The samples were crude extract and isoquercitrin standard sample at 1mg/mL.

**Statistical analysis:** Data are reported as mean (%RSD, relative standard deviation) of triplicate determinations. The statistical analyses were carried out using the Microsoft Excel 2002 software package (Microsoft Corp., Redmond, WA)

**Acknowledgments** - The authors are grateful to Dr. Armando C. Cervi (UFPR) for plant identification and to FAPESP, CNPq and FAEPEX-UNICAMP for financial support.

## References

- [1] Halliwell B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, **52**, 253-265.
- [2] Singh RP, Chidambara KNM, Jayaprakasha GK. (2002) Studies on the antioxidant activity of Pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 81-86
- [3] Yildrin A, Mavi A, Kara AA. (2001) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4083-4089.
- [4] Allison AC, Cacabelos R, Lombardi VRM, Álvarez XA, Vigo C. (2001) Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **25**, 1341-1357.
- [5] Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z. (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **89**, 191-198.
- [6] Rodrigues PA, Morais SM, Marques MMM, Aguiar LA, Nunes-Pinheiro DCS. (2008) Atividade antioxidante e gastroprotetora de produtos naturais em animais experimentais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **10**, 116-123.
- [7] Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J. (2010) Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules*, **15**, 6905-6930.
- [8] Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. (2010) A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Current Medicinal Chemistry*, **17**, 3262-3288.
- [9] Landrum LR, Kawazaki ML. (1997) The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, **49**, 508-536.
- [10] Lorenzi H, Bacher L, Lacerda M, Sartori S. (2006) *Frutas Brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura*, 1<sup>st</sup> Ed., Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, Brazil, 186 p.
- [11] Cruz AVM, Kaplan MAC. (2004) Medicinal uses of species from Myrtaceae and Melastomataceae families in Brazil. *Floresta e Ambiente*, **11**, 47-52.
- [12] Legrand CD, Klein RM. (1977) Mirtáceas – Campomanesia. In: *Flora Ilustrada Catarinense*. Reitz R. (Ed), Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Brazil, 604-607.
- [13] Scalon SPQ, Lima AL, Scalon-Filho H, Vieira MC. (2009) Seed germination and initial growth of *Campomanesia adamantium* Camb. seedlings: effects of washing, temperature and biostimulant. *Revista Brasileira de Sementes*, **31**, 96-103.
- [14] Schmeda-Hirschmann G. (1995) Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoterapia*, **66**, 373-374.
- [15] Bonilla A, Duque C, Garzon C, Takaishi Y, Yamaguchi K, Hara N, Fujimoto, Y. (2005) Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Phytochemistry*, **66**, 1736-1740.
- [16] Coutinho ID, Coelho RG, Kataoka VMF, Honda NK, Silva JRM, Vilegas W, Cardoso CAL. (2008) Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. *Eclética química*, **33**, 53-60.
- [17] Pavan FR, Leite CQF, Coelho RG, Coutinho ID, Honda NK, Cardoso CAL, Vilegas W, Leite SRA, Sato DN. (2009) Evaluation of anti-mycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Química Nova*, **32**, 1222-1226.
- [18] Coutinho ID, Kataoka VMF, Honda NK, Coelho RG, Vieira MC, Cardoso CAL. (2010) The influence of seasonal variation in levels of flavonoids and antioxidant activity of the leaves of *Campomanesia adamantium*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **20**, 322-327.
- [19] Pietta PG, Simonetti P, Gardana C, Mauri PL. (2000) Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) of *Ginkgo biloba* flavonol and *Camellia sinensis* catechin metabolites. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, **23**, 223-226.
- [20] Roesler R, Catharino R, Malta L, Eberlin MN, Pastore G. (2007) Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **104**, 1048-1054.
- [21] Tiberti LA, Yariwake JH, Ndjoko K, Hostettmann K. (2007) On-line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **18**, 100-105.
- [22] Cuendet M, Hostettmann K, Poterat O, Dyatmko W. (1997) Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, **80**, 1144-1152.
- [23] Salvador MJ, Ferreira EO, Mertens-Talcott SU, Castro WV, Butterweck V, Derendorf H, Dias DA. (2006) Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, **61**, 19-25.
- [24] Piccinelli AL, De Simone F, Passi S, Rastrelli L. (2004) Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (burrito), a folk Paraguayan tea. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 5863-5868.
- [25] Mohamad H, Abas F, Permana D, Lajis NH, Ali AM, Sukari MA, Hin TYY, Kikuzaki H, Nakatani N (2004) DPPH free radical scavenger components from the fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. Ex. Bak. (Zingiberaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, **59**, 811-815.