

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JUSSARA DE MATTOS REBELLO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DE
ANÁLOGOS SINTÉTICOS DA ACETOFENONA E PRÓ-OXIDANTE E
ANTITUMORAL DE CHALCONAS SINTÉTICAS**

Florianópolis

2005

JUSSARA DE MATTOS REBELLO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DE
ANÁLOGOS SINTÉTICOS DA ACETOFENONA E PRÓ-OXIDANTE E
ANTITUMORAL DE CHALCONAS SINTÉTICAS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, da Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Biotecnologia.
Área de concentração: Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa

**Florianópolis
2005**

Rebello, Jussara de Mattos

Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas / Jussara de Mattos Rebello. Florianópolis, 2005. 130 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. Antioxidante. 2. Pró-oxidante. 3. Antitumoral. 4. Antifúngico.
5. Análogos sintéticos da acetofenona. 6. Chalconas sintéticas.

Ao meu esposo, Cesar e ao meu filho Cainã, que entenderam que eu tinha que cumprir esta etapa da minha vida, mesmo que isso implicasse na ausência. Na verdade meu coração sempre esteve presente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por Ser presença constante em minha vida, por não me deixar tropeçar nesta caminhada em busca dos meus objetivos.

A Prof.^a Dr.^a Rozangela Curi Pedrosa, pela oportunidade, por acreditar no meu potencial.

Aos Professores componentes da banca examinadora Dr.^a Patrícia da Silva Melo, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho e Dr.^a Elza Fátima A. Smânia pelo carinho, orientação e auxílio.

Ao Prof. Dr. Adair Roberto S. dos Santos por sua dedicação, por suas considerações e sugestões, por ter sempre me atendido prontamente quando precisei de ajuda.

Aos professores Célia Regina Monte Barardi e Mário Steindel, pelo trabalho competente e responsável que desempenharam junto à coordenação deste programa.

Aos professores Doutores Rosendo A. Yunes, Danilo Wilhelm Filho, Regina V. Antônio por suas considerações e sugestões, pela acolhida em seus laboratórios.

Aos queridos colegas de laboratório, Rubia, Gisele, Débora, Val, Carol e Mari pelo companheirismo e convivência, em especial ao Jean, Lorena e Grazi pela consideração e amizade sincera.

A bolsista Karina, pelas horas agradáveis e por sempre estar pronta a me ajudar com muita dedicação aos experimentos.

Aos amigos do mestrado pela convivência e amizade criada, que tornaram este período muito mais agradável.

Aos mestrandos companheiros de laboratório Karina e Duda, por suas contribuições na elaboração deste trabalho, pela tolerância nos momentos mais difíceis.

As funcionárias Salete, Joanésia, Joice e Ligia pela dedicação com que desempenham suas funções, por terem contribuído na busca de meu objetivo.

Aos meus pais e a minha irmã por torcerem pelo meu sucesso e por me amarem sempre.

Ao Cesar, pela sua ajuda na elaboração deste trabalho, pela tolerância, pelo seu amor incondicional.

Aos amigos e familiares pela torcida e pelo apoio nas horas de desânimo.

“A ciência será sempre uma busca, jamais um descobrimento real. É uma viagem, nunca uma chegada”.

Karl Popper.

RESUMO

A necessidade do desenvolvimento de fármacos com maior eficácia e menores efeitos adversos contra algumas patologias, tem estimulado a procura por novas moléculas protótipo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. A avaliação da atividade pró e antioxidante *in vitro* foram investigadas pelos métodos de captação do radical DPPH e pela medida de proteção da lipoperoxidação (TBARS). A atividade antifúngica dos análogos sintéticos da acetofenona foi avaliada pelo método de microdiluição através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os estudos da atividade antitumoral e pró-oxidante de algumas chalconas sintéticas foram avaliados usando modelo de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) em camundongos inoculados intraperitonealmente, durante nove dias, e a cisplatina foi o fármaco padrão. Foram avaliados os parâmetros como número de células tumorais, porcentagem de células viáveis, medida do volume ascítico total, medida do volume de células compactadas, variação de peso, média de sobrevivência, medida de lipoperoxidação da membrana (FOX, TBARS), fragmentação do DNA, carbonilação de proteínas e concentração de glutathiona (GSH). As acetofenonas testadas, principalmente as trihidroxiladas (Gala e THA), foram mais efetivas na atividade antioxidante *in vitro*, porque foram capazes de captar o radical livre DPPH, ao contrário das chalconas avaliadas, que demonstraram um potencial pró-oxidante. A inibição da peroxidação lipídica foi observada na acetofenona THA e nas chalconas substituídas com grupamento -OH (C14 e C25), grupamento -NO₂ (C15), grupamento -NH₃ (C18) e chalconas com -Br em sua estrutura e substituídas com -CH₃ e -NO₂ (B2 e B3), respectivamente. Os análogos sintéticos da acetofenona apresentaram importante atividade antifúngica. O composto Gala com três hidroxilas na posições 2, 3 e 4 do anel benzênico, mostrou melhor inibição dos fungos filamentosos, sendo muito mais ativo para o *M. canis* que o fármaco padrão fluconazol. As chalconas testadas não apresentaram atividade antitumoral em camundongos com TAE no abdômen e apresentaram atividade pró-oxidante *in vivo*. Diante deste contexto, pode-se concluir que os análogos sintéticos da acetofenona, especialmente a Gala, apresentam um potencial antifúngico promissor como moléculas protótipo para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

Palavras-chave: antioxidante. Pró-oxidante. Antitumoral. Antifúngico. Análogos sintéticos da acetofenona. Chalconas sintéticas.

ABSTRACT

The need of the development of drugs with higher efficacy and fewer adverse effects against same diseases has stimulated the search for new prototypes compounds. The objective of the present work was to evaluate the antioxidant and antifungal activity of the synthetic analogs of acetophenone and prooxidant and the antitumor activity of synthetics chalcones, using models *in vitro* and *in vivo*. The evaluation *in vitro* antioxidant and prooxidant activities were investigated by scavenging DPPH assay and by lipoperoxidation protection (TBARS). The antifungal activity of the synthetics analogs of acetophenone were evaluated by the microdilution method and the minimum inhibitory concentration (MIC) was calculated. The studies *in vivo* antitumor and prooxidant activities of same synthetics chalcones was evaluated using the Ehrlich ascites tumour (EAT) model in mice inoculated intraperitoneally during nine days, using standard drug, cisplatin. Was evaluated the parameters such as ascitic cell counts, viable cell percentage, total ascitic fluid volume, packed cell volume, body weight changes, mean survival time, membrane lipoperoxidation (FOX, TBARS), fragmentation DNA damage, carbonyl protein and glutathione content (GSH). The acetophenones evaluated *in vitro*, especially trihydroxy group (Gala, THA), were more effective antioxidant activity, because were to able of "scavenger" free radical DPPH, in contrast, the chalcones evaluated showed prooxidant potential. The peroxidation lipid inhibiting was observed in the acetophenone THA and in the chalcones substituted with -OH group (C14, C25), -NO₂ group (C15), -NH₃ (C18) and chalcones with -Br in yours structures and substituted with CH₃ e NO₂ (B2, B3), respectively. The synthetics analogs of acetophenone showed important antifungal activity. The compound Gala with three hydroxyls in the position 2,3 and 4 in the ring showed better inhibition of filamentous fungi *M. canis*, it have been more active than standard drug, fluconazole. Against the *C. albicans* the THA was the compound most active. The chalcones not exhibited antitumor activity in EAC-bearing mice but presented *in vivo* prooxidant activity. Ahead of this context, it can be concluded that the synthetic analogs of acetophenone, especially the Gala, present a promising antifungal potential as prototype molecule for the development of new antifungal agents.

Keywords: antioxidant. Prooxidant. Antitumor. Antifungal. synthetic analogs of acetophenone. synthetic chalcones.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio a água. 5
- Figura 2.** Reações de formação do radical hidroxil ($^{\circ}\text{OH}$).5
- Figura 3.** Vias de geração de EROs e mecanismo de defesa enzimática.....6
- Figura 4.** Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da LPO. 10
- Figura 5.** Via de síntese do ergosterol e os sítios de ação de seus principais inibidores..... 23
- Figura 6.** Bases bis Manich, composto derivado da acetofenona..... 27
- Figura 7.** Estrutura química das acetofenonas estudadas e do flavonóide rutina..... 27
- Figura 8.** Estrutura química geral dos flavonóides e de seus precursores, as chalconas, demonstrando a designação dos anéis aromáticos (A, B e C).....29
- Figura 9.** Rota sintética e substituintes dos anéis aromáticos A e B das chalconas estudadas..... 33
- Figura 10.** Estrutura geral e substituintes do anel aromático A das chalconas C11, C12 e C20.....34
- Figura 11.** Rota sintética e substituintes dos anéis A e B dos derivados di-bromados estudados.34
- Figura 12a.** Número total de células tumorais presentes no líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e tratados com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0mg/kg, i.p.).....63
- Figura 12b.** Porcentagem de células tumorais viáveis presentes no líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e tratados com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.). 64
-
-

-
-
- Figura 13a.** Volume total de líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.).... 65
- Figura 13b.** Volume células compactadas (mL), presentes no líquido ascítico, após centrifugação, em camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.).....66
- Figura 14.** Variação de peso (g) de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.).....67
- Figura 15.** Média de sobrevivência de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.).....68
- Figura 16.** Índice de peroxidação lipídica (TBARS; nmol/g) em fígados de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.).69
- Figura 17.** Índice de hidroperóxido lipídico (FOX; CHPE/g) em fígados de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, e C12 (5,0 mg/kg, i.p.).....70
- Figura 18.** Índice de dano ao DNA em sangue total de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com as chalconas C1, C4 e C12 (5,0 mg/kg, i.p.).72
- Figura 19.** Índice de carbonilação de proteínas (nmol/g) em fígados de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com as chalconas C1, C4 e C12 (5,0 mg/kg, i.p.).73
- Figura 20.** Concentração de GSH hepática (mM) em fígados de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.).....74
- Figura 21.** Atividade da AST (UI) em fígados de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13 (5,0 mg/kg, i.p.).....75
-
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.

Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas formas de radicais e não radicais.....04

Tabela 2.

Principais fungos que infectam o homem e suas enfermidades..... 22

Tabela 3.

Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada..... 48

Tabela 4.

Avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e da rutina através da medida da capacidade de captação do radical DPPH testadas em concentrações crescentes dos compostos (5, 10, 25, 50, 125, 250 µg/mL)..... 55

Tabela 5.

Avaliação da atividade antioxidante de chalconas sintéticas e da rutina através da medida da capacidade de captação do radical DPPH testadas em concentrações crescentes dos compostos (5, 10, 25, 50, 125, 250 µg/mL).....56

Tabela 6.

Avaliação da atividade antioxidante dos análogos da acetofenona e da rutina através da medida da proteção à lipoperoxidação em homogenato de fígado de rato avaliada em termos de TBARS, testadas em concentrações crescentes dos compostos (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL)..... 59

Tabela 7.

Avaliação da atividade antioxidante de chalconas sintéticas e da rutina através da medida da proteção a lipoperoxidação em homogenato de fígado de rato avaliada em termos de TBARS, testadas em concentrações crescentes dos compostos (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL).....60

Tabela 8.

Freqüência das diferentes classes de dano de cometas observados no sangue total de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com as chalconas C1, C4 e C12 (5,0 mg/kg, i.p.).....71

Tabela 9.

Determinação da atividade antifúngica de análogos da acetofenona e do fluconazol pelo método de microdiluição em placas com a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHT	-Hidroxitolueno butilado
CAT	-Catalase
CE ₅₀	-Concentração efetiva 50%
CEUA	-Comissão de ética no uso de animais
CHPE	-Equivalentes de cumeno hidroperóxido
CIM	-Concentração inibitória mínima
Cis-DDP	-Cis-diaminodicloroplatinum
CN	-Controle normal
CPN	-Cisplatina
DMSO	-Dimetilsulfóxido
DNA	-Ácido desoxirribonucleico
DNPH	-2,4- dinitrofenilhidrazina
DO	-Densidade óptica
DPPH	-1,1 difenil-2-picril hidrazina
DTNB	-5,5' ditiobis-2-ácido nitrobenzoico
E.P.M.	-Erro padrão da média
EDTA	-Ácido etilenodiaminotetraacético
ERNs	-Espécies reativas de nitrogênio
EROs	-Espécies reativas de oxigênio
FeSO ₄	-Sulfato ferroso
<i>g</i>	-Giros
g	-Grama
GPx	-Glutathione peroxidase
GR	-Glutathione reductase
GSH	-Glutathione reduzida
GSSG	-Glutathione oxidada
GST	-Glutathione S-transferase
H ₂ O	-Água
H ₂ O ₂	-Peróxido de hidrogênio
HCl	-Ácido clorídrico
HOCl	-Ácido hipocloroso
i.p.	-Intra peritoneal
KCl	-Cloreto de potássio
Kg	-Kilograma
L [•]	-Radical livre de ácido graxo centrado no carbono
LH	-Ácido graxo
LOO [•]	-Radical peroxil
LMPA	-Agarose de baixo ponto de fusão
LOOH	-Hidroperóxido de ácido graxo
LPO	-Lipoperoxidação
MDA	-malondialdeído
mg	-Miligrama

min	-Minutos
mL	-Mililitro
mm	-Milimolar
NaCl	-Cloreto de sódio
NADPH	-Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NBT	-Nitrilo blue tetrazolium
Nm	-Nanômetro
Nmol	-Nanomol
NMPA	-Agarose de ponto de fusão normal
NO [•]	-Oxido nítrico
NTA	-Ácido nitrilo acético
O ₂	-Oxigênio molecular
PBS	-Salina tamponada com fosfato
RL	-Radical Livre
sa	-Sem atividade
SOD	-Superóxido dismutase
β	-Beta
TAE	-Tumor ascítico de Ehrlich
t-BuOOH	- hidroperóxido de terc-butila
TBA	-Ácido tiobarbitúrico
TBARS	-Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	-Ácido tricloroacético
v	-Volume
XO	-Xantina oxidase
α	-Alfa
μL	-microlitros
¹ Δ _g	- Oxigênio singleto
(O ₂ ^{•-})	-Ânion superóxido
•OH	-Radical hidroxil
° C	-Graus Celsius

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas e siglas	xiv
Sumário	xvi
1	Introdução..... 01
1.1	Estresse oxidativo e defesas antioxidantes 03
1.1.1	Radicais Livres..... 03
1.1.2	Defesa antioxidante não enzimática..... 07
1.1.3	Estresse oxidativo..... 08
1.2	Câncer e atividade antitumoral..... 11
1.2.1	Aspectos Gerais..... 12
1.2.2	Fisiopatologia do câncer..... 14
1.2.3	Tumor ascítico de Ehrlich (TAE)..... 16
1.2.4	Atividade antitumoral de produtos naturais semi-sintéticos e sintéticos 17
1.3	Fungos patogênicos e atividade antifúngica..... 20
1.3.1	Fungos patogênicos..... 20
1.3.2	Atividade antifúngica..... 22
1.4	A pesquisa de novos fármacos..... 25
1.4.1	Compostos fenólicos..... 25
1.4.2	Chalconas..... 29
2	Objetivos..... 35
2.1	Objetivo Geral..... 35
2.2	Objetivos Específicos..... 35
3	Metodologia..... 37
3.1	Materiais e Reagentes..... 37
3.2	Animais..... 38

3.3	Fungos.....	38
3.4	Estratégia experimental.....	39
3.5	Avaliação da atividade antioxidante “ <i>in vitro</i> ”.....	39
3.5.1	Determinação da capacidade de captação do radical DPPH.....	39
3.5.2	Proteção da peroxidação lipídica.....	40
3.6	Avaliação da atividade antitumoral de chalconas sintéticas.....	41
3.6.1	Tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	41
3.6.2	Protocolo experimental.....	42
3.6.3	Avaliação da viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de trypan.....	43
3.6.4	Avaliação da medida do volume ascítico.....	43
3.6.5	Avaliação da média de sobrevivência.....	43
3.6.6	Avaliação da variação de peso.....	44
3.7	Atividade antioxidante “ <i>in vivo</i> ”.....	44
3.7.1	Protocolo experimental.....	44
3.7.2	Avaliação do dano à membrana celular.....	45
3.7.2.1	Medida da lipoperoxidação pelo TBARs.....	45
3.7.2.2	Medida da lipoperoxidação pelo FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja).....	46
3.7.2.3	Avaliação do dano ao DNA.....	47
3.7.2.4	Avaliação do dano oxidado a proteínas.....	49
3.7.3	Determinação da Glutathiona reduzida (GSH).....	50
3.7.4	Marcadores da função hepática.....	50
3.7.4.1	Determinação da atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST).....	50
3.8	Avaliação da atividade antifúngica dos análogos da acetofenona.....	51
3.8.1	Preparo do inóculo fúngico.....	51
3.8.2	Determinação da concentração inibitória mínima.....	52
3.9	Análise estatística.....	53
4	Resultados.....	54

4.1	Avaliação “ <i>in vitro</i> ” da atividade antioxidante das acetofenonas e chalconas sintéticas em estudo.....	54
4.1.1	Avaliação da capacidade de captação do radical DPPH.....	54
4.1.2	Avaliação da proteção a peroxidação lipídica em homogenato de fígado de rato.....	58
4.2	Avaliação da atividade antitumoral e pró-oxidante das chalconas sintéticas.....	62
4.2.1	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	62
4.2.1.1	Número total de células tumorais e porcentagem de células viáveis....	62
4.2.1.2	Volume ascítico total e de células compactadas	65
4.2.1.3	Variação de peso.....	67
4.2.1.4	Média de sobrevivência.....	68
4.2.2	Avaliação da atividade pró-oxidante <i>in vivo</i> associada ao TAE.....	68
4.2.2.1	Avaliação do dano à membrana celular.....	68
4.2.2.1.1	Avaliação da lipoperoxidação tecidual pelo TBARS.....	69
4.2.2.1.2	Avaliação de hidroperóxido lipídico pelo FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja).....	70
4.2.2.2	Medida de dano ao DNA.....	71
4.2.2.3	Avaliação do dano oxidativo a proteínas por carbonilação.....	73
4.2.2.4	Defesas antioxidantes (tióis não protéicos) GSH hepática	74
4.3	Marcadores da função hepática.....	75
4.3.1	Determinação da atividade da aspartato amino transferase.....	75
4.4	Avaliação da atividade antifúngica dos análogos da acetofenona.....	76
5	Discussão	78
6	Conclusões	95
7	Perspectivas	96
	Referências	97

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem ocorrido um aumento na aplicação dos conhecimentos sobre produtos naturais na química combinatória e vice-versa na pesquisa de novos fármacos. As estruturas dos produtos naturais servem como inspiração para novas sínteses, como modelo estrutural para análogos bioativos ou moléculas híbridas e como base para a preparação de bibliotecas combinatoriais, aumentando a chance de se encontrar potentes atividades biológicas (BREINBAUER et al., 2002; NIELSEN, 2002).

Uma grande conquista na área da pesquisa de novos fármacos, nos últimos 30 anos, foi a introdução de sistemas biológicos *in vitro* em grande escala, os quais podem testar atividades de várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo executar facilmente as repetições dos experimentos propiciando uma análise estatística dos resultados. Os sistemas de ensaio *in vitro* são, freqüentemente, baseados na utilização de culturas de células, de ensaios bioquímicos, de sistemas enzimáticos ou de receptores clonados. Os grupos de pesquisadores, nas indústrias farmacêuticas ou na academia, podem utilizar estes ensaios rotineiramente para a pesquisa de um grande número de amostras de produtos da química combinatória, de metabólitos secundários de coleções de organismos da biosfera e do fracionamento de extratos de produtos naturais (HOUGHTON, 2000).

A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, que sejam efetivos contra algumas patologias ainda sem tratamento adequado, e que possam substituir os existentes, porém a custos menores e dotados de menores efeitos adversos, tem impulsionado a comunidade científica a novas e incessantes pesquisas nesta área. A

resposta a esta demanda crescente por substâncias estruturalmente inovadoras para a avaliação farmacológica estabeleceu um novo paradigma na busca por compostos protótipo e na otimização dos já existentes. Sabe-se hoje, que mais de 50% dos fármacos disponíveis no mercado são oriundos de processos de síntese orgânica, sendo que muitos dos avanços nesta área se referem à capacidade de produção e diversidade dos medicamentos produzidos (DIAS; CORRÊA, 2001). Cabe ressaltar, porém, que muitos destes fármacos são oriundos de protótipos advindos de produtos naturais, especialmente de plantas, que têm, ao longo dos anos, possibilitando a descoberta de inúmeras moléculas bioativas (CECHINEL, 2000). Muitas classes de compostos orgânicos têm demonstrado promissores efeitos biológicos e a literatura científica relata um crescimento significativo de novas moléculas com potência similar ou superior àquela de um fármaco, sendo que muitos deles encontram-se em estudos pré-clínicos e clínicos avançados e pormenorizados (CECHINEL et al., 2003).

Dentro deste contexto o presente trabalho se propôs a dar continuidade a estudos já existentes no Laboratório de Bioquímica Experimental-LABIOEX sobre algumas atividades biológicas de duas classes de compostos de origem sintética, acetofenonas e chalconas, cujos protótipos são de larga ocorrência nas plantas, particularmente avaliando as atividades antioxidante, antitumoral e antifúngica.

1.1 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

1.1.1 Radicais livres

Nos átomos, os elétrons ocupam uma região no espaço conhecida como orbitais. Cada orbital pode ter no máximo dois elétrons com *spins* em direções opostas. Para que uma molécula permaneça estável é necessária a presença de elétrons pareados na sua órbita externa. Entretanto essa falta de paridade formam moléculas altamente instáveis, de vida média muito curta, os radicais livres.

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa, geralmente formado pela perda ou ganho de elétrons (oxirredução) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Em meio biológico a maioria das moléculas não se encontra na forma de radicais, permanecendo com elétrons pareados, entretanto em determinadas situações os RL, também denominados de espécies reativas são formados e podem causar efeito fisiológico e patológico (OLSZEWER, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As espécies reativas é um termo coletivo que inclui as espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como outras espécies reativas, como por exemplo de nitrogênio (ERNs). Pode-se observar na tabela 1. “Reativo” não é sempre um termo apropriado uma vez que H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e óxido nítrico (NO^{\bullet}) reagem diretamente com poucas moléculas no corpo humano, enquanto $^{\bullet}OH$ pode reagir com qualquer molécula (HALLIWELL, 2001).

Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas formas de radicais e não radicais.

Espécies reativas de oxigênio (EROs)	
Radicais	Não radicais
Superóxido ($O_2^{\bullet -}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Hidroxil ($^{\bullet}OH$)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Peroxil (RO_2^{\bullet})	Ácido hipobromoso ($HOBr$)
Alcoxil (RO^{\bullet})	Ozônio (O_3)
Hidroperoxil (HO_2^{\bullet})	Oxigênio singleto ($^1\Delta_g$)
Espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	
Radicais	Não radicais
Óxido nítrico (NO^{\bullet})	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet})	Alquil peroxinitrito ($ROONO$)

Fonte: Adaptada de Halliwell, 2001.

O oxigênio é essencial à vida dos organismos aeróbios, porém, sua presença é contraditória. Sua função predominante nos eucariontes é servir como último acceptor de elétrons na respiração mitocondrial, quando será finalmente reduzido a água durante o complexo processo de fosforilação oxidativa. O oxigênio também é responsável pela degradação química de inúmeras macromoléculas no sistema biológico (DAVIES, 1994). A redução completa do oxigênio a água requer 4 elétrons, e essa redução produz seqüencialmente do começo ao fim 3 produtos de redução (DI GIULIO et al., 1995).

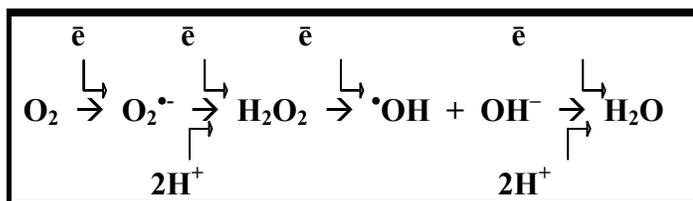


Figura 1. Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio a água. Adaptada de Nordberg e Arnèr, 2001.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas através da redução parcial do oxigênio até a água através de sucessivas reações (figura 1). A transferência de um elétron para o O_2 produz o primeiro intermediário reativo, o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), o qual sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que não é um RL. O H_2O_2 sofre uma reação de quebra das ligações entre os átomos de O_2 formando o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), catalisada por metais de transição (reação de Fenton), ou pela combinação do $\text{O}_2^{\bullet -}$ com o H_2O_2 (Haber-Weiss) (figura 2), (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

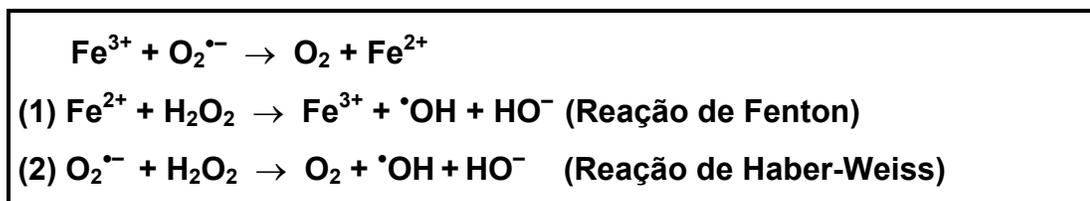


Figura 2. Reações de formação do radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$). Adaptada de Halliwell; Gutteridge, 1999.

A formação do ânion superóxido $\text{O}_2^{\bullet -}$, originado pela adição de um elétron ao oxigênio molecular (O_2), é mediado por enzimas como as NAD(P)H oxidases e xantina oxidase (XO), não enzimaticamente por compostos redox-reativos, tais como as semi-ubiquinonas da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. A enzima superóxido

dismutase (SOD) converte enzimaticamente o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . Nos tecidos, $O_2^{\bullet-}$ também pode ser convertido não enzimaticamente em H_2O_2 e $^1\Delta_g$, (DROGE, 2002). Na presença de metais de transição livres (particularmente ferro ou cobre), $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 podem gerar o radical $\bullet OH$, que é extremamente reativo (reações de Fenton e Haber-Weiss) (Figura 2). Alternativamente, H_2O_2 pode ser convertido em H_2O , pelas enzimas catalase (CAT) ou glutaciona peroxidase (GPx). Na reação da GPx, glutaciona (GSH) é oxidada a glutaciona dissulfídio (GSSG), que pode ser novamente convertida a GSH pela glutaciona redutase (GR) em um processo que consome NADPH (Figura 3), (DROGE, 2002; HADDAD, 2002).

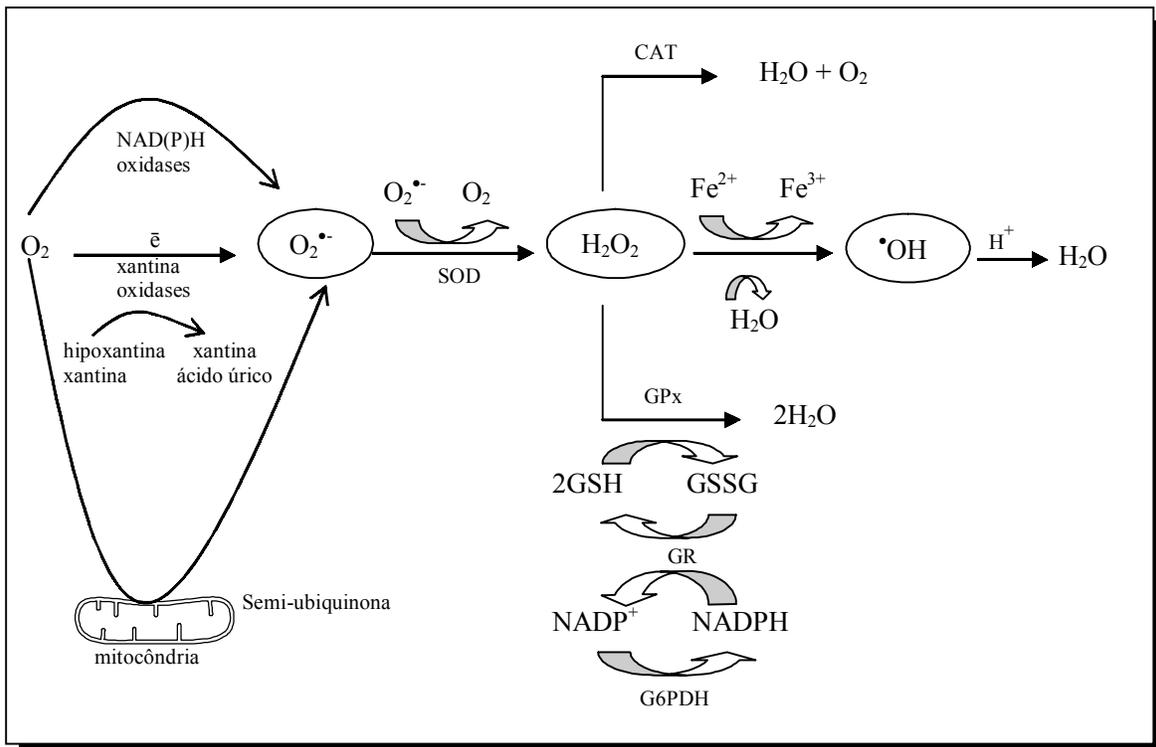


Figura 3. Vias de geração de EROs e mecanismo de defesa enzimática. Adaptada de Droge, 2002; Haddad, 2002; Becker, 2004.

O mecanismo de geração das EROs em sistemas biológicos pode ocorrer por inúmeras reações bioquímicas, sendo que quatro deles têm recebido maior atenção: o sistema de β -oxidação peroxisomal, as reações do citocromo P450, a geração de NO^\bullet e HOCl no processo fagocítico e a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, onde se acredita ocorrer o mecanismo responsável pela produção da maior parte dos RL no organismo (BECKMAN; AMES, 1998; PRESTON et al., 2001).

Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação das EROs, os organismos aeróbicos foram dotados ao longo do tempo evolutivo de distintas defesas antioxidantes. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes ser enzimáticos como SOD, CAT e GPx, ou não enzimáticos, tais como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

1.1.2 Defesa antioxidante não enzimática

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparada com o substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir a oxidação deste substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A GSH, um tripeptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol celular não protéico, mais abundante em células eucariotas e desempenha um importante papel em muitos tipos de reações de bio-redução e conjugação, como:

integridade do citoesqueleto, síntese de proteína e de DNA, transporte de aminoácidos, capacidade de captar ou seqüestrar radicais livres, transdução de sinais, cofator de enzimas essenciais e defesa contra moléculas oxidantes e xenobióticos potencialmente tóxicos (PEÑA *et al.*, 2000; STEHBENS, 2003). Este tripeptídeo pode prover proteção contra todas as formas de estresse oxidativo através de pelo menos dois mecanismos: i) nos primeiros momentos do dano oxidativo, GSH pode agir bloqueando o potencial tóxico das EROs; ii) pode também ajudar a ativar muitos genes que têm função de extinguir o dano oxidativo (NEBERT, 2000; STEHBENS, 2003).

Além dos antioxidantes clássicos presentes em concentrações consideradas relativamente baixas, existem compostos que possuem pequena atividade antioxidante, mas quando presentes em altas concentrações, podem contribuir para capacidade antioxidante total, dentre eles podemos citar bilirrubina e os compostos fenólicos (DROGE, 2002).

O desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e o sistema de defesa antioxidante endógeno é o fator predominante que pode causar uma série de mudanças fisiológicas, chamadas de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

1.1.3 Estresse Oxidativo

Em organismos aeróbios saudáveis a relação entre a produção de EROs e ERNs com os sistemas de defesas antioxidantes, estão aproximadamente em equilíbrio. Entretanto, esse equilíbrio nem sempre é perfeito. O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante / antioxidante, em favor da

situação pró-oxidante, promovendo um dano potencial (SIES, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O efeito do estresse oxidativo pode resultar em três diferentes processos: **i)** adaptação por regulação do sistema de defesa antioxidante; **ii)** injúria tecidual, podendo causar dano a qualquer molécula alvo (DNA, proteínas e lipídios); **iii)** morte celular por necrose ou apoptose (HALLIWELL, 2001).

As EROs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; MEAGHER; FITZGERALD, 2000). Nas proteínas, as EROs podem reagir diretamente com as mesmas ou podem reagir com moléculas como lipídios e carboidratos, gerando produtos que podem reagir com as proteínas. Tanto a ligação peptídica quanto as cadeias laterais podem ser o alvo do ataque de EROs (LEVINE, 2002).

Com respeito ao DNA, estudos associam a fragmentação deste causada pelo estresse oxidativo sob condições de depleção de GSH com apoptose ou necrose (HIGUCHI, 2003). A modificação oxidativa das bases do DNA pode resultar em mutação, ao passo que a oxidação das unidades de desoxirribose pode induzir a liberação de bases ou quebra nas fitas de DNA (ZWART *et al.*, 1999).

Considera-se que a fragmentação do DNA sob condições de depleção de GSH ocorrerá por dois mecanismos: **i)** radicais livres lipídicos produzidos a partir dos ácidos graxos poliinsaturados (tanto na membrana plasmática quanto nuclear) podem diretamente atacar o DNA presente na cromatina do núcleo. **ii)** a lipoperoxidação (LPO) em uma célula causa a perda da integridade da membrana celular e pode tornar o ambiente favorável ao ataque ao DNA da cromatina por outros tipos de radicais de

oxigênio. O radical $\cdot\text{OH}$ pode inicialmente causar quebra da fita simples do DNA, e posteriormente levar a quebra da fita dupla do DNA (HIGUCHI, 2003).

A LPO, utilizada como um sinal do estresse oxidativo celular e auxiliar no reconhecimento de danos oxidativos em organismos com algumas patologias (SEVANI; URSINI, 2000), ocorre em uma seqüência de reações já conhecida. No passo inicial, um átomo de hidrogênio é seqüestrado do ácido graxo contendo ao menos duas duplas ligações separadas por metilenos intercalados (LH), originando um radical livre centrado no carbono (radical lipídico) ($\text{L}\cdot$) com um rearranjo das duplas ligações (conjugação de dienos). Seguido pela interação do $\text{L}\cdot$ com o oxigênio molecular (O_2), para formar um radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$), que pode então retirar um átomo de hidrogênio tanto do LH adjacente (induzindo uma reação de propagação), como de outro doador de hidrogênio, como por exemplo, um antioxidante (figura 4) Em ambas as circunstâncias, um hidroperóxido de ácido graxo (LOOH) é formado (ERNSTER; HOCHSTEIN, 1994; HERMES-LIMA et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

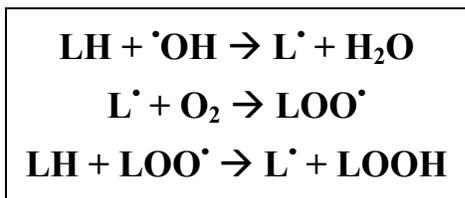


Figura 4. Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da LPO. Adaptada de Hermes-Lima et al., 1995.

As conseqüências mais comuns da LPO correspondem à perturbação das funções essenciais das membranas celulares e organelas. Incluindo o processo de transporte, a transdução de sinais mediada por receptores e a preservação do

gradiente de íons e metabólitos. Como já mencionado anteriormente, a LPO pode secundariamente causar dano ao DNA e a proteínas (ERNSTER; HOCHSTEIN, 1994).

Os níveis elevados de EROs no organismo parecem ser um dos maiores contribuintes para o envelhecimento (HARMAN, 1992) e para muitos processos degenerativos como a aterosclerose, as doenças neurodegenerativas e o câncer entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

1.2 Câncer e atividade antitumoral

Entre as doenças crônico-degenerativas de maior incidência na população ocidental destaca-se o câncer. Patologia caracterizada por uma proliferação descontrolada de células, sendo que as alterações essenciais que transformam células normais em cancerosas são devidas principalmente a mutações de células somáticas. Várias mutações somáticas são necessárias para produzir câncer e estas mutações devem envolver a produção de oncogenes celulares, promotores de crescimento e a inativação de genes supressores tumorais (De VITA; HELMAN; ROSENBERG, 1998).

O câncer, após as doenças cardiovasculares, é a principal causa de morte no mundo, especialmente nos países desenvolvidos; a incidência mundial dos diferentes tipos de câncer é em torno de dez milhões (COZZI, 2003). Segundo a Organização Mundial da Saúde, esta doença causa seis milhões de mortes por ano e estima-se que haverá quinze milhões de novos casos no mundo em 2020 (WHO, 2005). Para o Brasil, em 2005, estima-se 467.444 novos casos entre homens e mulheres (INCA, 2005). Com poucas exceções, o câncer tem uma prevalência maior nas pessoas mais velhas. Mais

da metade de todos os cânceres são diagnosticados após os 65 anos. (OTTO, 2002). Estes dados estatísticos definem a importância do câncer e o caracterizam como um problema de saúde pública.

1.2.1 Aspectos Gerais

Câncer é a denominação genérica para as neoplasias malignas. Neoplasia, por sua vez, significa “crescimento novo” e define condições de proliferação celular anormal, encontrada nos tumores benignos e malignos. A terminologia “tumor” tem um sentido mais genérico, representando aumento regional de volume ou tumefação, podendo ser ou não de caráter neoplásico (NAKAGAWA; LOPES, 2000).

As causas do câncer não estão claramente definidas. A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados com múltiplos fatores, incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos ambientais (BRASIL, 2002). Existem evidências de que as influências de fatores externos ambientais sejam as principais causas da sua ocorrência. Estas determinam direta ou indiretamente modificações centradas no material genético das células que resultam no câncer. Por exemplo, muitos cânceres de pulmão ocorrem devido a carcinogênese química, provocada pelo tabaco (COHN; ROTH, 1996). Altas doses de radiação e benzeno são conhecidas por causar leucemia (RUBIN; FARBER, 1994). O consumo de álcool predispõe ao câncer do trato digestivo e do trato respiratório, e a cirrose alcoólica pode levar ao câncer hepático (WARD, 2002). São raros os casos de cânceres que se devem exclusivamente a fatores hereditários,

familiares e étnicos, apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese. Um exemplo são os indivíduos portadores de retinoblastoma que, em 10% dos casos, apresentam história familiar deste tumor. Alguns tipos de câncer de mama, estômago e intestino parecem ter um forte componente familiar, embora não se possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum. Determinados grupos étnicos parecem estar protegidos de certos tipos de câncer: a leucemia linfocítica é rara em orientais, e o sarcoma de Ewing é muito raro em negros. (INCA, 2005).

Dessa forma, pode-se dizer que todo câncer é originado por modificações genéticas, podendo ser herdadas ou adquiridas ao longo da vida. Estes genes podem ser divididos em oncogenes, genes capazes de induzir características específicas de células cancerígenas para as células normais (AUDIC; HARTLEY, 2004), promotores de crescimento celular e genes supressores tumorais que produzem o efeito oposto, ou seja, inibem o crescimento de células tumorais, mas que podem ser inativados (De VITA; HELMAN; ROSENBERG, 1998; WOLF; RAMIREZ, 2001). Existe ainda um terceiro grupo representado por genes responsáveis pelos reparos em erros de replicação. É necessário o equilíbrio entre estes grupos de genes dentro de cada célula do organismo para que haja o controle de seu crescimento. Em alguns tecidos como nos epitélios existe uma alta taxa de proliferação, sem que, entretanto, ocorra a manifestação de processos neoplásicos, visto que estes conjuntos de genes operam de modo integrado (ELLIS et al., 2000; ELLIS; CAPUCO, 2002).

1.2.2 Fisiopatologia do Câncer

O câncer é uma patologia que depende essencialmente da multiplicação celular, causando um crescimento desordenado que foge aos mecanismos de controle normal. No entanto, as células neoplásicas não proliferam, necessariamente, mais rápido que as normais. O crescimento tumoral depende de outros fatores, como o balanço entre taxa de crescimento (proporcional aos ciclos celulares) e a morte celular. Nos tecidos normais, esse balanço ocorre, enquanto nos tecidos tumorais o fator determinante para o crescimento é o fato de que há mais produção do que eliminação de células. Observa-se geralmente que os genes supressores são inativados, gerando o descontrole no crescimento celular (MC CORMICK; DUNCAN; TUFARO, 1999) e que as alterações essenciais que transformam células normais em cancerosas são devidas principalmente a mutações de células somáticas. (De VITA; HELMAN; ROSENBERG, 1998).

Didaticamente, o processo de carcinogênese pode evoluir em três fases: iniciação ou fase celular, promoção ou tecidual, progressão ou sistêmica.

Na fase de iniciação, tanto os fatores endógenos como exógenos, podem por um único evento, induzir um dano irreversível ao DNA de uma célula. Contudo, um único evento não é suficiente para induzir uma mudança maligna, necessitando posteriormente da ação de promotores tumorais.

Na fase de promoção, segue a expansão clonal da célula transformada, que sofre inúmeras alterações genéticas e epigenéticas. Frequentemente os tumores são detectados nesta fase.

A fase final é de progressão, onde as células transformadas adquirem outras modificações genéticas e epigenéticas, entram em um processo proliferativo ilimitado, com um aumento do grau de malignidade, o tumor aumenta de tamanho e pode se espalhar formando focos secundários de tumor (metástase). As metástases caracterizam a fase sistêmica das neoplasias (HENDERSON, 1996).

A semelhança estrutural das células do câncer com suas células de origem permitem diagnósticos específicos sobre a possível origem e comportamento do tumor. Além disso, os tumores são classificados de acordo com o tecido ou tipo de célula do qual se originam. Assim, cânceres provenientes de células epiteliais são chamados de carcinomas, de células musculares, sarcomas e de células hematopoiéticas, leucemias (INCA, 2005).

O crescimento tumoral é, na maioria das vezes, autônomo e persiste após a retirada do estímulo que o produziu. Além disso, os tumores são originados a partir de células que normalmente possuem capacidade de proliferação. Desta maneira, células terminalmente diferenciadas, tais como, neurônios maduros e miócitos cardíacos não são precursores comuns de câncer, havendo uma incidência clínica muito baixa (PATHAK, 2002).

A evolução da neoplasia pode ser relacionada à biologia tumoral que determina a velocidade de crescimento, agressividade, tendência à invasão local e a metástase. Além disso, o crescimento do câncer acarreta em um consumo do organismo pela competição por nutrientes e energia, resultando em estados de caquexia em fases mais avançadas. Este processo pode culminar em morte, quando não for interrompido por

um tratamento eficaz e existir o comprometimento de órgãos vitais (PATHAK et al., 2002; NAKAGAWA; LOPES, 2000).

1.2.3 Tumor ascítico de Ehrlich (TAE)

Modelos experimentais, como de câncer espontâneo em animais, oferecem oportunidades de estudos que auxiliam na compreensão da resposta imune do hospedeiro, bem como na avaliação da atividade e mecanismo de compostos, com perspectivas de desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (HANSEN; KHANNA, 2004). Neste aspecto, o TAE é uma ferramenta que está sendo amplamente utilizada em nossos estudos.

O TAE é um carcinoma que foi desenvolvido para forma ascítica, por Loewenthal e Jahn em 1932, de uma das várias linhagens do carcinoma de Ehrlich que surge de tumores epiteliais espontâneos, provavelmente originado de glândulas mamárias (GUPTA et al., 2000). Ele cresce rapidamente, apresenta um comportamento muito agressivo, e tem sido amplamente citado na literatura, para investigar propriedades anti-tumorais de vários novos agentes (AJITH; JANARDHANAN, 2003; KANENO et al., 2004; MELLO et al., 2004; RAJESHKUMAR et al., 2002). O crescimento progressivo do tumor de Ehrlich é caracterizado por profundas alterações na resposta imune e pelos altos níveis de consumo de glutamina (LOBO et al., 2000) o qual tem sido associado com alterações metabólicas e fenotípicas levando a uma diminuição da imunocompetência, tornando vulnerável o sistema de defesa do hospedeiro (JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2003; SEGURA et al., 1997).

Em estudos realizados por Lobo e colaboradores (2000), para investigar o papel da glutaminase no crescimento e proliferação do tumor, com células do TAE transfectadas com plasmídeo, expressando um segmento de mRNA anti-sense para glutaminase, uma enzima que apresenta-se elevada em células com alta velocidade de proliferação, e que em seus estudos apresentaram expressão diminuída, resultando na perda da capacidade tumorigênica *in vivo* e alterações fenotípicas de células tumorais.

1.2.4 Atividade antitumoral de produtos naturais, semi-sintéticos e sintéticos

Os progressos da medicina molecular trouxeram esclarecimentos sobre a patogenia do câncer em nível bioquímico, o que permitiu novas abordagens terapêuticas. Entretanto, como o câncer é uma família de doenças, cada tipo de câncer tem sua evolução clínica característica e conseqüentemente, terapia diferenciada (GORCZYCA; GONG; ARDELT, 1999).

Existem três abordagens principais para o tratamento de câncer: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia é agora considerada como o mais efetivo método de tratamento de câncer (AJITH; JANARDHANAN, 2002). Porém, para alguns tipos de tumores, é cada vez mais utilizada como adjuvante da cirurgia ou da radioterapia (RANG; DALE; RITTER, 1999).

Historicamente, há evidências da utilização de agentes quimioterápicos sob a forma de sais metálicos como o arsênico, cobre e chumbo em civilizações antigas do Egito e da Grécia. Porém, a partir da década de 50, com a identificação dos primeiros antibióticos antitumorais, houve um rápido desenvolvimento da quimioterapia

antitumoral nas décadas seguintes, levando ao descobrimento de diversos fármacos importantes (BONASSA, 1996).

Atualmente as pesquisas continuam no sentido de desenvolver novos agentes, porém a ênfase maior reside na descoberta de substâncias análogas às já conhecidas, com efeitos tóxicos menos agressivos, especialmente ao coração, pulmões, rins e sistema nervoso (BONASSA, 1996).

O sucesso no tratamento de tumores por meio de fármacos depende da maior sensibilidade das células neoplásicas ao tratamento do que das células normais, uma vez que células em proliferação são em geral mais susceptíveis a estes agentes do que as células quiescentes. Entretanto, as diferenças de sensibilidade entre células neoplásicas e normais são às vezes pequenas e a toxicidade é um problema comum (RUSTIGI; PODOLSKY, 1996).

Os principais alvos moleculares dos vários fármacos usados na quimioterapia do câncer atualmente incluem: os antimetabólitos, que inibem a síntese de purinas (ex: mercaptopurina, tioguanina e metotrexato), agentes que inibem a formação de desoxirribonucleotídeos (ex: hidroxiuréia, fluoruracila), agentes que modificam o DNA por alquilação (ex: cisplatina), agentes que interagem com a topoisomerase II (ex: bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, etoposídeo), agentes inibidores da síntese do RNA ou de proteínas (ex: actinomicina D, vincristina e vimblastina) e agentes que modificam o DNA por alquilação (ex: cisplatina) (RANG, DALE; RITTER, 1999; RICHARDSON et al., 2000). Dentre estes grupos, os antibióticos antitumorais estão entre os mais importantes agentes utilizados na quimioterapia do câncer, e incluem os membros das famílias da antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina e ácido

aureólico (ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001). Entre aqueles clinicamente mais utilizados se encontram os derivados da daunomicina, particularmente doxorubicina/idarrubicina e a mitomicina C (CRAGG; NEWMAN, 1999). A grande maioria destes antibióticos utilizados exercem sua atividade antitumoral por inibição da topoisomerase II, grupo de enzimas que catalisam o relaxamento da super-hélice do DNA no processo de replicação e síntese *de novo* (BURDEN; OSHEROFF, 1998).

Entretanto, para todos os grupos de agentes antitumorais apresentados existe uma alta incidência de efeitos adversos associados à elevada toxicidade. Além disto, no caso particular do câncer, a resistência à quimioterapia (MDR = multidrug resistance) é muito acentuada, obrigando o clínico a optar por terapias de associação de dois ou mais fármacos (JENDIROBA et al., 2002).

Depois da descoberta de sua atividade anti-tumoral, o cis-diaminedichloroplatinum (II), (cisplatina), ou *cis*-DDP tornou-se um fármaco amplamente utilizado para o tratamento de câncer. Sua importância está correlacionada a sua habilidade de causar a completa remissão em pacientes com câncer testicular avançado, apresenta um efeito terapêutico significativo em câncer de ovário, útero, bexiga, cabeça/pescoço (RANG; DALE; RITTER, 1999; BOYLES et al., 2001). Entretanto, seu excelente desempenho como antitumoral, coincide com seu considerável efeito tóxico, que inclui neurotoxicidade, nefrotoxicidade e emeses severas. Tem também um importante efeito na redução dos níveis de antioxidantes no plasma e geração de radical livre nas células normais (WEIJL et al., 1998; YOSHIDA et al., 2003). Existe também outro problema, que é a propensão dos tumores desenvolverem resistência à platina, sendo este, a maior dificuldade enfrentada no seu

emprego para uso clínico. A ineficácia deste fármaco frente a um amplo padrão de tumores humanos, bem como suas limitações, tem gerado um grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos, com menor toxicidade, melhor atividade e espectro (VALADARES; QUEIROZ; 2002).

1.3 Fungos patógenos e atividade antifúngica

1.3.1 Fungos patógenos

Nos últimos 30 anos, houve um aumento na incidência de infecções fúngicas sistêmicas secundárias graves. O uso disseminado de antibióticos de amplo espectro, que eliminam ou reduzem as populações bacterianas não patogênicas que normalmente competem com os fungos (RANG; DALE; RITTER, 1999), também o aumento no número de indivíduos com redução das respostas imunes devido a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência adquirida) ou a ação de agentes imunossupressores ou utilizados na quimioterapia do câncer (GEORGOPAPADOKOU; WALSH, 1994), são fatores que levaram a um aumento na prevalência de infecções oportunistas, isto é, infecções por fungos que normalmente são inócuos ou facilmente dominados em indivíduos imunocompetentes (RANG, DALE; RITTER, 1999). As pesquisas fragmentadas de estudos epidemiológicos e relato de casos indicam que as micoses cutâneas estão entre as doenças humanas mais comuns. Os relatos estimam que são o terceiro distúrbio mais usual em crianças com menos de 12 anos de idade, e o segundo mais comum em populações mais idosas. A ocorrência destas doenças varia com a

idade, sexo, grupo étnico e hábitos culturais e sociais da população (KOBAYASHI, 1992).

As infecções fúngicas superficiais podem ser classificadas em dermatomicoses e candidíase. As dermatomicoses são infecções da pele, dos cabelos e das unhas causadas por dermatófitos. As mais comuns são produzidas por microrganismos do gênero *Tinea*, responsáveis por vários tipos de “tinha”. *Tinea capitis* afeta o couro cabeludo, *Tinea cruris*, virilha, *Tinea pedis*, o pé, *Tinea corporis*, o corpo e *Tinea unguium*, as unhas. Na candidíase superficial, o microrganismo leveduriforme infecta as mucosas da boca “afta” ou da vagina ou da pele. Os dermatófitos são um grupo de fungos os quais caracteristicamente infectam partes queratinizadas do corpo e as dermatomicoses são muito difíceis de erradicar (LOPEZ et al., 2001).

A tabela 2 apresenta alguns dos principais fungos que infectam o homem e as enfermidades que estes produzem.

Tabela 2. Principais fungos que infectam o homem e suas enfermidades.

Fungos que atacam o homem	Enfermidades
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Tinea capitis</i> , <i>T. Corporis</i> , <i>T. Cruris</i> , <i>T. Pedis</i> (pé de atleta)
<i>Microsporum canis</i>	<i>Tinea capitis</i> , <i>T. Corporis</i>
<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Tinea capitis</i> , <i>T. Corporis</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Tinea pedis</i> , <i>T. Barbae</i> (a barba), <i>T. Capitis</i> , <i>T. Corporis</i> , <i>T. Cruris</i>
<i>Cândida albicans</i>	Candidíase (sistêmica e superficial)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Criptococosis
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Paracoccidioidomicosis
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Aspergilosis
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmosis
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Tinea capitis</i> , <i>T. Corporis</i> , <i>T. unguium</i>

Fonte: Adaptada de Zacchino, 2001.

1.3.2 Atividade antifúngica

Os três principais grupos de antifúngicos de uso clínico são: os antibióticos polienos, os derivados azólicos e os alilaminas/tiocarbamatos. Todos interagem ou inibem o ergosterol, principal esterol da membrana plasmática da maioria dos fungos (GEORGOPAPADOKOU; WALSH, 1994). A figura 5 mostra a via de síntese do ergosterol e as etapas desta via que são afetadas por estes inibidores.

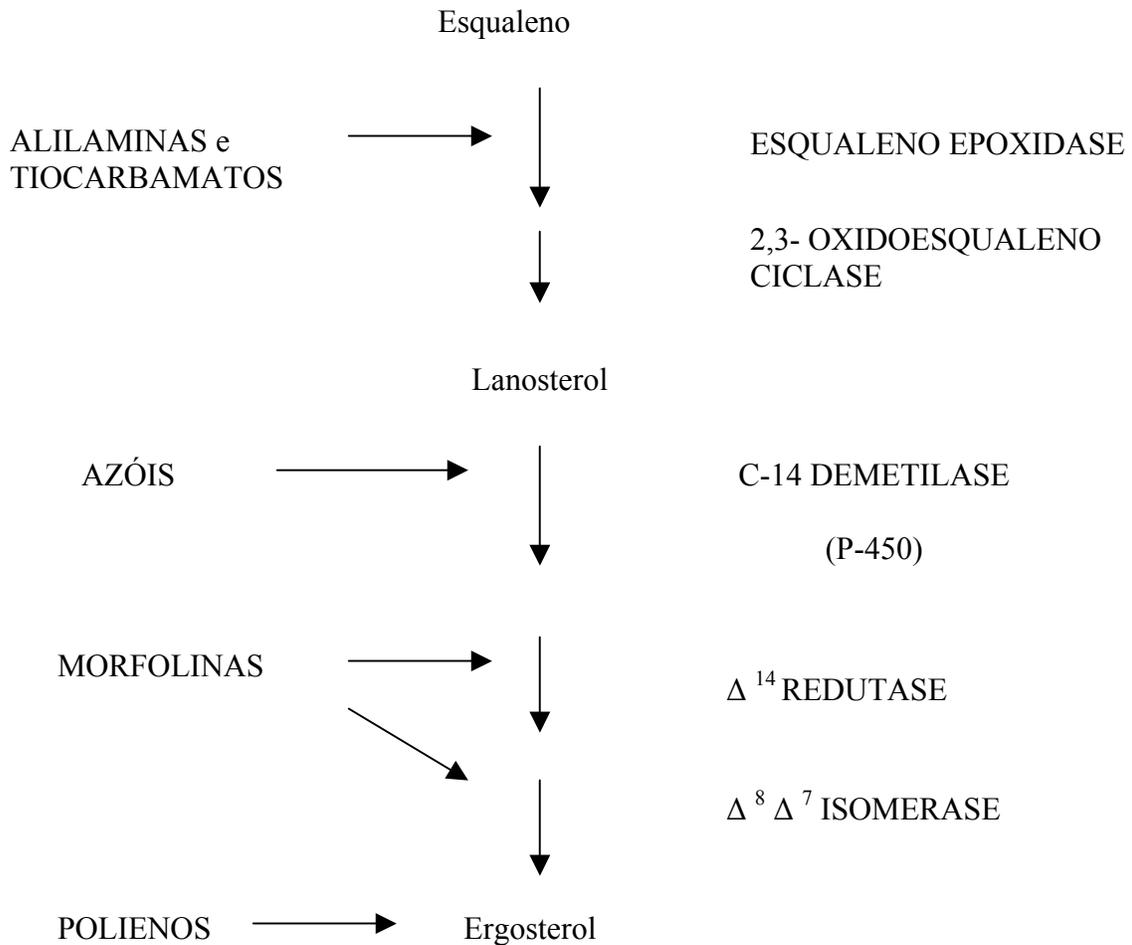


Figura 5 - Via de síntese do ergosterol e os sítios de ação de seus principais inibidores. Adaptada de Georgopapadaku e Walsh, 1996.

Os polienos (ex: Anfotericina B, nistatina) ligam-se ao esterol da membrana causando um aumento na permeabilidade da membrana, levando à perda de componentes citoplasmáticos e conseqüentemente à morte celular. Os inibidores desta classe têm a maior afinidade pelo ergosterol que pelo seu correspondente na espécie humana, o colesterol, viabilizando assim seu uso clínico.

Os compostos azólicos (ex. Cetoconazol, itraconazol, fluconazol, clotrimazol) são completamente sintéticos e atuam primariamente na biossíntese do ergosterol no passo de demetilação C-14, uma reação dependente do citocromo P-450.

Tanto as alilaminas (ex. Terbinafina, naftifina) quanto os tiocarbamatos (ex. tolnaftato) inibem a esqualeno epoxidase, que juntamente com o oxidoesqualeno ciclase transformam o esqualeno em lanosterol (ZACCHINO, 2001; GROLL; WALSH, 2002),

Existe ainda a 5-flucitosina que atua no metabolismo das pirimidinas inibindo a síntese de RNA/DNA, porém esta classe tem um espectro de atividade limitada, sendo usado principalmente em combinação com Anfotericina B (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1996).

Nos últimos anos, a parede fúngica surgiu como alvo ideal para o descobrimento de agentes antifúngicos seletivos. O fato de que as células fúngicas, mas não as humanas possuem parede, e que esta estrutura é essencial para a célula fúngica, faz com que todos os sistemas enzimáticos que fazem parte da síntese e montagem da parede celular fúngica se transformem em alvos úteis para o descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos (ZACCHINO, 2001).

É imprescindível que sejam incrementadas as pesquisas que visem a obtenção de novas substâncias com atividade antimicrobiana, principalmente com atividade dirigida contra patógenos fúngicos, uma vez que a disponibilidade de antifúngicos é inferior a de agentes antibacterianos (SMÂNIA, 2003). Os fármacos antifúngicos disponíveis atualmente têm uma toxicidade importante, produzem recorrência ou causam resistência, razão pela qual se está permanentemente procurando novos agentes

antifúngicos mais potentes e, sobretudo, mais seguros que os já existentes (ZACCHINO, 2001).

1. 4 A pesquisa de novos fármacos

Do ponto de vista histórico, os produtos naturais sempre desempenharam um papel muito importante no processo de desenvolvimento de fármacos. A maior parte dos fármacos comercializados atualmente é de origem natural ou de produtos sintéticos inspirados em produtos naturais. Tanto os métodos clássicos de isolamento dos produtos naturais quanto a utilização de processos de síntese química na geração destas substâncias são uma fonte promissora de novos compostos protótipos (STROBEL, 2002; DE LAS HERAS et al., 2003; MACIAS et al., 2003).

Dentre os grandes grupos de compostos com estrutura química relativamente simples, que podem sofrer uma enorme gama de modificações estruturais e que permitem otimizar ou direcionar diferentes atividades biológicas, encontram-se os compostos fenólicos, que serão sujeito de estudo no presente trabalho.

1.4.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são derivados do metabolismo vegetal secundário, apresentando como estrutura fundamental um anel aromático, com um grupamento hidroxila substituindo ao menos um hidrogênio. Este grupo de compostos está

largamente distribuído nos vegetais e microrganismos, sob a forma livre ou ligada a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2003).

Os compostos fenólicos podem atuar nas plantas como antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, fotoreceptores, atraentes visuais e repelentes de predadores. Contudo, há um grande interesse atualmente sobre sua atividade antioxidante, devido a sua habilidade de seqüestrar e de reduzir a formação de EROs e eletrófilos; de quelar metais e de inibir o processo de nitrosação; potencial de auto-oxidação, produzindo peróxido de hidrogênio na presença de certos metais como ferro e cobre; e sua capacidade de modular a atividade de enzimas como a proteína quinase C e a lipooxigenase (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PIETTA, 2000; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2003).

Os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos também podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (DECKER, 1997).

Dentre os compostos fenólicos encontram-se as acetofenonas, que apresentam várias atividades biológicas. Estes compostos podem ocorrer em plantas naturalmente (FAVIER, et al. 1998), ou podem ser produzidos por via sintética. Eles despertam grande interesse por apresentarem importantes atividades biológicas, como: antiinflamatória (FAVIER et al., 1998), antiespasmódica (CECHINEL Filho et al., 1995), antibacteriana (NIERO, et al. 1996) e antifúngica (CECHINEL Filho et al., 1996). Gul e colaboradores (2002) relatam importante atividade antifúngica de derivados da

acetofenona conhecidos como bases bis Manich, bis (β -aróiletíl) metilamina hidroclorado, conforme ilustra a figura 6.

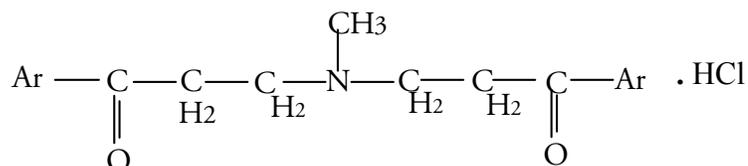
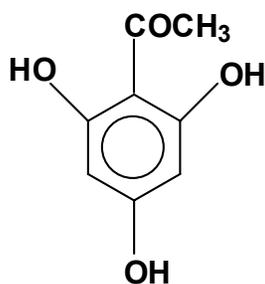


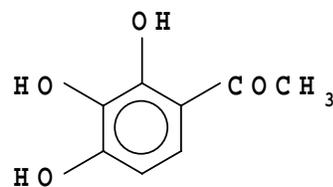
Figura 6. Bases bis Manich, composto derivado da acetofenona.

Esta classe de compostos já vem sendo avaliada no LABIOEX, tendo sido tema de dissertação do mestrando Luis Flavio de Souza Oliveira, onde foi observado um efeito hipocolesterolêmico importante tanto para a acetofenona quanto para alguns de seus análogos sintéticos, em ratos submetidos a uma dieta hipercalórica (OLIVEIRA, 2001).

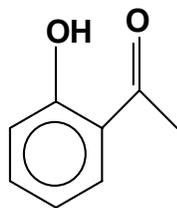
A seguir são apresentadas as estruturas químicas dos compostos a serem estudados e do flavonóide rutina (Figura 7):



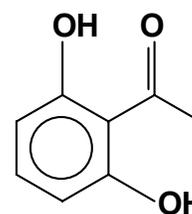
2,4,6 – trihidroxiacetofenona
(Floroacetofenona)



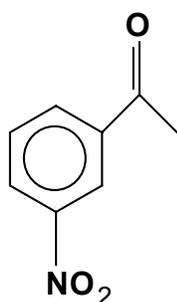
2,3,4 – trihidroxiacetofenona
(Galacetofenona)



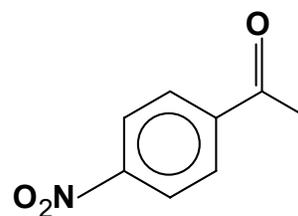
2' - hidroxiaacetofenona



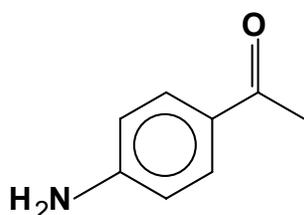
2',6' - dihidroxiaacetofenona



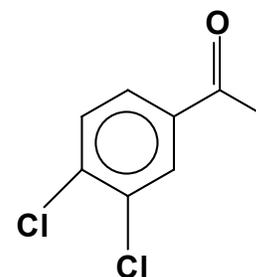
3' - nitroacetofenona



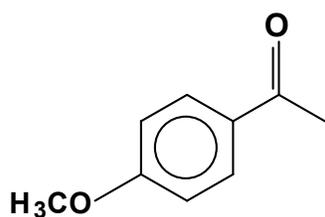
4' - nitroacetofenona



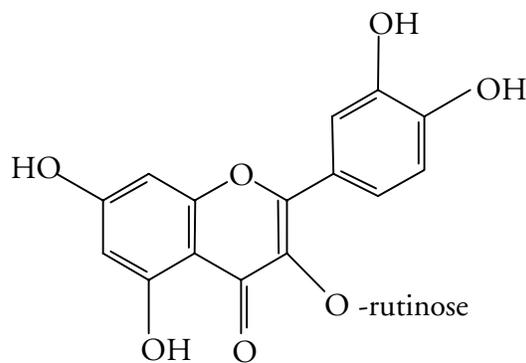
4' - aminoacetofenona



3',4' - dicloroacetofenona



4' - metoxiaacetofenona

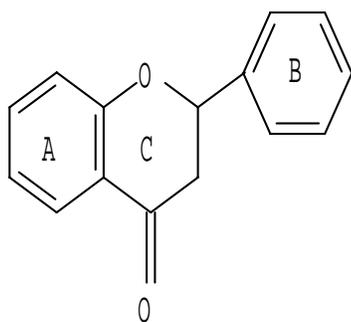


Rutina

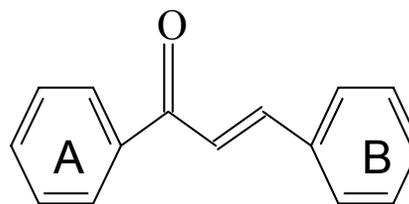
Figura 7. Estrutura química das acetofenonas estudadas e do flavonóide rutina.

1.4.2 Chalconas

As chalconas consideradas como intermediários essenciais na biossíntese dos flavonóides, são abundantemente encontradas na natureza em plantas rasteiras ou arbóreas (RUBY et. al, 1995; RODRIGUES, 1997; RAO; FANG; TZENG, 2004). Quimicamente possuem a nomenclatura (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona, são definidas como cetonas aromáticas α , β -insaturadas, constituídas por dois anéis benzênicos conectados por uma ponte de 3 carbonos, tendo conjugados um grupamento carbonílico e uma porção olefínica. Diferentemente dos flavonóides, as chalconas não possuem o anel pirânico, que é formado pela adição do oxigênio à posição 2 das chalconas e subsequente ciclização com a cadeia de 3 átomos de carbono e o anel A (Figura 8) (CESARIN; FERREIRA; BRAZ, 2001).



Estrutura geral flavonóides



Estrutura geral chalconas

Figura 8: Estrutura química geral dos flavonóides e de seus precursores, as chalconas, demonstrando a designação dos anéis aromáticos (A, B e C).

Do ponto de vista químico são várias as modificações que podem ser realizadas nas chalconas. De acordo com a natureza dos substituintes, podemos classificar as

interações quanto aos efeitos estéricos causados por substituintes volumosos, aos efeitos eletrônicos decorrentes da diferença de eletronegatividade entre átomos ou grupos substituintes, ou a presença de sítios ácido/base de Lewis, possibilitando a formação de ligações de hidrogênio e/ou complexos intra e intermoleculares (CESARIN; FERREIRA; BRAZ, 2001). Desta forma, as alterações estruturais mais descritas para as chalconas são: substituições nos anéis A e B em diferentes posições (JURCSAK; ZAMINI, 1999) e adições halogênicas na dupla ligação olefínica (BIEBER, 1999). Os processos de isomerizações cis-trans para as chalconas, também são relatados (IWATA et al., 1995).

A atividade antiviral de uma grande variedade de chalconas foi caracterizada, após modificações moleculares na estrutura química de uma flavona 4',5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxiflavona, isolada da *Agastache rugosa* KUNTZE, que apresentava potente atividade contra o picornavírus (ISHITSUKA et al., 1982a). A abertura da cadeia carbônica do anel C desta flavona, originou inicialmente a chalcona 4'-metoxi-2'-hidroxi-4,6'-dimetoxichalcona, que proporcionou a perda da atividade contra o picornavírus, porém inibindo potentemente outro tipo de vírus, o rinovírus humano (ISHITSUKA et al., 1982b). Além do rinovírus humano tipo-2, algumas chalconas apresentaram ação antiviral para o polivírus tipo-1 (cepa de Mahoney), rinovírus tipo-9, ECHO-6 e parainfluenza vírus (EDENHARDER; RAUSCHER; PLATT, 1997; DIMMOCK et al., 1999). Hatano e colaboradores (1988), citam outra importante inibição viral relatada para a Licochalcona, que atua inibindo a formação de células OKM-1, as quais são infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana. Já Phrutivorapongkul e colaboradores (2003), relatam atividade moderada contra o vírus herpes simples.

Os estudos dos efeitos das chalconas sobre a atividade protozoária tem sido intensamente relatados tanto para a forma epimastigota (forma flagelada encontrada na corrente sanguínea do hospedeiro, responsável pelo processo de reprodução) quanto para a forma promastigota (forma flagelada infectante, responsável pela reprodução parasitária) (LUNARDI; GUZELA, 1998). Dentre os parasitas estudados encontram-se: *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Tripanossoma cruzi* (RAM et al., 2000; SAIRAFIANPOUR et al., 2002; LUNARDI et al., 2003).

Já foram citadas para diferentes chalconas diversas propriedades anti-inflamatórias, e as possíveis ações destes fármacos são comumente relatadas através da: **(i)** inibição da liberação de beta-glucuronidase e lisosima e de neutrófilos estimulados com formil-Met-Leu-Phe/citochalasina B (HSIEH et al., 2000); **(ii)** inibição dos efeitos da formação de óxido nítrico, em microglias estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), agindo como seqüestradores de óxido nítrico (HERENCIA et al., 2002; ROJAS et al., 2002); **(iii)** supressão da expressão da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) (KO et al., 2003); **(iv)** supressão da biossíntese da Interleucina-1 (IL-1) (DIMMOCK et al., 1999).

Algumas chalconas polihidroxiladas apresentaram atividade estrogênica, interagindo diretamente com o receptor estrogênico, estimulando a resposta transcripcional estrogênio-dependente e promovendo o crescimento de células como as MCF 7, estrogênio-dependentes (DIMMOCK et al., 1999).

Em relação à atividade antibacteriana, a efetividade das chalconas e seus derivados contra microrganismos Gram positivos é freqüentemente maior do que contra

bactérias Gram negativas, no entanto, alguns análogos também podem inibir o crescimento de microrganismos Gram negativos (OPLETALOVA, 2000). Já foram relatadas inibições para as bactérias: *Micrococcus luteus* (INAMORI et al., 1991), *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ALCARÁZ et al., 2000), *Escherichia coli* (ALCARÁZ et al., 2000; ALVAREZ et al., 2004), *Staphylococcus epidermidis* (DIMMOCK et al., 1999), dentre outras.

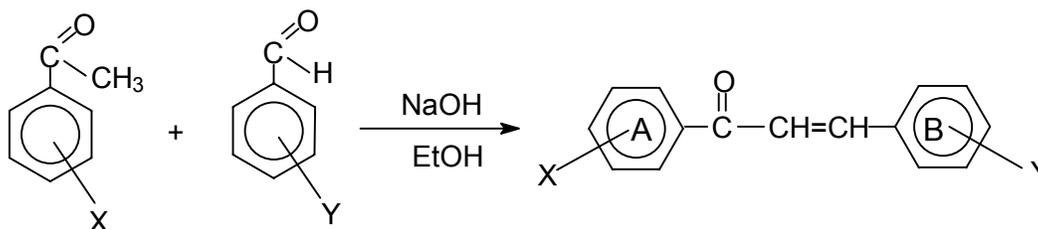
Dentre as inúmeras atividades já descritas para as chalconas, podemos citar, ainda, a atividade anti-plaquetária, pela possível inibição da mobilização do cálcio intracelular ou como antagonista do cálcio ou com efeito inibitório na formação de tromboxano (KO et al., 2004), potencial de inibição enzimática para: **(i)** glutathione S-transferase (GST), contribuindo na sensibilização celular tumoral aos fármacos quimioterápicos (SCHECTER et al., 1992); **(ii)** epóxido hidroxilase citosólica, diminuindo a citotoxicidade celular (MORISSEAU, 1998); **(iii)** enzimas mitocondriais como succinoxidase, desidrogenase, fumarato redutase, monoamino oxidase, auxiliando na atividade anti-parasitária (CHEN; ZHAI; CHRISTENSEN, 2001); **(iv)** 15-hidroxi prostaglandina deidrogenase, prevenindo a formação de úlcera gástrica (DIMMOCK et al., 1999); **(v)** iodotironina monodeiodinase de ratos, inibindo a catálise da triiodotironina (FUJITA et al., 1992; NERYA et al., 2004).

Diversos experimentos utilizando culturas celulares *in vitro*, demonstraram a ação de algumas chalconas na inibição da proliferação celular de tumores malignos em diferentes linhagens celulares humanas como: HGC-27 (câncer gástrico) (SHIBATA, 1994); Hela (carcinoma cervical) (IWATA et al., 1995); PANC-1 (câncer pancreático); GOTO (neuroblastoma); MCF-7 (câncer de mama) (CALLISTE et al., 2001); K562 e HL-

60 (leucemia) (SAYDAM et al., 2003); NCI-H460 (câncer de pulmão) (PHRUTIVORAPONGKUL et al., 2003).

No presente trabalho serão analisadas algumas chalconas sintetizadas pela doutoranda Lorena dos Santos, que já foram avaliadas no LABIOEX com respeito à atividade hipolipemiante e que foi tema da dissertação de mestrado da doutoranda anteriormente citada.

A seguir são apresentadas as estruturas das chalconas a serem avaliadas neste estudo. Figuras 9, 10 e 11)

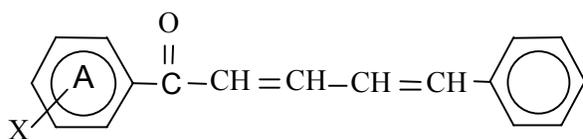


Compostos	X	Y
C1	4-H	4-H
C2	3,4-Cl	4-N(CH ₃)
C4	4-CH ₃	4-Cl
C5	4-Br	4-Cl
C6	4-Br	4-H
C7	4-Cl	4-H
C8	4-H	4-Cl
C9	3,4-Cl	4-H
C13	4-H	4-CH ₃
C14	4-H	4-OH
C15	4-H	4-NO ₂
C16	4-H	4-OCH ₃
C17	4-H	2-OCH ₃
C18	4-CH ₃	4-N(CH ₃)
C19	4-H	3-OCH ₃
C24*	4-H	3-OCH ₃ , C ₆ H ₆ NSO ₂
C25	2,4-OCH ₃ ; 6-OH	4-NO ₂

Figura 9: Rota sintética e substituintes dos anéis aromáticos A e B das chalconas.

Fonte: Adaptado Santos, 2000.

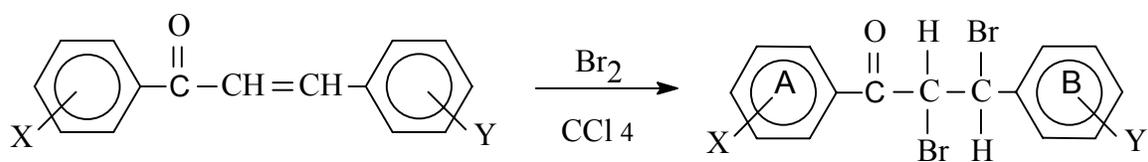
*Composto fornecido pelo professor Ricardo Nunes do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.



Compostos	X
C11	4- OCH ₃
C12	2-OH
C20	H

Figura 10: Estrutura geral e substituintes do anel aromático A.

Fonte: Santos, 2000.



Compostos	X	Y
B1	4- Cl	4-Cl
B2	4-H	4-CH ₃
B3	4-H	4-NO ₂
B4	4-H	4- OCH ₃

Figura 11: Rota sintética e substituintes dos anéis A e B dos derivados di-bromados sintetizados.

Fonte: Adaptado Santos, 2000.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial antioxidante e antifúngico de análogos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o potencial pró ou antioxidante *in vitro* de alguns análogos sintéticos da acetofenona e de chalconas utilizando o ensaio de captação do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina (DPPH), além da peroxidação lipídica em homogenato de fígado de ratos.
 - ✓ Avaliar a atividade antitumoral de algumas chalconas sintéticas em camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich através da avaliação da viabilidade celular, volume ascítico, variação de peso e média de sobrevivência dos animais.
 - ✓ Avaliar a atividade antifúngica de alguns análogos sintéticos da acetofenona através da determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição.
-

-
- ✓ Avaliar o potencial pró-oxidante *in vivo* de chalconas sintéticas através da determinação da fragmentação do DNA, lipoperoxidação de membranas, GSH e carbonilação de proteínas e correlacionar com a atividade antitumoral.

 - ✓ Correlacionar os dados obtidos relativos à atividade antioxidante, antifúngica, antitumoral e às estruturas químicas dos compostos testados.
-

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais e reagentes

Os derivados da acetofenona utilizados para a avaliação da atividade antioxidante e antifúngica, foram sintetizadas pelo Laboratório de Síntese Estrutura e Atividade, LABSEAT, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pelo Professor Dr. Rosendo Augusto Yunes.

As chalconas sintéticas avaliadas neste trabalho foram cedidas pelo Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas/NIQFAR, da Universidade do Vale de Itajaí – UNIVALI.

Os reagentes, etanol p.a., metanol p.a., DMSO p.a., ácido nitrilo acético (NTA), ácido tiobarbitúrico (TBA), 1,1-difenil-2-picril hidrazina (DPPH), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), hidroperóxido de cumeno, o 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB), hidroxitolueno butilado (BHT), nitrilo blue tetrazolium (NBT), peróxido t-butila (t-BUOOH), rutina, foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Utilizou-se também a Cisplatina Incel® 50 mg/50 ml da linha genérica cedida pelo Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON).

Os kits para a dosagem das enzimas aspartato aminotransferase (AST) foi adquirido junto a Labtest Diagnóstica S.A. (MG, Brasil). O corante azul de trypan foi adquirido da empresa Vetec Química Final Ltda.

Os meios de cultura empregados para os testes antifúngicos foram o ágar batata e o caldo nutritivo adquiridos dos laboratórios Difco.

3.2 Animais

Nos ensaios biológicos foram utilizados camundongos machos *Mus musculus*, com 8-10 semanas de idade, peso variando entre 29 ± 35 g e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos (200 ± 50 g de peso), com aproximadamente 70 dias. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, ao Departamento de Bioquímica/CCB. Os animais foram pesados e distribuídos em grupos de 12 indivíduos, de acordo com o peso obtido. Os mesmos permaneceram no laboratório por um período mínimo de adaptação de 7 dias antes da realização dos experimentos, mantidos em gaiolas plásticas, sob temperatura ambiente controlada ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial e água *ad libitum*. Antes do início de cada experimento, os animais permaneceram em jejum de 12 horas.

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFSC sob o número n ° 23080.009607/2002 - 88, para a utilização dos animais, com o ofício de aprovação nº 149/CEUA/DAP/PRPG.

3.3 Fungos

Visando à análise da atividade antifúngica dos compostos foram utilizados os seguintes fungos filamentosos, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* (Blanchard) e não filamentosos

Candida albicans. O *Epidermophyton floccosum* e o *Trichophyton rubrum* foram obtidos do Laboratório Médico Santa Luzia e os demais fungos do Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, onde as análises também foram realizadas, sob a orientação da Profa. Dra. Elza de Fátima Albino Smânia.

3.4 Estratégia experimental

O presente trabalho teve como proposta avaliar algumas atividades biológicas de chalconas sintéticas e de análogos da acetofenona. Para dar início a esta investigação, foi feito um screening *in vitro* da atividade antioxidante, utilizando os ensaios de capacidade de captação do radical DPPH e proteção da lipoperoxidação de membranas biológicas. A partir dos dados obtidos, aqueles compostos que apresentaram atividade antioxidante (acetofenonas) foram avaliados com respeito à atividade antifúngica e aqueles que apresentaram atividade pró-oxidante (chalconas) foram avaliados com respeito à atividade antitumoral.

3.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

3.5.1 Determinação da capacidade de captação do radical DPPH

A capacidade de captação do radical DPPH foi avaliada pela medida da extinção de sua absorção máxima em 517 nm. A técnica, descrita por Mensor (2001), constitui

na incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente, de uma solução etanólica de DPPH 3,0 mM com concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL) de análogos da acetofenona e chalconas sintéticas. Após esse período é feita a leitura espectrofotométrica em 517 nm e o percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos de porcentagem de atividade antioxidante (AA%) conforme fórmula abaixo:

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

A concentração da amostra que é necessária para captar 50% dos radicais livres DPPH (CE_{50}) foi calculada por análise de regressão exponencial e expressos como média \pm E.P.M.

3.5.2 Proteção da peroxidação lipídica

A proteção da peroxidação lipídica foi avaliada de acordo com o método descrito por Chen e Tappel (1996), usando homogenato de fígado de ratos. Os animais foram sacrificados e o fígado retirado, lavado com salina 0,9%, pesado e homogeneizado em tampão fosfato de potássio 10 mM e pH 7,0 em KCl 140 mM. O homogenato foi centrifugado 2000 g e o sobrenadante obtido foi diluído (3:9) em tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,4).

Posteriormente foi feita a incubação de: 100 µL H₂O destilada, 125 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,4), 100 µL de peróxido t-butílica, 100 µL de diferentes concentrações dos análogos da acetofenona e chalconas sintéticas (31,25;

62,5; 125; 250 e 500 µg/mL), e 150 µL do homogenato diluído. Ao controle foi adicionado 100 µL de BHT. A mistura foi incubada a 37 °C, sob condições aeróbicas e sob agitação constante (180 ciclos/min), por 2 horas. Após este procedimento foi adicionado a esta mistura 1,0 mL de TCA 2,8% seguida de 1,0 mL de TBA 1% em NaOH 0,05 N. Após, o sistema foi agitado em vórtex e incubado a 100 °C por 15 min e posteriormente colocado em banho de gelo por 5 min, seguido de centrifugação a 2000 g por 5 min e após foi medida a absorbância do sobrenadante em 532 nm.

O potencial de proteção a lipoperoxidação foi calculado em termos de atividade antioxidante conforme a fórmula abaixo:

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

Os valores de CE₅₀ representam as concentrações das amostras que são necessárias para prevenir em 50% a peroxidação lipídica, e foram calculadas por análise de regressão exponencial, expressos como média ± E.P.M.

3.6 Avaliação da atividade antitumoral de chalconas sintéticas

3.6.1 Tumor ascítico de Ehrlich (TAE)

O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) foi obtido na Universidade do Vale de Itajaí, UNIVALI, no Centro de Ciências da Saúde, com a Profa. Dra. Maria Regina Orofino Kreuger, e mantido no Laboratório de Bioquímica Experimental-LABIOEX através de passagens sucessivas pela via intraperitoneal entre animais doadores, a cada 7 dias,

crescendo como células ascíticas na cavidade peritoneal de camundongos. As suspensões celulares tumorais foram preparadas em solução salina balanceada em pH 7,4 na concentração final de 5×10^6 células tumorais viáveis por camundongo.

3.6.2 Protocolo experimental

Foram utilizados camundongos *Swiss albino* (n= 12 por grupo experimental pesando 29 ± 6 g) que foram distribuídos em diferentes grupos experimentais.

Todos os camundongos receberam um volume de 0,2 ml da solução de células tumorais em condições assépticas, com exceção do grupo controle não-tratado. Sendo que o dia da inoculação do tumor foi considerado dia zero (0). Os animais foram divididos em quatro grupos: I) controle não-tratado (salina + 1% DMSO + 10% etanol); II) controle tumor ascítico de Ehrlich (TAE + veículo); III) TAE + chalconas; IV) TAE + Cisplatina. Todos os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (i.p.).

O tratamento dos animais iniciou 24 h após a inoculação das células tumorais, administrando-se uma dose de chalconas (C1, C4, C6, C12, C13) ou cisplatina na concentração de 5 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente, durante 9 dias consecutivos. Os animais controle receberam apenas o veículo na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados com chalconas. Depois da última dose, 18 horas após, 6 camundongos de cada grupo foram sacrificados para a avaliação da atividade antitumoral. Os animais restantes em cada grupo foram mantidos para avaliar a sobrevivência em comparação ao grupo controle do tumor.

3.6.3 Avaliação da viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de trypan

A viabilidade celular foi avaliada pela incorporação do azul de trypan, um corante que só penetra nas células mortas cujas membranas não podem mais excluí-lo. Este fenômeno permite estimar indiretamente o grau de integridade da mesma. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (FRESHNEY, 1999). Após a retirada do líquido ascítico dos animais, utilizou-se um volume de 10 μ L deste líquido o qual foi adicionado 890 μ L de solução salina e 100 μ L do corante azul de trypan (0,4%) para a determinação da viabilidade celular em câmara de Neubauer.

3.6.4 Avaliação da medida do volume ascítico

O volume ascítico total foi mensurado utilizando tubos graduados de centrífuga e os volumes de células compactados foram determinados após a centrifugação a 1000 g por 5 min.

3.6.5 Avaliação da Média de Sobrevida

Para determinação da sobrevida, os animais inoculados com o TAE (6 animais por grupo) e tratados ou não com chalconas por via i.p., foram observados diariamente, durante um período de 30 dias (QURESHI, 2001).

3.6.6 Avaliação da Variação de Peso

Para avaliar a variação de peso dos camundongos dos diferentes grupos foi calculada a diferença do peso final dos animais, após 9 dias de tratamento, menos o peso do primeiro dia de tratamento. Os resultados obtidos foram expressos em gramas.

3.7 Atividade Pró-oxidante *in vivo*

3.7.1 Protocolo experimental

Grupos de 6 camundongos foram inoculados via i.p. com 0,2 mL de uma suspensão de células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) provenientes da cavidade peritoneal de camundongos doadores a uma concentração de 5×10^6 células/animal. O tratamento dos animais iniciou 24 h após a inoculação das células tumorais, administrando-se uma dose de 5 mg/kg das chalconas C1, C4, C6, C12, C13 em solução salina, 1% DMSO e 10% de etanol por 9 dias consecutivos. Os animais controle receberam apenas o veículo na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados com chalconas.

Após 9 dias de tratamento os animais foram anestesiados com éter etílico e o sangue foi coletado por punção ocular para a avaliação enzimática da função hepática e medida da fragmentação do DNA. Imediatamente após a coleta sangüínea, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fígados foram retirados para as dosagens dos indicadores de estresse oxidativo e GSH.

3.7.2 Avaliação do dano à membrana celular

3.7.2.1 Medida da lipoperoxidação pelo TBARS

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicata, pela detecção dos seus derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (OHKAWA, 1979; BIRD; DRAPER, 1984).

Após o sacrifício dos camundongos, os fígados dos animais foram retirados e colocados imediatamente no gelo. Uma pequena porção, 100 mg, foi separada para a preparação do homogenato, obtido em ácido fosfórico 1,1% (1:20 p/v). A homogeneização foi realizada a 4°C, com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem.

Após a homogeneização, 400 µL do homogenato foi misturado a 400 µL da solução (1% TBA / 50 mM NaOH / 0,1 mM BHT) e 0,2 mL de ácido fosfórico 7%. Posteriormente, a amostra foi incubada a 100 °C por 15 min, após incubação foi adicionado 1,5 mL de butanol. Finalmente, os tubos foram agitados vigorosamente em aparelho vórtex e centrifugados a 2000 g por 5 min. A fase orgânica foi removida e medida espectrofotometricamente em 532 e 600 nm. Para o branco foi substituída a solução de TBA por HCl 3,0 mM (HERMES-LIMA; WILLMORE; STOREY, 1995).

A concentração de TBARS (nmol/g) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156 mM conforme a fórmula:

$$[\text{TBARS}] = [\text{Amostra } (A_{532} - A_{600}) - \text{Branco } (A_{532} - A_{600})] \times 1000 \times \text{diluições} / 156.$$

3.7.2.2 Medida da lipoperoxidação pelo FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja)

Os ensaios para avaliar a concentração de hidroperóxido lipídico foram realizados conforme descrito por Hermes-Lima et al. (1995). As amostras de fígado (200 mg) foram pesadas e homogeneizadas em 1,0 mL de metanol gelado (4 °C) grau HPLC (1:5 g/v). Os homogenatos foram centrifugados a 1000 g por 10 minutos e os sobrenadantes utilizados para o experimento. Foram colocados em tubos os seguintes reagentes: 250 µL de FeSO₄ 1 mM, 100 µL de H₂SO₄ 0,25 M, 100 µL de xilenol laranja 1 mM e 450 mL da água e 60 µL do sobrenadante (extrato do tecido), ajustando o volume final para 1 mL com água destilada. O branco foi preparado substituindo o extrato do tecido por água destilada. Após agitação, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 24 horas até que a reação estivesse completa. A absorbância foi medida em 580 nm. Em seguida nas amostras do tecido foram adicionados 5 µL de cumeno hidroperóxido 1 mM, agitado e aguardado por 60 min e feito nova leitura da absorbância a 580 nm.

A concentração de hidroperóxidos lipídicos (substâncias reativas do FOX) foi expressa em termos de equivalentes de cumeno hidroperóxido por grama de tecido (CHPE/g) através da fórmula:

$$\text{CHPE/g peso do tecido} = (\text{Abs.}_{\text{amostra}} / \text{Abs.}_{5 \text{ nmol CHP}}) \times 5 \text{ nmol CHP} \times 1000 / V \times 6$$

V = volume do extrato de amostra usado

6 = fator de diluição 1:5 g/v.

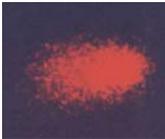
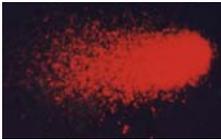
3.7.2.3 Avaliação do dano ao DNA

A fragmentação do DNA foi avaliada através de eletroforese horizontal e microscopia de fluorescência utilizando o teste COMETA (SINGH *et al.*, 1988), onde 20 μL de sangue foi diluído em 100 μL de PBS (1:10) gelado. A partir desta diluição, coletaram-se 10 μL e homogeneizou-se em 75 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA 0,75%) a 37°C. Esta mistura (células/LPMA) foi adicionada a uma lâmina de microscópio coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (NMPA 1%). Então, uma lamínula de vidro foi colocada sobre a lâmina e acondicionada a 5 °C por 5 min. A seguir retiraram-se as lamínulas e as lâminas foram mergulhadas em cuba contendo solução de lise a 4 °C, composta por 2,5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% DMSO e 10 mM Tris pH 10, por no mínimo 24 horas até 1 semana. Após este período, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em tampão alcalino a 4 °C (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13) e o DNA liberado foi submetido a uma eletroforese horizontal sobre voltagem de 25V e uma corrente elétrica de 280 mA por 30 min. Depois disto, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com brometo de etídeo (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A visualização foi feita em um microscópio de fluorescência (400x) com filtro de excitação de 515 nM e de extinção de 560 nM.

Para controle negativo foi usada uma alíquota de sangue de um camundongo controle. Para controle positivo foi usada uma alíquota de sangue de um camundongo controle misturada com 100 μl de H_2O_2 1000 μM e incubada por 10 minutos a 25°C. Para cada animal foi analisada aleatoriamente a imagem de 100 células (50 células de cada lâmina, em duplicata) e o tamanho dos cometas (região nuclear + cauda) foi

medido em unidades arbitrárias. Os cometas de cada animal foram divididos em classes, de acordo com o tamanho da cauda, variando de cometas sem cauda (com ausência de dano, classe 1) até cometas que apresentaram cauda longa (dano máximo, classe 5). A fim de expressar o dano visualizado nas lâminas em valores numéricos, cada classe recebeu uma pontuação, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada.

	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Pontuação	0	1	2	3	4
Imagem do cometa					

Para cada animal foi calculada uma pontuação de acordo com o número de cometas visualizados em cada classe, segundo a equação abaixo:

Índice de dano ao DNA = (Nº de cometas classe 0 x 0) + (Nº de cometas classe 1 x 1) + (Nº de cometas classe 2 x 2) + (Nº de cometas classe 3 x 3) + (Nº de cometas classe 4 x 4).

Conseqüentemente, obteve-se uma única pontuação para cada grupo estudado. Então, o índice de dano de cada grupo podia variar de 0 (ausência de dano) a 400 (presença de dano máximo).

3.7.2.4 Avaliação do dano oxidativo a proteínas

O dano oxidativo às proteínas por carbonilação foi determinado de acordo com o método proposto por Levine e Stadtman (1990). Os fígados foram homogeneizados (na diluição de 1:20) em 5% de ácido sulfossalicílico gelado e então centrifugados a 15000 g por 5 min. Removeram-se os sobrenadantes e foi adicionado aos precipitados 0,5 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10 mM em 2 M de HCl). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 1 hora, sendo vigorosamente agitadas em vórtex a cada 15 min. Então, foram adicionados 500 µL de TCA 20% e os *ependorfs* foram agitados e centrifugados por 6 min a 15000 g. Os sobrenadantes foram descartados e o excesso de DNPH foi removido lavando-se os precipitados por três vezes com uma solução de etanol: acetato de etila (1:1), e em seguida agitando-se os *ependorfs* e centrifugando por 3 min a 15000 g. Os precipitados resultantes foram dissolvidos em 1,0 mL de cloreto de guanidina 6 M, transferidos para tubos de vidro, submetidos à agitação e incubados por 15 min a 37°C, para dissolução. As absorvâncias máximas no intervalo de 360 – 370 nm foram determinadas e os valores finais das proteínas carboniladas foram determinados utilizando o coeficiente de extinção molar de 22 mM. Os brancos foram preparados substituindo-se a DNPH por HCl 2 M.

3.7.3 Determinação da Glutathiona reduzida (GSH)

Amostras de fígado foram precipitadas com TCA 12% nas diluições 1:10 (p/v) homogeneizadas com cerca de 20 impactos em homogeneizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrifugação a 5.000 g durante 5 min. A concentração de pequenos tióis foi avaliada imediatamente após a obtenção dos extratos ácidos hepáticos (BEUTLER; DURAN; KELLY, 1963). A adição de 0,2 mL de DTNB (2,5 mM) nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 8,0 e 0,1 mL do extrato ácido permitiu, após cerca de 2 min, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em mmol g^{-1} .

3.7.4 Marcadores de função hepática

3.7.4.1 Determinação da atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST)

Para determinação da atividade desta enzima foi utilizado o método cinético de tempo fixo e medição de tempo final através de um kit comercial para diagnóstico clínico (Labtest Diagnostica S.A.). Pré-incubaram-se 0,25 mL de tampão 67 mmol/L pH 7,4 contendo ácido α -cetoglutárico 2 mmol/L, ácido L-aspartico 99 mmol/L e azida sódica 15,4 mmol/l em banho a 37 °C durante 2 min. Após este período foram adicionados 0,05 mL de soro e a mistura foi incubada novamente a 37 °C durante exatamente 60 min. Posteriormente adicionou-se 0,25 mL do reagente de cor (2,4

dinitrofenilhidrazina 1 mmol/L e ácido clorídrico 1 mol/L), incubou-se a temperatura ambiente durante 20 min e adicionou-se 2,5 mL de NaOH. As absorbâncias foram determinadas em 505 nm e os valores foram expressos em UI (Unidades Internacionais).

3.8 Avaliação da atividade antifúngica dos análogos da acetofenona

A atividade antifúngica das acetofenonas foi avaliada através da determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM), conforme procedimentos descritos a seguir.

3.8.1 Preparo do inóculo fúngico

O inóculo fúngico foi preparado a partir de culturas incubadas por sete dias a 30 °C em tubos contendo ágar batata inclinado. Às culturas foram adicionadas 5 mL de solução fisiológica e deslocadas com auxílio de uma alça de Henle, formando uma suspensão de esporos e hifas. As suspensões foram transferidas para tubo estéril contendo 4 pérolas de vidro, agitadas em aparelho vórtex por aproximadamente 50 segundos e ajustadas com solução fisiológica estéril para turvação correspondente a 10^5 UFC/mL utilizando um espectrofotômetro 6100 Jenway e a densidade ótica (DO) foi medida a 530 nm.

3.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima

A atividade antifúngica foi avaliada através da determinação da CIM pelo método de microdiluição em placa. As substâncias-teste foram dissolvidas em 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), previamente esterilizado por autoclavação, e às soluções foram adicionadas 1800 μ L de caldo nutritivo. Posteriormente foram preparadas soluções seriadas com concentrações variando de 2000 a 15,6 μ g/mL, as quais foram distribuídas, em volumes de 200 μ L em placa de microdiluição (contendo 96 poços). Como controle de crescimento e de esterilidade foram usadas apenas as misturas de meio de cultura e DMSO, sem a adição de agentes antifúngicos. Em cada poço teste e de controle de crescimento foram adicionados 5 μ L de inóculo fúngico. Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas por 72 horas a 30-35 °C para os fungos. A leitura dos experimentos foi realizada através da medida da DO em leitor Elisa. Como controle positivo foi utilizado o antifúngico fluconazol frente ao *M. canis* e *T. mentagrophytes*.

A CIM foi considerada a menor concentração da substância que inibiu o crescimento fúngico após a incubação. Os resultados foram expressos em μ g/mL (INGROFF-ESPINEL et al., 1995).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer. Para tal utilizou-se o software INSTAT (GrahPad, San Diego, CA, USA) admitindo níveis de significância de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das acetofenonas e chalconas sintéticas em estudo

4.1.1 Avaliação da capacidade de captação do radical DPPH

Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que dos nove análogos da acetofenona estudados, somente a THA, a Gala e o 2,6-DHA apresentam importante efeito “scavenger” (de captação) de radicais livres, ou seja, apresentaram uma CE_{50} inferior a 500 $\mu\text{g/mL}$. Tendo sido observada uma ordem decrescente de potencial antioxidante na seguinte escala: Gala > THA >> 2,6-DHA. No entanto, é importante observar que nenhum dos compostos testados teve atividade antioxidante equivalente ao do flavonóide rutina, utilizada como controle positivo, que apresentou importante efeito “scavenger” sendo cerca de 2,5 a 39,5 vezes mais potente que os análogos das acetofenona testados.

Tabela 4. Avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e da rutina através da medida da capacidade de captação do radical 1,1 difenil-2-picril hidrazina, testadas em concentrações crescentes dos compostos (5, 10, 25, 50, 125, 250 µg/mL).

Compostos	Percentual da Atividade Antioxidante (AA%)						CE ₅₀ (µg/mL) ¹
	5	10	25	50	125	250	
THA	7,6 ± 0,9	16,1 ± 1,2	28,1 ± 1,3	40,2 ± 1,0	60,2 ± 1,0	70,6 ± 0,9	76,4 ± 0,7
Gala	sa	27,1 ± 0,3	63,8 ± 0,9	80,7 ± 0,8	85,5 ± 0,9	86,2 ± 0,9	17,7 ± 0,4
2,6-DHA	9,9 ± 0,7	17,8 ± 0,8	28,1 ± 0,8	34,4 ± 0,4	43,3 ± 0,8	52,4 ± 0,8	276,6 ± 0,5
2- HA	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	3,4 ± 0,3	6,5 ± 0,8	> 500
4-MA	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
3,4-DCA	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,7 ± 1,0	5,7 ± 0,1	7,7 ± 0,3	> 500
4-AA	sa	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,3	3,4 ± 0,6	5,5 ± 0,7	> 500
3-NA	sa	0,1 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,7 ± 0,4	> 500
4-NA	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
Rutina	32,2 ± 0,7	65,3 ± 2,4	89,2 ± 0,7	100	100	100	7,0 ± 0,6

Todos os valores foram expressos como média ± EPM e os ensaios foram realizados em triplicata

¹ Os valores da concentração efetiva (CE₅₀) foram determinados por regressão exponencial.

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.

THA = floroacetofenona; Gala = Galacetofenona; 2,6-DHA = 2,6-Dihidroxiacetofenona; 2- HA = 2-Hidroxiacetofenona; 4-MA = 4-Metoxiacetofenona; 3,4-DCA = 3,4-Dicloroacetofenona; 4-AA = 4-Aminoacetofenona; 3-NA = 3-Nitroacetofenona; 4-NA = 4-Nitroacetofenona

A tabela 5 apresenta os resultados dos ensaios de atividade antioxidante *in vitro* das 24 chalconas sintéticas avaliadas no ensaio com o radical livre DPPH. Como pode ser observado, com exceção dos compostos C8, C24, B1, B2 e B4 que apresentaram fraca atividade antioxidante (CE_{50} superior a 500 $\mu\text{g/mL}$), todas as outras chalconas apresentaram uma atividade pró-oxidante, uma vez que nas diferentes concentrações testadas o percentual da atividade antioxidante obteve valores negativos.

Tabela 5. Avaliação da atividade antioxidante de chalconas sintéticas e da rutina através da medida da capacidade de captação do radical 1,1 difenil-2-picril hidrazina, testadas em concentrações crescentes dos compostos (5, 10, 25, 50, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$).

(continua)

Compostos	Percentual da Atividade Antioxidante (AA%)						CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ¹
	5	10	25	50	125	250	
C1	-0,2 ± 0,7	sa	-0,1 ± 1,1	-0,5 ± 0,6	-1,1 ± 0,7	-7,9 ± 1,5	<i>pox</i>
C2	-3,0 ± 0,3	-2,1 ± 0,4	-2,0 ± 0,2	-1,7 ± 0,2	-2,1 ± 0,5	-1,4 ± 1,0	<i>pox</i>
C4	-2,3 ± 0,1	-2,7 ± 0,3	-5,2 ± 0,8	-0,2 ± 1,0	-9,6 ± 0,3	-0,6 ± 0,1	<i>pox</i>
C5	-0,4 ± 0,1	-1,0 ± 0,2	-0,9 ± 0,1	-0,7 ± 0,4	-0,6 ± 0,1	-4,6 ± 0,9	<i>pox</i>
C6	-0,7 ± 0,1	-0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,3	-2,4 ± 2,6	-0,1 ± 0,1	-0,8 ± 0,9	<i>pox</i>
C7	-0,2 ± 1,2	-1,6 ± 0,1	-1,7 ± 0,1	-1,2 ± 0,4	-1,3 ± 0,3	-2,8 ± 1,8	<i>pox</i>
C8	14,9 ± 1,3	22,8 ± 0,1	13,7 ± 1,1	12,9 ± 0,5	13,9 ± 1,9	3,3 ± 1,6	>500
C9	-2,0 ± 0,5	-2,7 ± 0,1	-1,3 ± 0,3	-0,3 ± 0,0	-2,6 ± 1,2	-2,9 ± 5,7	<i>Pox</i>
C11	-2,5 ± 0,3	-3,3 ± 0,6	-2,5 ± 0,4	-1,7 ± 0,8	-1,7 ± 0,3	-0,9 ± 0,4	<i>Pox</i>
C12	-2,4 ± 0,0	-2,7 ± 0,1	-2,9 ± 0,2	-3,4 ± 0,1	-4,7 ± 0,7	-4,0 ± 0,2	<i>Pox</i>

Tabela 5. Avaliação da atividade antioxidante de chalconas sintéticas e da rutina através da medida da capacidade de captação do radical 1,1 difenil-2-picril hidrazina, testadas em concentrações crescentes dos compostos (5, 10, 25, 50, 125, 250 µg/mL).

Compostos	(conclusão)						CE ₅₀ (µg/mL) ¹
	Percentual da Atividade Antioxidante (AA%)						
	5	10	25	50	125	250	
C13	-3,9 ± 4,1	-3,6 ± 0,8	-2,8 ± 4,4	-2,6 ± 0,9	-1,9 ± 0,6	-7,2 ± 0,4	<i>Pox</i>
C14	-11,5 ± 0,2	-12,8 ± 1,0	-14,0 ± 0,2	-31,6 ± 0,1	-39,3 ± 0,1	-59,3 ± 0,4	<i>Pox</i>
C15	-0,3 ± 0,6	-0,1 ± 0,1	-0,5 ± 0,5	-0,5 ± 0,4	-2,6 ± 0,2	-3,1 ± 0,7	<i>Pox</i>
C16	-2,0 ± 0,1	-2,3 ± 0,2	-2,4 ± 0,1	-2,3 ± 0,4	-2,6 ± 1,0	-3,6 ± 0,1	<i>Pox</i>
C17	-2,1 ± 0,7	-2,1 ± 0,9	-1,4 ± 0,6	-2,2 ± 0,3	-0,5 ± 1,6	-0,5 ± 0,9	<i>Pox</i>
C18	-2,6 ± 0,3	-0,1 ± 0,1	-2,4 ± 0,7	-1,2 ± 0,1	-0,6 ± 0,2	-0,6 ± 0,2	<i>Pox</i>
C19	-14,1 ± 0,5	-13,3 ± 0,6	-14,1 ± 0,6	-13,7 ± 0,4	-13,5 ± 0,2	-14,4 ± 1,1	<i>Pox</i>
C20	-1,7 ± 0,1	-2,8 ± 0,8	-1,7 ± 0,1	-1,4 ± 0,5	-1,9 ± 0,8	-1,8 ± 1,1	<i>Pox</i>
C24	0,2 ± 0,8	3,4 ± 2,3	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,2	2,6 ± 0,5	3,3 ± 0,7	>500
C25	-4,4 ± 0,1	-4,3 ± 0,1	-4,1 ± 0,5	-1,1 ± 0,8	-0,3 ± 0,1	-2,4 ± 0,3	<i>Pox</i>
B1	30,9 ± 0,7	30,9 ± 0,3	31,6 ± 0,5	29,4 ± 2,5	32,0 ± 0,2	34,9 ± 0,6	>500
B2	12,9 ± 0,7	14,1 ± 0,1	16,2 ± 0,2	17,4 ± 0,1	25,7 ± 0,1	34,7 ± 1,0	> 500
B3	-17,1 ± 4,9	-25,4 ± 1,8	-46,5 ± 0,2	-14,3 ± 0,5	-5,6 ± 0,8	-4,4 ± 0,9	<i>Pox</i>
B4	6,3 ± 0,6	6,9 ± 0,6	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,3	8,7 ± 0,2	7,0 ± 0,2	>500
Rutina	32,2 ± 0,7	65,3 ± 2,4	89,2 ± 0,7	100	100	100	7,0 ± 0,6

Todos os valores foram expressos como média ± EPM e os ensaios foram realizados em triplicata.

¹ Os valores da concentração efetiva (CE₅₀) foram determinados por regressão exponencial.

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.

pox – atividade pró-oxidante.

4.1.2 Avaliação da proteção a peroxidação lipídica em homogenato de fígado

A medida da proteção a peroxidação lipídica é uma forma indireta de avaliar o potencial antioxidante de um determinado composto, uma vez que indica o grau de proteção que este pode oferecer ao bloquear o efeito deletério dos radicais livres sobre a membrana plasmática. A Tabela 6 mostra que dos dez análogos da acetofenona estudados, somente o THA apresentou importante proteção à peroxidação lipídica (CE_{50} inferior a 500 $\mu\text{g/ml}$), enquanto Gala, 2,6-DHA, 2-HA, 3-NA e 4-NA apresentaram atividade antioxidante em concentrações superiores 500 $\mu\text{g/ml}$. Entretanto, é importante observar que o THA foi cerca de 1,34 vezes mais potente em proteger a membrana plasmática da lipoperoxidação que a rutina (controle positivo).

Tabela 6. Avaliação da atividade antioxidante dos análogos da acetofenona e da rutina através da medida da proteção à lipoperoxidação em homogenato de fígado de rato avaliada em termos de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, testadas em concentrações crescentes dos compostos (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL).

Compostos	Percentual da Atividade Antioxidante (AA%)					CE ₅₀ (µg/mL) ¹
	31,25	62,5	125	250	500	
THA	29,7 ± 1,8	36,9 ± 1,2	47,6 ± 0,3	54,3 ± 0,9	55,7 ± 1,4	151,7 ± 0,7
Gala	0,0	8,8 ± 1,8	21,7 ± 4,5	32,9 ± 1,7	37,8 ± 2,4	> 500
2,6-DHA	18,1,2 ± 2,7	25,5 ± 1,3	30,9 ± 1,2	35, ± 1,8	43,7 ± 3,8	> 500
2- HA	17,7 ± 1,4	20,1 ± 0,6	27,6 ± 1,3	29,5 ± 1,4	32,3 ± 2,4	> 500
4-MA	sa	sa	sa	sa	sa	sa
3,4-DCA	sa	sa	sa	sa	sa	sa
4-AA	sa	sa	sa	sa	sa	sa
3-NA	sa	sa	sa	7,5 ± 1,7	13,5 ± 2,3	> 500
4-NA	0,0	0,0	8,2 ± 0,9	13,3 ± 1,8	25,5 ± 2,1	> 500
Rutina	25,1 ± 2,4	35,8 ± 3,1	45,5 ± 0,9	46,9 ± 1,7	54,0 ± 1,1	203,8 ± 1,4

Todos os valores foram expressos como média ± EPM e os ensaios foram realizados em triplicata

¹Os valores da concentração efetiva (CE₅₀) foram determinados por regressão exponencial

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas

THA = floroacetofenona; Gala = Galacetofenona; 2,6-DHA = 2,6-Dihidroxiacetofenona; 2- HA = 2-Hidroxiacetofenona; 4-MA = 4-Metoxiacetofenona; 3,4-DCA = 3,4-Dicloroacetofenona; 4-AA = 4-Aminoacetofenona; 3-NA = 3-Nitroacetofenona; 4-NA = 4-Nitroacetofenona

A tabela 7 apresenta os resultados obtidos com as 24 chalconas estudadas no ensaio de avaliação da proteção à lipoperoxidação em homogenato de fígado de ratos. Como pode ser observadas, somente as chalconas C14, C15, C18, C25, B2 e B3 apresentaram atividade antioxidante importante (CE_{50} inferior a 500 $\mu\text{g/ml}$), enquanto a outras chalconas não apresentaram ou tiveram uma fraca atividade antioxidante (CE_{50} superior a 500 $\mu\text{g/ml}$).

Tabela 7. Avaliação da atividade antioxidante de chalconas sintéticas e da rutina através da medida da proteção a lipoperoxidação em homogenato de fígado de rato avaliada em termos de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, testadas em concentrações crescentes dos compostos (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$).

(continua)

Compostos	AA%					CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ¹
	31,25	62,5	125	250	500	
C1	-0,9 \pm 0,5	0,4 \pm 0,4	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	7,5 \pm 0,3	>500
C2	15,0 \pm 0,8	21,7 \pm 1,5	28,1 \pm 2,1	31,6 \pm 3,2	31,0 \pm 2,3	>500
C4	4,8 \pm 2,7	4,8 \pm 1,5	7,1 \pm 2,4	4,3 \pm 4,2	3,4 \pm 0,7	>500
C5	13,4 \pm 1,3	11,9 \pm 2,4	8,5 \pm 1,8	7,8 \pm 1,4	14,3 \pm 0,3	>500
C6	-0,5 \pm 1,9	1,2 \pm 2,9	2,4 \pm 1,2	4,1 \pm 3,6	5,4 \pm 0,8	>500
C7	0,7 \pm 0,4	1,0 \pm 0,1	5,3 \pm 1,5	2,9 \pm 1,7	7,1 \pm 0,1	>500
C8	5,8 \pm 3,5	6,87 \pm 0,3	14,3 \pm 0,1	22,6 \pm 3,1	30,4 \pm 1,7	>500
C9	sa	sa	sa	sa	sa	sa

Tabela 7. Avaliação da atividade antioxidante de chalconas sintéticas e da rutina através da medida da proteção a lipoperoxidação em homogenato de fígado de rato avaliada em termos de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, testadas em concentrações crescentes dos compostos (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL).

Compostos	(conclusão)					CE ₅₀ µg/mL) ¹
	AA%					
	31,25	CE ₅₀ (µg/mL) ¹	125	250	500	
C11	1,1 ± 1,6	7,3 ± 0,1	8,2 ± 0,2	11,5 ± 3,2	13,6 ± 3,7	>500
C12	3,3 ± 1,4	4,8 ± 0,1	5,9 ± 0,2	8,3 ± 2,0	19,7 ± 0,4	>500
C13	11,9 ± 0,6	12,0 ± 0,1	11,0 ± 1,3	15,5 ± 1,3	16,7 ± 2,4	>500
C14	14,2 ± 0,2	20,6 ± 0,1	22,9 ± 1,9	39,4 ± 1,5	79,5 ± 3,1	314,5 ± 1,9
C15	72,2 ± 2,0	75,5 ± 1,0	74,6 ± 2,1	73,5 ± 0,9	76,1 ± 0,2	<31,3
C16	10,7 ± 0,9	9,4 ± 0,6	8,3 ± 1,6	10,1 ± 5,1	10,2 ± 2,0	>500
C17	11,9 ± 4,3	8,0 ± 1,9	10,6 ± 2,0	11,1 ± 3,2	12,8 ± 0,3	>500
C18	41,7 ± 1,3	48,6 ± 1,6	51,2 ± 2,0	42,1 ± 0,3	66,4 ± 2,1	376,3 ± 2,0
C19	sa	sa	5,4 ± 0,7	3,6 ± 4,5	15,4 ± 2,5	>500
C20	sa	sa	sa	sa	sa	sa
C24	21,6 ± 0,3	32,6 ± 0,8	22,0 ± 2,8	26,6 ± 2,2	27,4 ± 5,7	>500
C25	56,6 ± 3,0	56,5 ± 0,3	53,4 ± 2,2	52,2 ± 4,0	60,8 ± 6,7	<31,25
B1	10,1 ± 0,5	8,9 ± 0,6	12,0 ± 2,3	22,5 ± 0,4	20,1 ± 2,0	>500
B2	sa	sa	sa	63,7 ± 2,1	69,7 ± 0,4	<31,25
B3	96,8 ± 0,1	92,8 ± 0,1	89,8 ± 0,1	87,7 ± 0,1	88,0 ± 0,1	<31,25
B4	1,3 ± 2,3	-4,8 ± 1,6	15,7 ± 0,1	11,5 ± 4,3	13,8 ± 2,0	>500
Rutina	25,1 ± 2,4	35,8 ± 3,1	45,5 ± 1,0	46,9 ± 1,7	54,0 ± 1,1	203,8 ± 1,4

Todos os valores foram expressos como média ± EPM e os ensaios foram realizados em triplicata

¹Os valores da concentração efetiva (CE₅₀) foram determinados por regressão exponencial

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.

4.2 Avaliação da atividade antitumoral e pró-oxidante das chalconas sintéticas

As chalconas sintéticas que apresentaram atividade pró-oxidante *in vitro* importante e que dispúnhamos em quantidades suficientes foram avaliadas com respeito a uma possível atividade antitumoral e pró-oxidante *in vivo*. Outro fator importante para escolha deste ensaio foram referências na literatura de atividade antitumoral associada a efeitos pró-oxidantes de outras chalconas naturais ou sintéticas.

4.2.1 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

4.2.1.1 Número total de células tumorais e porcentagem de células viáveis

A figura 12a demonstra que as chalconas sintéticas analisadas não apresentaram efeito na redução no número de células totais em relação ao TAE (controle positivo). Contudo, o grupo de animais tratados com CPN (cisplatina, 2,0 mg/kg) não apresentou número de células tumorais.

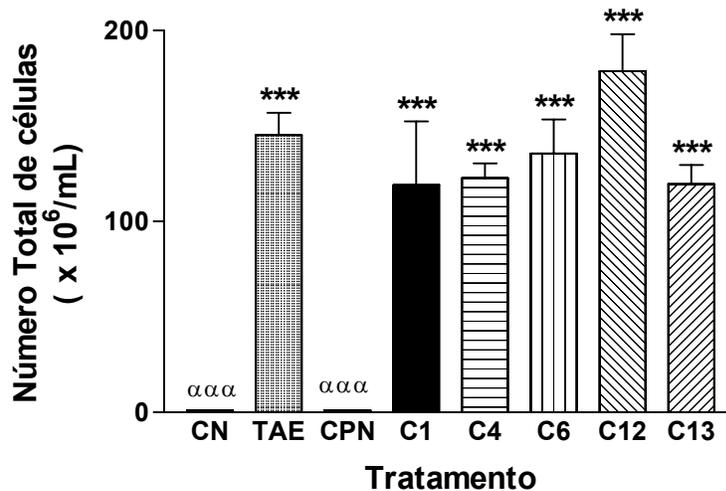


Figura 12a. Número total de células tumorais presentes no líquido ascítico de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e tratados com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.). Os valores são expressos como a média \pm EPM, n=6. (***) representa diferença estatística ($p < 0,001$) em relação aos camundongos normais (controle negativo, CN). (ααα) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$), em relação ao TAE.

A figura 12b demonstra que as chalconas sintéticas analisadas não apresentaram efeito na redução da porcentagem de células viáveis em relação ao TAE (controle positivo). Contudo, o grupo de animais tratados com CPN (cisplatina, 2,0 mg/kg), não apresentou células tumorais viáveis, correlacionando com a figura 12a onde CPN não apresentou células tumorais.

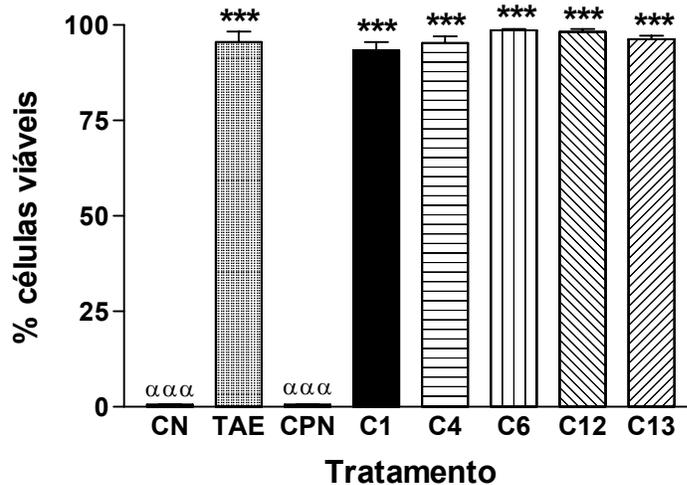


Figura 12b. Porcentagem de células tumorais viáveis presentes no líquido ascítico de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e tratados com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.). Os valores são expressos como a média \pm EPM, n=6. (***) representa diferença estatística ($p < 0,001$) em relação aos camundongos normais (controle negativo, CN). (ααα) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$), em relação ao TAE.

4.2.1.2 Volume ascítico Total e de células compactadas

Os dados apresentados na figura 13a mostram que as chalconas não causaram efeito significativo na redução ou inibição do volume ascítico, quando comparado ao grupo TAE (controle positivo). Os grupos CN (controle normal) e CPN (cisplatina) não apresentaram volume ascítico.

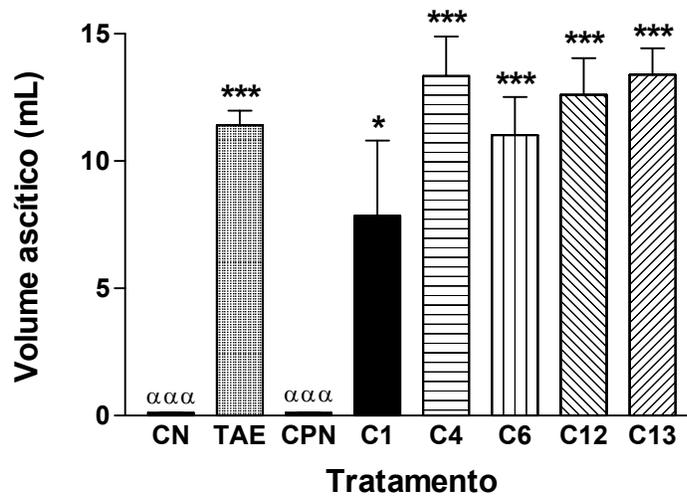


Figura 13a. Volume total de líquido ascítico de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.). Os valores são expressos como a média \pm EPM, n= 6. (***) e (*) representam, diferença estatística significativa ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$), respectivamente em relação aos camundongos normais (controle negativo, CN). (ααα) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao TAE.

A figura 13b demonstra que há uma redução significativa ($p < 0,01$) do volume de células compactadas do composto C1 em relação ao grupo TAE (controle positivo). Confirmando os dados obtidos para o volume ascítico, o número de células totais e porcentagem de células viáveis, não há diferença estatística significativa no tratamento com as outras chalconas.

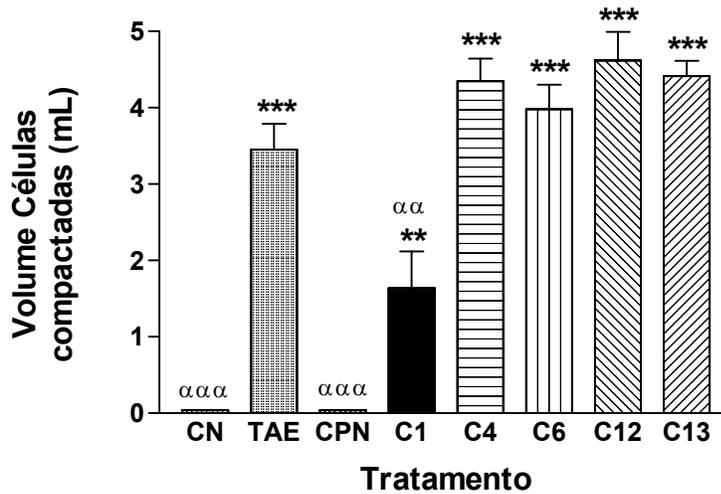


Figura 13b. Volume células compactadas (mL), presentes no líquido ascítico, após centrifugação, em camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.). Os valores são expressos como a média \pm EPM, $n = 6$ animais. (***) e (**) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$) respectivamente em relação aos camundongos normais (controle negativo, CN). (ααα) e (αα) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$) respectivamente em relação ao TAE.

4.2.1.3 Variação de peso

Os dados apresentados na figura 14 indicam que o grupo TAE apresentou um ganho de peso cerca de 2,5 vezes maior quando comparado ao grupo controle negativo (CN) e que o grupo CPN teve uma significativa perda de peso ($p < 0,001$) quando comparado a este mesmo controle. Também é importante observar que os animais tratados com C4 e C12 apresentaram uma perda de peso significativa em comparação ao grupo TAE ($p < 0,05$).

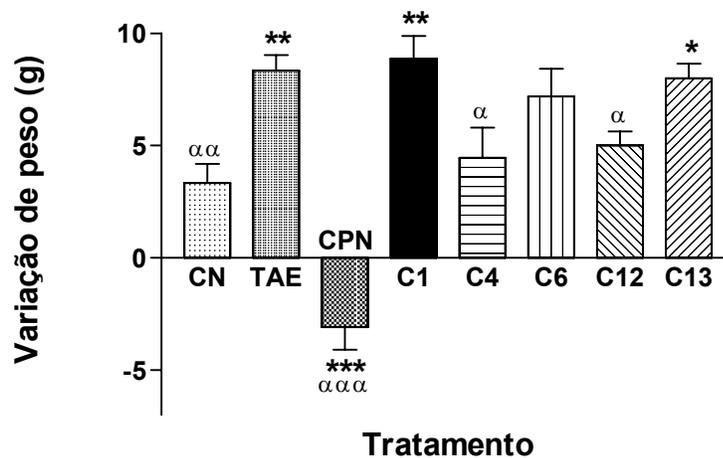


Figura 14. Variação de peso (g) de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (**), (***) e (*) representam diferenças estatísticas ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$), respectivamente em relação aos camundongos normais (controle negativo, CN). (αα), (ααα) e (α) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$) em relação ao TAE.

4.2.1.4 Média de sobrevida

A figura 15 demonstra que os camundongos tratados com chalconas não tiveram diferença significativa na média de sobrevida em relação ao grupo TAE. Porém os grupos controle negativo, CN e tratado com cisplatina, CPN foram observados pelo período de 30 dias e não houve nenhuma morte neste período.

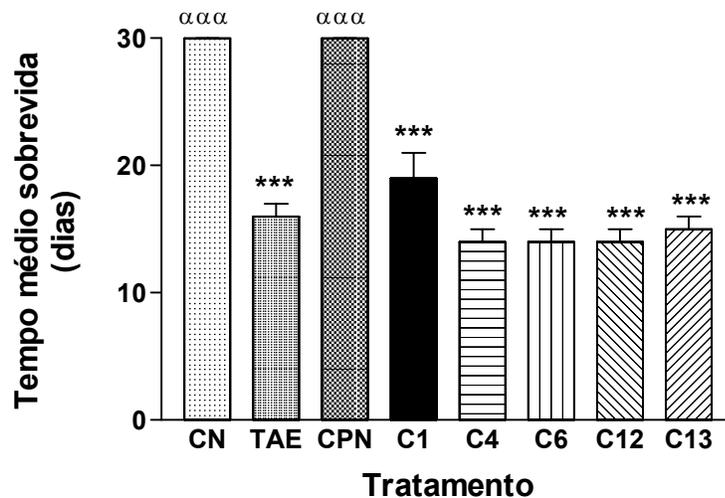


Figura 15. Média de sobrevida de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.). (***) representa diferença estatística ($p < 0,001$) em relação aos camundongos normais (controle negativo, CN). (ααα) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao TAE.

4.2.2 Avaliação da atividade pró-oxidante *in vivo* associada ao TAE

4.2.2.1 Avaliação do dano à membrana celular

4.2.2.1.1 Avaliação da lipoperoxidação tecidual pelo TBARS

O grupo de camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich (grupo TAE) aumentou cerca de 10 vezes a peroxidação lipídica quando comparado ao CN (figura 16). Entretanto, somente os animais tratados com a chalcona C6 apresentaram diferença significativa na lipoperoxidação (45% de redução) quando comparado com o grupo TAE ($P < 0,05$). Os demais tratamentos confirmam os resultados obtidos da atividade antioxidante *in vitro*, demonstrando não proteção a lipoperoxidação.

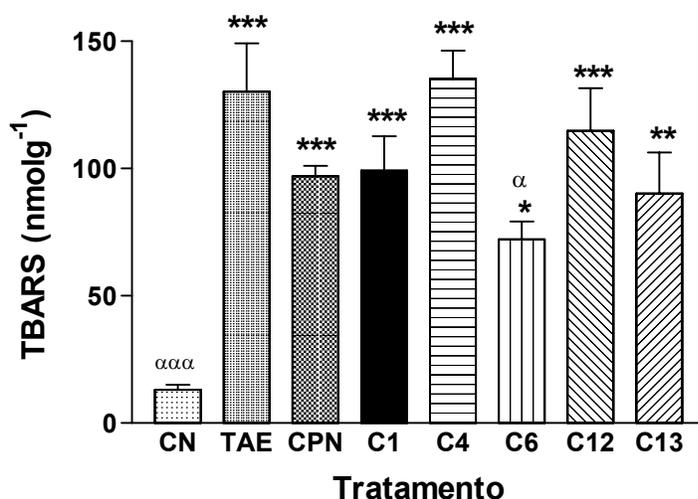


Figura 16. Índice de peroxidação lipídica (TBARS; nmol/g) em fígados de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) , (**) e (*) representam diferenças estatísticas ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$) respectivamente em aos camundongos normais (controle negativo, CN). (ααα) e (α) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$), respectivamente, em relação ao TAE.

4.2.2.1.2 Avaliação de hidroperóxido lipídico pelo FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja)

O tumor ascítico de Ehrlich levou a um aumento de aproximadamente 43% na geração de hidroperóxido nas membranas dos hepatócitos (figura 18) quando comparado com o controle negativo, CN. Entretanto, diferentemente do que foi observado com o TBARS que avalia o total de lipoperóxidos gerados, os dados apresentados na figura 17 indicam que a chalcona C1 e C4 foram capazes de reduzir 1,62 e 1,26 vezes de forma significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) respectivamente, o índice de hidroperóxido lipídico nos camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich em relação ao grupo TAE.

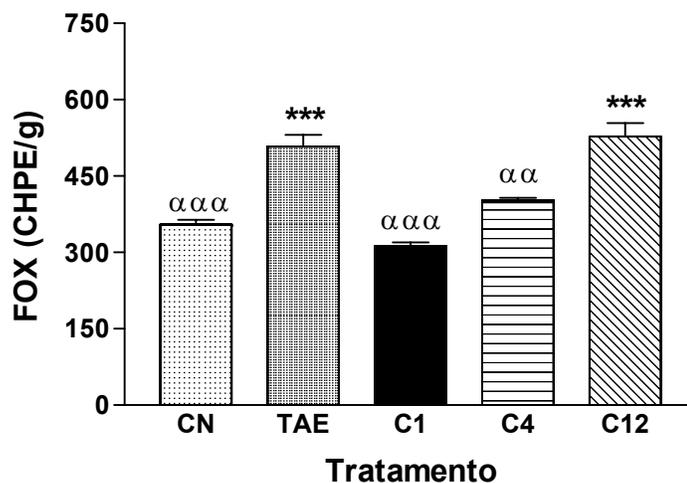


Figura 17. Índice de hidroperóxido lipídico (FOX; CHPE/g) em fígados de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com as chalconas C1, C4, e C12, (5,0 mg/kg, i.p.). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação aos camundongos normais (controle negativo, CN). ($\alpha\alpha\alpha$) e ($\alpha\alpha$) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$) respectivamente em relação ao TAE.

4.2.2.2 Medida de dano ao DNA

Os cometas de cada grupo foram classificados em classes, de acordo com o tamanho da cauda, variando de cometas sem cauda (com ausência de dano, classe 1) até cometas que apresentaram cauda longa (dano máximo, classe 5). Para validação do experimento, foram analisadas lâminas do sangue de camundongos controle negativo e lâminas de sangue tratadas com peróxido de hidrogênio 1000 μM . A tabela 8 apresenta a porcentagem de cometas em cada classe para cada grupo analisado. O CN demonstrou uma baixa porcentagem de dano ao DNA, com cometas principalmente nas classes 1 (73%) e 2 (23%). A chalcona C4 mostrou-se um causador de dano ao DNA, já que os cometas deste grupo classificaram-se principalmente nas classes 3 (48,3%) e 4 (34,2%). Contudo, chalconas C1 e C12 concentraram-se principalmente nas classes 2 (66,2%) e (78,1%) e classe 3 (22,1%) e (14%), respectivamente, assemelhando-se ao grupo TAE classe 2 (72,3%) e classe 3 (14,8%). Não apresentando tão bons resultados quanto o CN.

Tabela 8. Frequência das diferentes classes de dano de cometas observados no sangue total de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com as chalconas C1, C4 e C12 (5,0 mg/kg, i.p.).

	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
CN	73%	23%	0%	0%	0%
TAE	10%	72,3%	14,8%	2,9%	0%
C1	11,6%	66,2%	22,1%	0,1%	0%
C4	0,8%	7,1%	48,3%	34,2%	9,6%
C12	7,1%	78,1%	14%	0,8%	0%

A partir da frequência das diferentes classes de danos nos cometas, foi possível calcular o índice de dano ao DNA atribuindo valores arbitrários as diferentes classes. Desse modo, o índice de dano pode variar entre 0 (ausência de dano) a 400 (dano máximo). Conforme apresentado na figura 18, o índice de dano ao DNA esteve aumentado, com relação ao grupo controle, em torno de 105% nos animais inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, TAE. Os animais tratados com as chalconas C1, C4 e C12 tiveram um aumento de 104%, 351% e 100% respectivamente em relação ao grupo controle negativo, CN. O grupo tratado com a chalcona C4 aumentou cerca de 120% em relação ao TAE. Demonstrando que os grupos tratados não foram capazes de reduzir o índice de dano e que o composto C4 foi capaz de promover um dano ao DNA ainda maior que o grupo TAE.

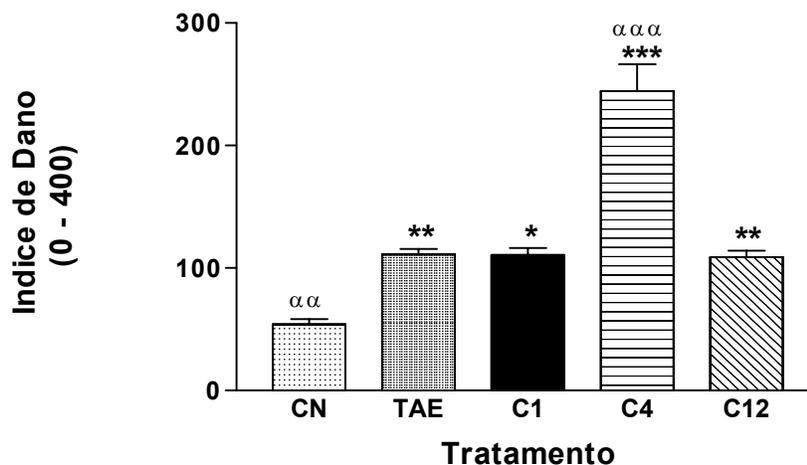


Figura 18. Índice de dano ao DNA em sangue total de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com as chalconas C1, C4 e C12 (5,0 mg/kg, i.p.). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6. (***) (***) e (*) representam diferenças estatísticas ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$), respectivamente em relação aos camundongos normais (controle negativo, CN). ($\alpha\alpha\alpha$) e ($\alpha\alpha$) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) respectivamente, em relação ao TAE.

4.2.2.3 Avaliação do dano oxidativo a proteínas por carbonilação

A figura 19 demonstra que somente a chalcona C1 foi capaz de elevar significativamente a carbonilação de proteínas ($p < 0,05$), diferentemente do TAE que aparentemente não leva a um dano oxidativo de proteínas. Curiosamente, os dados obtidos também sugerem que C4 foi capaz de proteger os hepatócitos do dano oxidativo avaliado através da carbonilação de proteínas.

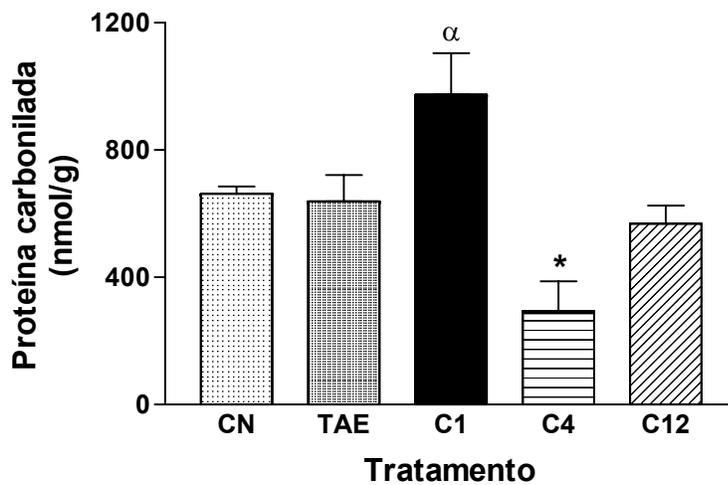


Figura 19. Índice de carbonilação de proteínas (nmol/g) em fígados de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com as chalconas C1, C4 e C12 (5,0 mg/kg, i.p.). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$), em relação aos camundongos normais (controle negativo, CN). (α) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao TAE.

4.2.2.4 Defesas antioxidantes não enzimáticas (tióis não protéicos) GSH hepática

Quando analisados os valores de GSH hepático (figura 20) em que todos os grupos de animais que foram inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich apresentaram uma significativa redução ($p < 0,001$) nos níveis deste tiol não protéico. Entretanto, observa-se que os grupos tratados com cisplatina (CPN) e a chalcona C12 apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) na concentração de GSH, em comparação ao grupo positivo (TAE), causando um certo efeito hepatoprotetor, porém não chega a restabelecer o padrão normal.

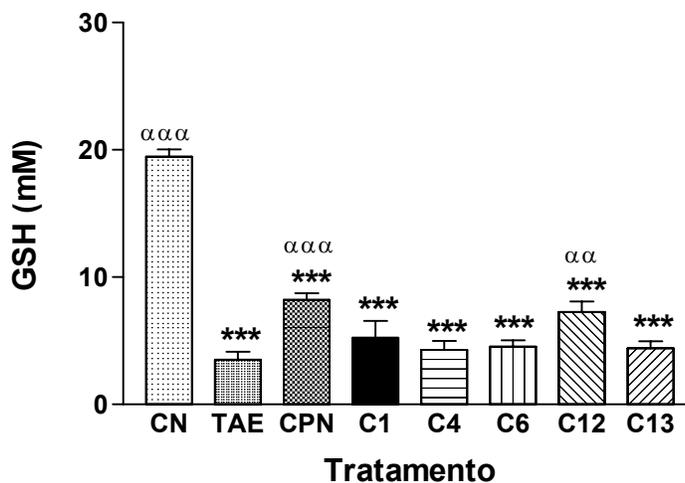


Figura 20. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) hepática (mM) em fígados de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com cisplatina, CPN (2,0 mg/kg, i.p.) e com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13, (5,0 mg/kg, i.p.). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação aos camundongos normais (controle negativo, CN). (ααα), (αα) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$), ($p < 0,01$), respectivamente, em relação ao TAE.

4.3 Marcadores da função hepática

4.3.1 Determinação da atividade da aspartato amino transferase

A figura 21 demonstra que não houve diferenças estatisticamente significativas em camundongos tratados com chalconas quando comparados ao grupo TAE e CN. Portanto não houve toxicidade hepática nos diferentes tratamentos.

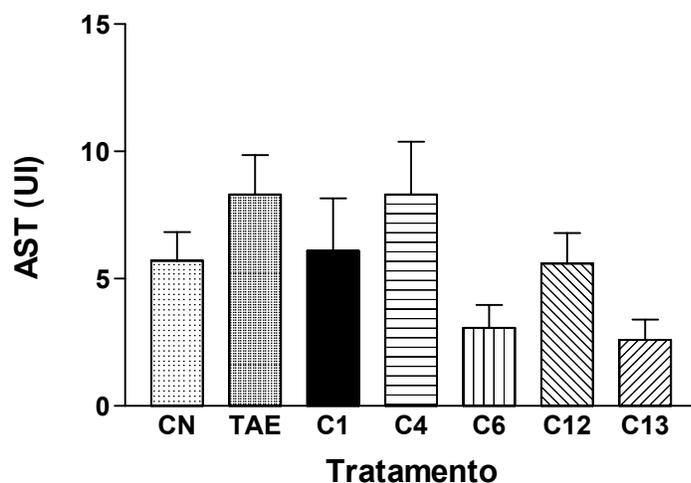


Figura 21. Atividade da aspartato aminotransferase (UI) em fígados de camundongos inoculados com TAE, controle positivo, TAE, posteriormente tratados com as chalconas C1, C4, C6, C12 e C13 (5,0 mg/kg, i.p.). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6. Não houve diferença estatística significativa nos grupos tratados em relação ao controle normal (controle negativo, CN) e controle positivo TAE.

4.4 Avaliação da atividade antifúngica dos análogos da acetofenona

As acetofenonas apresentaram atividade antioxidante importante, foram avaliados com respeito a uma possível atividade antifúngica. Um dos fatores para escolha deste ensaio foram referências na literatura de atividade antifúngica para outros análogos naturais ou sintéticos da acetofenona.

Os dados apresentados na tabela 9 mostram que os análogos da acetofenona apresentam importante atividade antifúngica. A Gala foi o composto mais ativo contra os fungos filamentosos *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *E. floccosum*, contudo, em relação à *C. albicans*, a Gala foi menos ativo que o THA. É importante ressaltar que o efeito antifúngico da Gala contra o *M. canis* foi 2 vezes mais potente do que o antifúngico fluconazol utilizado como composto padrão para avaliação da CIM das acetofenonas avaliadas. A THA, 3,4-DCA, 4-AA, 3-NA também apresentaram atividade antifúngica importante contra *M. canis* e *T. mentagrophytes*, entretanto as CIM obtidas sempre foram maiores ou iguais ao do fluconazol.

Tabela 9. Determinação da atividade antifúngica de análogos da acetofenona e do fluconazol pelo método de microdiluição em placas com a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL

Compostos	CIM (µg/mL)				
	<i>M. canis</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>E. floccosum</i>	<i>C. albicans</i>
THA	187	125	> 2000	1000	125
Gala	62,5	62,5	31,2	250	250
2,6-DHA	1000	125	<i>nt</i>	<i>nt</i>	1000
3,4-DCA	187	125	<i>nt</i>	<i>nt</i>	375
4-AA	125	125	<i>nt</i>	<i>nt</i>	625
3-NA	187	125	<i>nt</i>	<i>nt</i>	250
4-NA	500	125	<i>nt</i>	<i>nt</i>	375
Fluconazol	125	0,6	<i>nt</i>	<i>nt</i>	<i>nt</i>

THA = floroacetofenona; Gala = Galacetofenona; 2,6-DHA = 2,6-Dihidroxiacetofenona; 3,4-DCA = 3,4-Dicloroacetofenona; 4-AA = 4-Aminoacetofenona; 3-NA = 3-Nitroacetofenona; 4-NA = 4-Nitroacetofenona; *nt* = não testado.

5 DISCUSSÃO

Vários métodos têm sido desenvolvidos para mensurar a capacidade seqüestradora de radicais livres, como uma medida da atividade antioxidante *in vitro*. Estes métodos são geralmente baseados na inibição da acumulação de produtos oxidados porque a geração de radicais livres é bloqueada pela adição de antioxidantes, o que leva a uma redução do radical livre (CHOI et al., 2002).

Para verificar a capacidade de captação de radicais livres dos compostos descritos no presente trabalho, foi mensurado espectrofotometricamente o desaparecimento do DPPH, um radical livre estável, que possui um elétron desemparelhado e apresenta uma coloração violeta em solução etanólica na sua forma radicalar. Na presença de moléculas antioxidantes este radical recebe um elétron ou um hidrogênio para tornar-se um composto mais estável e no momento que os elétrons começam a emparelhar-se sua absorção diminui, o que leva a redução ou desaparecimento da coloração. O ensaio do DPPH tem sido largamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos de plantas e microbianos (MENSOR et al., 2001; KO et al., 1998). Segundo Mathiesen e colaboradores (1997), a captação do radical DPPH parece dar resultados razoavelmente bem correlacionados com outros métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* que utilizam sistemas biológicos e não biológicos.

No presente trabalho, a capacidade de captação do radical livre dos análogos sintéticos da acetofenona e chalconas foi avaliada através de suas habilidades de seqüestrar o radical sintético DPPH e comparada com um flavonóide conhecido pela

sua atividade antioxidante, a rutina. Dos 33 compostos investigados somente os análogos sintéticos da acetofenona apresentaram atividade antioxidante devido a capacidade seqüestradora do radical DPPH e os valores de CE_{50} obtidos para estes análogos mostraram-se dose-dependente. Entretanto, os valores de CE_{50} obtidos ainda foram maiores que o flavonóide rutina (tabelas 4 e 5). Segundo Cotellet e colaboradores (1996) e Fauconneau e colaboradores (1997) a correlação do potencial antioxidante de compostos fenólicos em captar o radical DPPH, pode estar envolvido na capacidade de formação de radicais estáveis, e esta capacidade depende da conformação estrutural associada com a presença do grupamento hidroxila.

De forma semelhante, os resultados corroboram o que vários autores citam com relação aos compostos fenólicos, pois se observa que a capacidade seqüestradora dos análogos da acetofenona foi maior nos compostos com maior número de hidroxilas na sua estrutura (tabela 4), seguindo a seguinte ordem decrescente de número de hidroxilas GALA = THA > 2,6-DHA >> 2-HA, sendo que a atividade antioxidante também obedeceu esta mesma ordem de grandeza.

Com relação as chalconas, Nakamura et al. (2003) acreditam que a capacidade de captação de radicais livres por estes compostos está associada à perda do átomo de hidrogênio fenólico e que a presença do grupamento 2-OH no anel A da molécula, esteja envolvido na capacidade das chalconas em sequestrar radicais livres. Porém com relação as chalconas analisadas no presente estudo, o único composto que tem grupamento 2-OH no anel A, o C12, (figura 10) apresenta uma única hidroxila e também apresenta duplas conjugadas, razão pela qual não apresentou atividade antioxidante. Por outro lado, chalconas que possuem duplas conjugadas apresentam

menor deslocamento químico devido a menor influência da ressonância dos anéis e dos efeitos indutivos exercidos pelos substituintes (SANTOS, 2003), podendo ser esta, portanto uma possível justificativa para a ausência de atividade antioxidante das chalconas avaliadas neste trabalho em relação ao radical DPPH.

Nakamura e colaboradores (2003) também postularam que dihidroxichalconas sem a presença do grupamento 4-OH no anel B também apresentaram atividade antioxidante e que dihidrochalconas com grupamento 4-OH no anel B apresentaram muito pouca atividade, ou seja, não encontraram correlação entre a capacidade de captação do radical DPPH dos compostos dihidroxilados com a presença de grupamento 4-OH no anel B. Nerya e colaboradores (2004) também não encontraram atividade em seus estudos com chalconas com grupamento 4-OH no anel B. Isso vem corroborar nossos resultados com relação ao composto C14 (figura 9) que possui um único grupamento OH na posição quatro do anel B e não demonstrou atividade “scavenger”. O composto C25 (figura 9) possui grupamento hidroxila na posição seis do anel benzênico A, e é possível que o grupamento nesta posição não participe da atividade seqüestradora do radical DPPH, uma vez que, sua conformação pode formar uma forte ponte de hidrogênio com o grupo carbonil, sendo portanto incapaz de doar o próton do grupo hidroxil. Nakamura e colaboradores (2003) relataram a atividade antioxidante da 2,4,6-hidroxiacetofenona associada a estrutura parcial da dihidroxichalcona.

Rezk e colaboradores (2002) propuseram que a estabilização do radical livre que ocorre depois da abstração de hidrogênio, pode fazer parte da atividade antioxidante da chalcona floretin, podendo envolver a transformação ceto-enol tautomérica, entre o

grupo carbonil e o alfa-metileno. Esta capacidade seqüestradora do radical DPPH já relatada na literatura para a 2,6-hidroxiacetofenona foi também observada no presente trabalho para este composto.

Em relatos da literatura observou-se que a capacidade sequestradora de radicais livres, tanto das acetofenonas quanto das chalconas sintéticas, apresentam uma correlação estrutura-atividade influenciada pelo grupamento ceto presentes em ambas as classes e pelos farmacóforos substituintes no anel A (grupamento OH), que dependem do número e da posição desses substituintes.

As EROs podem causar dano celular por peroxidação da membrana lipídica, inativação da enzima sulfidril, “cross-linking” de proteínas e quebra de DNA. Este dano pode estar envolvido na etiologia de diversas patologias humanas, como doenças cardíacas, inflamação, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), câncer e intoxicação alcoólica (MAXWELL, 1995).

Sabe-se que muitas substâncias que se encontram em várias plantas têm atividade antioxidante e essas substâncias, especialmente os flavonóides, amplamente distribuídos no reino vegetal tem a habilidade de captar ou seqüestrar radicais livres pela simples transferência de elétrons (CHOI et al., 2002).

O método de avaliação da proteção a lipoperoxidação pelo ensaio com o TBARS *in vitro* é utilizado para avaliar a inibição da peroxidação lipídica provocada por um pró-oxidante, peróxido de terc-butila, que causa dano oxidativo em homogenato de fígado (CHEN; TAPPEL, 1996).

A avaliação da inibição a peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS *in vitro* mostrou uma relação dose-dependente para o controle rotina e também para alguns

análogos sintéticos da acetofenona. Porém, somente a THA apresentou proteção a lipoperoxidação em baixas concentrações (500µg/ml) sendo inclusive mais efetiva até que a própria rutina (tabela 6). Estudos prévios realizados por Cao; Sofic e Prior (1997) e Cos e colaboradores (1998), sugerem que o potencial antioxidante de alguns flavonóides estaria associado tanto a presença de hidroxilas fenólicas quanto à conjugação destas hidroxilas com grupamento ceto, o que permitiria a quelação de metais de transição responsáveis pela catalisação da reação de Fenton e conseqüentemente evitaria a geração do radical livre hidroxil. Então, poderíamos especular que a THA teve melhor efeito na inibição da peroxidação lipídica do que a rutina, por apresentar três hidroxilas ceto conjugadas em sua estrutura fenólica o que não acontece com a rutina. As outras acetofenonas hidroxiladas (2,3,4-trihidroxiacetofenona, 2,6-dihidroxicetofenona, 2-hidroxiacetofenona e as com grupamento nitro (grupamento hidrofóbico), 3-nitroacetofenona e 4-nitroacetofenona tiveram um fraco efeito, possivelmente relacionado a sua conformação, menor número de hidroxilas ou ausência de hidroxila. Da mesma forma acetofenonas com substituinte somente com grupos metoxi, cloro e amino não tiveram atividade, demonstrando a importância do grupamento hidroxila.

Das 24 chalconas avaliadas nenhuma apresentou proteção da peroxidação lipídica mais efetiva que o flavonóide rutina (tabela 7). A que apresentou resultado mais significativo foi a C14, chalcona com hidroxila no anel B, que curiosamente não havia apresentado atividade antioxidante na capacidade de captação do radical DPPH, mas pode atuar como antioxidante no sistema de oxidação de membrana.

As principais características estruturais associadas à proteção da peroxidação lipídica observadas nos compostos C14 e C25, (figura 9) foram grupamentos OH no anel A, para o composto C15 (figura 9) a presença do grupo NO₂ (eletronegativo) no anel B, C18 amina no anel B, (figura 9) e para o B2, composto bromado na cadeia olefínica e CH₃ no anel B (figura11). Relatos existentes na literatura indicam que dihidroxichalconas e chalconas com substituintes 2-OH no anel A e 4-OCH₃ no anel B inibem a peroxidação lipídica e compostos com substituintes clorados não apresentaram esta inibição (RUBY et al., 1995).

Entretanto, é importante notar que de maneira geral no presente trabalho foi demonstrado que os análogos sintéticos da acetofenona teriam atividade antioxidante, ao contrário das chalconas que claramente apresentaram um perfil pró-oxidante.

Existem alguns trabalhos na literatura que relatam uma atividade antitumoral para chalconas. Sabzevari e colaboradores (2004) tentando determinar um possível mecanismo de ação que justifique esta atividade antitumoral realizaram estudos com chalconas hidroxiladas em hepatócitos de ratos e sugeriram que a citotoxicidade de chalconas para hepatócitos e possivelmente para células tumorais estava relacionado a sua habilidade de formar radicais fenoxil pró-oxidantes e causar um desacoplamento da mitocôndria. Portanto estes autores postularam que a atividade antitumoral de chalconas hidroxiladas estaria associada ao seu potencial pró-oxidante.

Além disto, a atividade citotóxica de algumas chalconas já foi relacionada a diferentes mecanismos de ação dentre os mais citados estão: (i) inibição a incorporação celular da timina, uridina e leucina, inibindo desta forma a síntese de RNA, DNA e proteínas; (ii) inibição não-competitiva da interação entre 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e a

glutathione S-transferase (GST) (DIMMOCK et al., 1999); (iii) desestabilização dos microtúbulos, através da competição com a colchicina pelo sítio ativo da tubulina, provocando um decréscimo no crescimento tumoral, alquilação do processo mitótico (LAWRENCE; McGOWN; DUCKI, 2000; LAWRENCE; RENNINSON; McGOWN, 2001); (iv) inibição da interação entre a oncoproteína MDM2 e a proteína de supressão tumoral p53, levando a um aumento da atividade transcripcional da p53, reativando a integridade genômica (STOLL; RENNER; HANSEN, 2001); (v) inibição da liberação de histamina, possivelmente através da inibição da proteína C quinase (PKC), já que esta enzima constitui um importante receptor para certos tipos de tumores, exercendo uma atividade antitumoral (MIDDLETON et al., 1987).

A aplicação das chalconas no tratamento quimioterápico do câncer ganhou destaque, devido a seu potencial de restaurar a sensibilidade celular, através da inibição da glicoproteína-P (uma proteína de membrana responsável pela exportação de fármacos para o meio extracelular), a qual após longa exposição ao tratamento quimioterápico encontra-se ativa em um mecanismo de super expressão que acaba inibindo a ação quimioterápica (BOIS et al., 1998).

O agente quimioterápico cisplatina, usado como padrão em nossos estudos para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, gera espécies reativas de oxigênio que facilmente reagem com várias moléculas, incluindo enzimas e DNA; e também causa a redução de níveis de antioxidantes no plasma (NISHIKAWA et al., 2001; YOSHIDA et al., 2003; ANTUNES; BIANCHI, 2004). O mecanismo pelo qual os compostos de platina induzem danos nas células renais ainda não está completamente esclarecido. Entretanto, a produção de radicais livres de oxigênio nas células tubulares dos rins, tem

sido considerada um processo patológico importante na nefrotoxicidade provocada pela cisplatina (ANTUNES; BIANCHI, 2004). Este quimioterápico também tem a capacidade de causar depressão da medula óssea, perda de peso (NISHIKAWA et al., 2001; MAZUMDER et al., 2004), disfunção de células gastrointestinal, indução de apoptose de células da mucosa intestinal e diminuição de várias funções do intestino pelo mecanismo de inibição da L-carnitina a qual protege a mitocôndria, náusea, perda de apetite, diarreia (NISHIKAWA et al., 2001).

Por outro lado, segundo Elseendorn e colaboradores (2001), a administração de antioxidantes não parece interferir no efeito antitumoral dos antineoplásicos, pois estes fármacos eliminam as células cancerosas por meio de outros mecanismos celulares que não envolvem a ação das EROs. Portanto, os antioxidantes poderiam atuar como quimioprotetores, prevenindo contra os efeitos colaterais das EROs e o desenvolvimento de cânceres secundários, relacionados com as mutações induzidas pelo estresse oxidativo no DNA, mas não teriam uma ação direta sobre o processo tumoral .

Além disso, trabalhos realizados com extratos de polissacarídeos de cogumelos que demonstraram ter atividade antitumoral, mas não inibiram a peroxidação lipídica, portanto, mais uma vez foi constatado que a atividade antitumoral e antioxidante não pode ser diretamente correlacionada (LIU; OOI; CHENG, 1997).

As evidências epidemiológicas que suportariam um efeito protetivo dos flavonóides, com conhecidas propriedades antioxidantes, contra o câncer são ainda limitadas e inconsistentes, estando o mesmo mais associados a um efeito citoprotetor preventivo que um agente antitumoral direto (LE MARCHAND, 2002). Na verdade,

artigos recentes apontam para um efeito antitumoral associado à atividade pró-oxidante (SABZEVARI et al., 2004).

Dentro deste contexto, o presente trabalho avaliou chalconas com atividade pró-oxidante, que haviam quantidades disponíveis para serem testadas *in vivo* e que apresentaram um claro perfil pró-oxidante avaliado pelo ensaio com DPPH e TBARS *in vitro*. Também teria sido interessante testar as chalconas hidroxiladas que foram avaliadas *in vitro*, para atividade antitumoral, mas somente a chalcona C12 tinha quantidade suficiente para ser testada *in vivo*.

Um primeiro critério básico para um “screening” do potencial de qualquer agente tumoral é o aumento da sobrevivência dos animais (CLARKSON; BURCHENAL, 1965). Além deste parâmetro, para avaliar a atividade antitumoral de alguns compostos da classe chalconas, foram analisados também o número total de células tumorais, porcentagem de células viáveis, volume ascítico total, volume de células compactadas e variação de peso.

Confirmando dados já existentes na literatura, os ensaios realizados apresentaram um aumento rápido e regular do volume ascítico nos camundongos inoculados com TAE. O fluído ascítico é uma fonte nutricional direta para células tumorais, um aumento no fluído ascítico com o crescimento do tumor significa obter nutrientes para as células tumorais (GUPTA et al., 2004). Em nosso estudo foi demonstrado que somente a chalcona C1, sem substituição, teve uma diminuição significativa do volume de células compactadas, $p < 0,05$, em relação ao grupo controle positivo.

A cisplatina, utilizada como fármaco referência no trabalho, causa depressão de medula óssea juntamente com nefrotoxicidade aguda, podendo causar um balanço negativo de nitrogênio em animais tratados, o qual resulta na perda de peso. (MAZUNDER et al., 2004). Este efeito foi confirmado nos experimentos, havendo uma perda de peso significativa em relação ao controle positivo. É importante notar que o ganho de peso no grupo positivo tem uma correlação com o número de células tumorais e medida do volume ascítico, pois o tumor cresceu de forma exponencial, isto porque o comportamento agressivo do TAE causa mudanças dramáticas na energia e metabolismo do nitrogênio de hospedeiros. Até o décimo dia de inoculação o tumor cresce de forma exponencial e inicia uma redução no número de células no décimo terceiro dia (SEGURA et al., 1997). Por isso foi preconizado no presente experimento, sacrificar os animais os no décimo dia após da inoculação.

Com relação as chalconas, somente o composto C4 (figura 9), substituinte clorado no anel B e C12 (figura 10) com dupla cadeia conjugada e hidroxila no anel A, apresentaram uma perda de peso significativa em relação ao controle positivo (figura 14).

Entretanto, os parâmetros número de células tumorais, porcentagem de células viáveis e média de sobrevivência observados no trabalho realizado, sugerem que as chalconas avaliadas não apresentaram uma atividade antitumoral, uma vez que não houve diferença significativa entre os animais tratados com TAE e com esta classe de compostos. Ruby e colaboradores (1995), estudaram os efeitos de algumas chalconas na redução do tumor em camundongos, através da porcentagem de sobrevivência dos grupos tratados e constatou que chalconas com substituinte hidroxila nas posições *orto*

ou *para* e chalconas que obtiveram a combinação hidroxila e metoxi (sempre havia uma hidroxila na posição 2-OH do anel A) poderiam reduzir o tumor ascítico induzido pelas células ascíticas de Ehrlich e chalconas somente com grupamento metila não apresentaram atividade antitumoral, sugerindo como causa a natureza hidrofóbica do grupamento metila. Neste trabalho, o composto C13, apresenta como substituinte o grupamento metila e é a único composto, dentre as 24 chalconas, que também foi testado pelo autor, e também não demonstrou atividade antitumoral.

A peroxidação lipídica, uma reação de propagação em cadeia catalítica de radicais livres é associada com condições patológicas de uma célula. O malondealdeído, produto final da peroxidação lipídica (TBARS), já foi relatado estar em concentração elevada em tecidos cancerígenos quando comparado a tecidos normais (YAGI, 1987).

Gupta e colaboradores (2004), demonstraram a indução da peroxidação lipídica pelo tumor ascítico de Ehrlich. Confirmando estes dados, o presente estudo também demonstrou uma elevação no índice de peroxidação lipídica em camundongos inoculados com o TAE (figura 16). É importante ressaltar que a cisplatina também apresentou elevação no índice, tanto neste experimento como já descrito por Yoshida e colaboradores (2003).

De forma semelhante, todas as chalconas testadas elevaram o índice de peroxidação no fígado, com exceção do grupo testado com chalcona C6 (figura 9) que apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) neste índice comparado com o grupo TAE, mas não foi capaz de restabelecer aos valores normais. Esta proteção pode

indicar um possível efeito antioxidante *in vivo* deste composto que apresenta somente substituição do halogênio bromo, no anel A.

Métodos como o TBARS, comumente usado para detectar a peroxidação lipídica em extrato de tecidos de animais, serve para mensurar substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico e conjugação de dienos, embora tenha sido criticado como forma de avaliação ao dano oxidativo, pela sua baixa especificidade (MEAGHER; FITZGERALD, 2000). O FOX, formação do complexo Fe(III) xilenol-laranja (da reação de Fe(II) com peróxidos na presença de xilenol-laranja), tem sido proposto como um método seguro para detecção de lipoperoxidação em tecidos de invertebrados (MONSERRAT et al., 2003) pois é sensível para a determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e tem uma correlação positiva com o ensaio de TBARS (HERMES-LIMA; WILMORE; SOREY, 1995).

Das chalconas avaliadas pelo FOX (figura 17), a chalcona C1 (ausência de substituintes) e C4 com substituição metila no anel A e substituinte halogenado clorado no anel B (figura 9), apresentaram uma redução significativa na concentração de hidroperóxidos em relação ao grupo TAE.

O fígado dos grupos CPN, C6 e C13 foram armazenados para posterior determinação deste ensaio, porém houve deterioração deste material.

Curiosamente, o composto C12, em relação aos compostos, teve um desempenho inesperado, pois apresentou um aumento não significativo em relação ao TAE no número de células, teve um discreto aumento no volume ascítico e volume de células compactadas, mas o ganho de peso não foi significativo em relação ao grupo controle negativo, também foi o único grupo que não apresentou diferença significativa

em relação ao TAE no índice de hidroperóxido lipídico. Qureshi e colaboradores (2001) observaram comportamento semelhante quando investigaram os efeitos do ácido bórico em camundongos com tumor de Ehrlich e observaram que houve um aumento na proliferação de células no peritônio de camundongos e sua viabilidade, também observaram redução na sobrevivência, aumento de níveis de malondealdeído e um aumento de peso.

O ensaio do cometa é um ensaio sensível, confiável e rápido para a detecção de quebras de simples e duplas fitas de DNA em células eucarióticas individuais (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999). Nós utilizamos este método para avaliar se as chalconas testadas seriam capazes de induzir um dano significativo ao DNA, assim como é relatado para o antitumoral cisplatina (ANTUNES; BIANCHI, 2004). Os resultados demonstram que somente o gupo C4 (figura 9) foi capaz de induzir um dano considerável ao DNA, já os demais compostos se mantiveram nas classes do grupo TAE, classes dois e três (figura 18). É importante notar que este composto também causou uma redução significativa no peso dos animais tratados e manteve elevados os níveis de TBARS. Segundo Higuchi (2003) e Jagetia e Baliga (2003), a lipoperoxidação causa a perda da integridade da membrana celular e pode tornar o ambiente favorável ao ataque ao DNA.

Com relação a proteína carbonilada (figura 19) o composto C1, dentre os testados, foi capaz de elevar o dano oxidativo nas proteínas, através da sua carbonilação. O composto C4 foi capaz de proteger o dano oxidativo aos hepatócitos. Sugere-se que este composto tenha um potencial pró-oxidante, conforme dados

apresentados nas análises anteriores, mas seu efeito oxidativo não é através da carbonilação de proteínas.

Situação semelhante descrita anteriormente no ensaio do FOX, ocorreu para os grupos CPN, C6 e C13 inviabilizando a determinação da proteína carbonilada.

Em adição a avaliação de danos causados aos lipídios, DNA e proteínas, a enzima AST é comumente usada como indicador de integridade hepática. Elevações de transaminases no soro ocorrem após uma injúria ao tecido hepático devido a toxicidade. Nenhuma das chalconas avaliadas causaram elevação significativa na atividade desta enzima, sugerindo que estes compostos não são hepatotóxicos nas concentrações testadas.

A glutathione é um potente inibidor de processos neoplásicos, tendo um papel importante no sistema antioxidante endógeno, estando fortemente depletada quando da instalação do tumor. Este tiol encontra-se particularmente aumentado no fígado e tem um papel chave nos processos hepatoprotetores (GUPTA et al., 2004).

Confirmando dados já existentes na literatura (GUPTA et al., 2004), foi observado que nos grupos inoculados com tumor ascítico houve uma depleção bem significativa de GSH em relação ao controle negativo e que nenhum tratamento foi capaz de restabelecer a condição normal, inclusive os animais tratados com cisplatina. Porém o composto C12 apresentou uma elevação significativa ($p < 0,01$) na concentração deste tiol em relação ao TAE (figura 20).

Jagetia e Baliga (2003) relatam que a depleção de GSH, na célula tumoral, leva a perda do grupamento sulfidril alterando a homeostasia do cálcio e conseqüentemente a perda da viabilidade celular.

Estudos realizados por Sabzevari e colaboradores (2004), com chalconas que apresentam um grupamento hidroxila na posição *orto*, demonstraram que podem ser potencialmente metabolizadas a quinonas, espécie intermediária reativa, a qual reage com células nucleofílicas e depleta GSH. Os autores também sugerem que grupos hidroxilas no anel A ou B tem um papel crucial na determinação do mecanismo de citotoxicidade de chalconas em hepatócitos de ratos e constataram que uma hidroxila no anel A é mais citotóxica do que uma hidroxila no anel B e que o mecanismo de citotoxicidade das chalconas está diretamente associado à oxidação de GSH com conseqüente formação de radical fenoxil. É importante notar que a maioria das chalconas avaliadas no presente estudo não possuem substituições nestas posições o que poderia eventualmente justificar a ausência de atividade antitumoral nos compostos testados.

Os resultados obtidos com acetofenonas e relatos existentes na literatura nos encorajaram a testar a atividade antifúngica desses compostos, os quais poderiam levar a ter alguma aplicação biológica sem causar um dano oxidativo.

Os dermatófitos são um grupo de fungos que caracteristicamente infectam as áreas queratinizadas do corpo e causam as dermatomicoses as quais são freqüentemente muito difíceis de serem erradicadas (ZACCHINO et al., 1999). Derivados da acetofenona, bases bis Mannich (figura 6), mostraram atividade antifúngica contra dermatófitos (GUL; OJANEN; HANNINEN, 2002).

Em nosso estudo foi empregado o ensaio de microdiluição em caldo nutritivo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos acetofenonas frente a um painel de fungos patogênicos humanos, dermatófitos, bem como a levedura

C. albicans. Foram usadas diferentes concentrações de compostos para avaliar a atividade fúngica até um limite de 2000 µg/mL. Compostos que não possuíam nenhuma atividade nessas concentrações foram considerados inativos.

Das acetofenonas testadas contra os dermatófitos e a *C. albicans*, algumas apresentaram resultados interessantes, algumas vezes com forte atividade antifúngica (tabela 9). Dos dois compostos testados contra o *T. rubrum*, somente THA não demonstrou atividade contra o dermatófito, entretanto, o composto 2,3,4-trihidroxiacetofenona (Gala) foi o que inibiu todos os fungos e apresentou um melhor score de atividade variando de 31,2 µg/mL a 250 µg/mL, além disso, a gala demonstrou forte atividade antifúngica contra o *M. canis* quando comparado ao fármaco padrão, fluconazol, agente antifúngico sintético e de primeira escolha na maioria dos tipos de meningite fúngica e também muito utilizado como fungicida em tecido vaginal, saliva, pele e unhas (RANG; DALE; RITTER, 1999).

Como pode ser observado nos resultados obtidos, o composto Gala (tabela 9) obteve o melhor desempenho. A introdução de grupos doadores de elétrons (OH) aparentemente provocou um aumento da bioatividade, sendo esta intensidade dependente da posição do substituinte -OH, assim como dos grupamentos nitro e amino, além de que, com o grupamento ceto parecem favorecer a atividade antifúngica.

A maioria dos trabalhos de pesquisa da atividade antifúngica existentes na literatura utilizam métodos celulares sem alvo específico. Eles são úteis para detectar compostos que inibem o crescimento fúngico, mas não dão informações sobre seu modo de ação (ZACCHINO, 1999). Este é o caso do método utilizado no presente trabalho, sem alvo específico, portanto não podemos inferir sobre o mecanismo de ação

das acetofenonas na atividade antifúngica, mas este poderia estar envolvido na inibição da via de síntese do ergosterol, uma vez que existem relatos na literatura que a acetofenona THA tem atividade hipocolesterolêmica associada a síntese deste esterol (OLIVEIRA, 2001; PIYACHATURAWAT et al., 2002).

As chalconas que foram testadas no presente trabalho e que apresentaram um potencial pró-oxidante *in vitro* (tabelas 5 e 7), algumas também foram testadas *in vivo*, com o objetivo de associar a sua atividade pró-oxidante com a atividade antitumoral. Foi observado através dos parâmetros de lipoperoxidação tecidual (TBARS), com exceção de C6, e defesa antioxidante (GSH), que estas chalconas não apresentam um perfil antioxidante, porém não houve associação da atividade pró-oxidante com antitumoral, pois os compostos testados não apresentaram atividade antitumoral.

Com relação as acetofenonas, constatou-se que os compostos que apresentaram atividade antioxidante importante, compostos trihidroxilados, também exibiram atividade antifúngica, com exceção do THA, para o dermatófito *T. rubrum*.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos com o presente trabalho nos permite concluir que:

- Das acetofenonas testadas, as di e trihidroxiladas apresentaram atividade antioxidante *in vitro* caracterizada pela captação do radical livre DPPH. A 2,4,6 trihidroxiacetofenona (THA) apresentou importante atividade antioxidante através da medida da proteção à lipoperoxidação em homogenato de fígado de rato (TBARS).
- A 2,3,4 trihidroxiacetofenona (Gala) foi o composto com melhor inibição dos fungos filamentosos, sendo mais ativa que o fluconazol para o *M. canis*. A THA foi o composto que apresentou melhor atividade contra a levedura *C. albicans*.
- As chalconas testadas apresentaram uma atividade pró-oxidante *in vitro* quando avaliados pelo método de captação do radical livre DPPH.
- Das chalconas, somente C14 e C25, com um grupamento hidroxila, nos anéis B e A, respectivamente, composto C15, com grupamento nitro, composto C18, com grupamento amina, e compostos bromados B2 e B3, com substituintes metila e nitro, respectivamente, apresentaram atividade antioxidante em relação a medida da proteção da peroxidação lipídica (TBARS) *in vitro*.
- Finalizando, as chalconas avaliadas apresentaram atividade pró-oxidante no modelo *in vivo* e não apresentaram atividade antitumoral no modelo *in vivo* de tumor ascítico de Erhlich.

7 PERSPECTIVAS

Após a realização deste trabalho, ficaram algumas propostas a serem desenvolvidas posteriormente:

- Testar os análogos sintéticos da acetofenona contra os fungos *T. rubrum* e *E. floccosum*.
 - Detectar o mecanismo de ação da atividade antifúngica dos análogos sintéticos da acetofenona, através de ensaios enzimáticos.
 - Estudar o composto galacetofenona, (2,3,4-trihidroxiacetofenona), para indicação como uma molécula protótipo para o tratamento de dermatomicoses.
 - Avaliar a atividade antifúngica de chalconas sintéticas.
 - Avaliar as enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GSSG) para caracterizar melhor o potencial pró-oxidante das chalconas.
 - Utilizar o modelo de tumor sólido de Ehrlich para avaliar novos agentes antitumorais.
 - Utilizar modelo *in vitro* (cultura de células), para testar novos compostos como agentes antitumorais.
-

REFERÊNCIAS

AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *hellinusrimosus* (Berk) Pilat. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 84, p. 157-162, 2003.

ALCARÁZ, L. E. et al. Antibacterial activity of flavonoids against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theor. Biol.*, v. 205, n. 2, p. 231-240, 2000.

ALVAREZ, M. et al. Bacteriostatic action of synthetic polyhydroxylated chalcones against *Escherichia coli*. *Biocell*. v. 28, p.31-34, 2004.

ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17, n.1, p. 89-96, 2004.

AUDIC, Y.; HARTLEY, R. S. Post-transcriptional regulation in cancer – Review. *Biology of the Cell*, v. 96, p. 479–498, 2004.

BECKER, L. B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*, v. 61, p. 461-470, 2004.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 61, p. 882-890, 1963.

BIEBER, L. M. Química orgânica experimental: integração da teoria, experimento e análise. *Quim. Nova*, v. 22, n. 4, p. 605-610, 1999.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods in Enzymology*, v. 90, p. 105-110, 1984.
BONASSA E. M. A Enfermagem em Quimioterapia. São Paulo: Atheneu, 1996. 279 p.

BOIS, F. et al. Halogenated chalcones with high-affinity binding to P-glycoprotein: potential modulators of multidrug resistance. *J. Med. Chem.*, v. 41, n. 21, p. 4161-4164, 1998.

BOYLES, R. J. et al. Enhanced anti-cancer activities of some derivatives of titanocene dichloride. *J. Inorg. Biochem*, v. 84, p. 159-162, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. *Ações de Enfermagem para o Controle do Câncer*. Uma proposta para integração ensino-serviço. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2002. 340p.

BREINBAUER, R. et al. Natural product guided compound library development. *Current Medicinal Chemistry*, v. 9, p. 2129-2145, 2002.

BURDEN, D. A.; OSHEROFF, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, p. 139-154, 1998.

CALLISTE, C. A. et al. Chalcones: structural requirements for antioxidant, estrogenic and antiproliferative activities. *Anticancer Res.*, v. 21, n. 6, p. 3949-3956, 2001.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med*, v. 22, p. 749-760, 1997.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2003. 1102. p. 519-536.

CECHINEL Filho, V.; MIGUEL, O. G.; CALIXTO, J. B. Antispasmodic activity of Xanthoxyline derivatives structure activity relationships. *J. Pharm. Sci.*, v. 84, p. 473-475, 1995.

_____. et al. Fungicide and fungistatic effects of xanthoxyline. *J. Ethnopharmacology*, v. 53, p. 171-173, 1996.

CECHINEL Filho, V. *Quim. Nova*, v. 23, p. 680, 2000.

_____. et al. Aspectos Químicos e Potencial Terapêutico de Imidas Cíclicas: Uma Revisão da Literatura *Quim. Nova*, v. 26, p. 230-241, 2003.

CESARIN, D. S.; FERREIRA, J. N.; BRAZ, R. F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. *Quim. Nova*, v. 24, n. 5, p. 604-611, 2001.

CHEN, H.; TAPPEL, A. L. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidations induced by CBrCl₃ in liver, lung, heart, and spleen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 854-858, 1996.

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, n. 7, p. 2023-2029, 2001.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, v. 163, p. 1161-1168. 2002.

CLARKSON, B. D. BURCHENAL, J. H. Preliminary screening of antineoplastic drugs. *Prog. Clin. Cancer*, v. 1, p. 625-629, 1965.

COHN, M. R.; ROTH, S. K. *Biochemistry and disease: bridging basic science and clinical practice*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996, 587p.

COS, P. et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xantine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 71-76, 1998.

COTELLE, N. et al. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free radical biology & medicine*, v. 20. p. 35-43, 1996.

COZZI, P. The discovery of a new potential anticancer drug: a case history. *IL Fármaco*: Elsevier, p. 2-8, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest.*, v. 17, p. 153-163, 1999.

DAVIES, K. J. A. Oxidative stress: The paradox of aerobic life. In: *Biochem Soc Sympo*, v. 61. p. 1-31, 1994.

DE LAS HERAS, B. et al. Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potencial in inflammation. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 3, n. 2, p. 171-185, 2003.

De VITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5. ed. Philadelphia, 1998.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews*, New York, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

DI GIULIO, R. T. et al. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. RAND, G. M. (ed.) 2. ed. Taylor & Francis. 1995. p. 523-560.

DIAS, R. L. A.; CORRÊA, A. G. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. *Quim. Nova*, v. 24, n. 2, p. 236-242, 2001.

DIMMOCK, J. R. et al. Bioactivities of chalcones. *Curr. Med. Chem.*, v. 6, p. 1125-1149, 1999.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. In: *Physiological Reviews*, v. 82, p. 47-95, 2002.

EDENHARDER, R.; RAUSCHER, R.; PLATT, K. L. The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study. *Mutat. Res.*, v. 379, n. 1, p. 21-32, 1997.

ELLIS, S. et al. Growth and morphogenesis of epithelial cell organoids from peripheral and medial mammary parenchyma of prepubertal heifers. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.952-961, 2000.

ELLIS S.; CAPUCO, A. Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. *Tissue Cell*, v. 34, p.155, 2002.

ELSEENDOORN, T. J. et al. Chemotherapy-induced chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients supplemented with antioxidants or placebo. *Mutation Research*, v. 498, p. 145–158, 2001.

ERNSTER, L.; HOCHSTEIN, P. Membrane lipid peroxidation: cellular mechanisms and toxicological implications. In: C. A. Tyson e J. M. Frazier. *Methods in Toxicology*. Academic Press, 1994. p. 33-45.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Comparative and collaborative evaluation of standartization of antifungal susceptibility for filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 314-319, 1995.

FAUCONNEAU, B. et al. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. *Life Science*, v. 61, n.21, p.2103-2110, 1997.

FAVIER, L. et al. Anti-inflammatory activity of acetophenones from *Ophryosporus axilliflorus*. *Planta Med.* v. 64, p. 657-659, 1998.

FRESHNEY, R. I. *Freshney's Culture of animal cell – a multimedia guide*. New York, 1999. CD-ROM.

FUJITA, T. et al. The effects of xanthoangelol E on arachidonic acid metabolism in the gastric antral mucosa and platelet of the rabbit. *Res. Commun Chem. Pathol. Pharmacol.*, v. 77, n. 2, p. 227-240, 1992.

GEORGOPAPADAKOU N. H.; WALSH T. J. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science*, v. 264, p. 371-373, 1994.

_____. Antifungal Agents: Chemotherapeutic Targets and Immunologic Strategies *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, p. 279-291, 1996.

GORCZYCA, W.; GONG, J.; ARDELT, B. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.*, v. 73, p. 3186-3192, 1999.

GROLL, A. H.; WALSH, T. F. Antifungal Chemotherapy: advances and perspectives. *Swiss Med Wkly*, v. 132, p. 303-311, 2002.

GUL, H. I.; OJANEN, T.; HÄNNINEN O. Antifungal evaluation of bis mannich bases derived from acetophenones and their corresponding piperidinols and stability studies. *Biol. Pharm. Bull.*, v.25, p. 1307-1310, 2002.

GUPTA, M. et al. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. *J. Pharmacological Sciences*, v. 94, p. 177-184, 2004.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. In: *Cellular Signalling*, v. 14, p. 879-897, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3a ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, 2001. p. 1-7.

HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development, *European Journal of Cancer*, v. 40, p. 858-880, 2004.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. *Mutat Res*, v. 275, p. 257-266, 1992.

HATANO, T. et al. Anti-human immunodeficiency virus phenolics from licorice. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 36, n. 6, p. 2286-2288, 1988.

HENDERSON, I. C. Cancer de mama. In: MURPHY, G. P.; LAWRENCE, W. Jr.; LENHARD, R. E. Jr. *Oncologia Clínica - Manual de la American Cancer Society*. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1996, p. 224-248.

HERENCIA, F. et al. Nitric Oxide-scavenging properties of some chalcones derivatives. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, v. 6, n. 2, p. 242-246, 2002.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G. and STOREY K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts. Based on FE(III)Xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*, v. 66, p. 1527-1535, 2003.

HOUGHTON, P. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. *Phytotherapy Research*, v. 14, p. 419-423, 2000.

HSIEH, H. K. et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 52, n. 2, p. 163-171, 2000.

INAMORI, Y. et al. Antibacterial activity of two chalcones, xantroangelol and 4 - hidroxydericin, isolated from the root of *Angelica keiskei* KOIDZUMI. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 39, n. 6, p. 1604-1605, 1991.

INCA – Ministério da Saúde. *Câncer*. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf> 2005>. Acesso em: 09 Janeiro 2005.

ISHITSUKA, H. et al. Antipicornavirus flavone Ro 09-0179. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 22, n. 4, p. 611-616, 1982a.

_____. et al. Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 22, n. 4, p. 617-621, 1982b.

IWATA, S. et al. Antitumorigenic activities of chalcones. I. Inhibitory effects of chalcone derivatives on ³²Pi-incorporation into phospholipids of HeL a cells promoted by 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate (TPA). *Biol Pharm Bull.*, v. 18, n. 12, p. 1710-1713, 1995.

JAGETIA, G. C.; BALIGA. M. S. Modulation of antineoplastic activity of cyclophosphamide by *Alstonia scholaris* in the Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, v. 3, p. 272-282, 2003.

JENDIROBA, D. B. et al. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapy-resistant leukemia cell lines by N-N-dimethylsphingosine. *Leukemia Res.*, v. 26, p. 301-310, 2002.

JURCSAK, N. W.; ZAMINI, H. Employing NMR Spectroscopy to evaluate transmission of electronic effects in 4-substituted chalcones. *J. Chem. Ed.*, v. 76, n. 5, p. 653-654, 1999.

JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokine profile in tumour-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, v. 25, p. 305-319, 2003.

KANENO, R. et al. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. *Food and Chemical Toxicology*, article in press, 2004.

KO, F. N. et al. Scavenger and antioxidant properties of prenylflavones isolated from *Artocarpus heterophyllus*. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 25, p. 160-168, 1998.

KO, H. H. et al. Structure-activity relationship studies on chalcones derivatives, the potent inhibition of chemical mediators release. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 11, n. 1, p. 105-111, 2003.

_____. et al. Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives: potent inhibition of platelet aggregation. *Pharm Pharmacol*, v. 56, p. 1333-1337, 2004.

KOBAYASHI, G. S. Micologia In: MURRAY, P. R.; DREW, L. W., KOBAYASHI, G. S. THOMPSON Jr, HI, J. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 1992, p. 513.

LAWRENCE, N. J. et al. The interaction of chalcones with tubulin. *Anticancer Drug Des.*, v. 15, n. 2, p. 135-141, 2000.

LAWRENCE, N. J. et al. Linked parallel synthesis and MTT bioassay screening of substituted chalcones. *J. Comb. Chem.*, v. 3, n. 5, p. 421-426, 2001.

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids – a review. *Biomed Pharmacother*, v. 56, p. 296-301, 2002.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 464-478, 1990.

LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 32, n. 9, p. 790-796, 2002.

LIU, F.; OOI, V. E. C.; CHANG, S. T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life sciences*, v. 60, p.763 -771, 1997.

LOBO, C. et al. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochem Journal*, v. 348, p. 257-261, 2000.

LOPÉZ, S. N. et al. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 9, n. 8, p. 1999-2013, 2001.

LUNARDI, F.; GUZELA, M. *Efeito antiparasitário de chalconas substituídas*, 1998. Monografia de conclusão de curso. (Curso de Farmácia) - Centro de Educação Superior de Ciências de Saúde, Universidade do Vale de Itajaí, 1998.

_____. et al. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 47, n. 4, p. 1449-1451, 2003.

MACIAS, F. A. et al. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. *Biol. Sci. Space*, v. 17, n. 1, p. 18-23, 2003.

MATHIESEN, L.; MALTERUD, K. E and SUND, R. B. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of c-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 22, p. 307-311, 1997.

MAXWELL, S. R. J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, v. 49, p. 345-361, 1995.

MC CORMICK C.; DUNCAN G.; TUFARO F. New perspectives on the molecular basis of hereditary bone tumours. *Mol. Med. Today*, v. 5, p.481-486, 1999.

MAZUMDER, U. K. et al., Síntesis, anticancer and antibacterial activity of some novel mononuclear Ru(II) Complexes. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 52, p. 178-185, 2004.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 202-226, 2000.

MELO, P. S. et al. Natural Killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. *European Journal of Pharmacology*, v. 487, p. 47-54, 2004.

MENSOR L. L. et al. Screenig of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phitotherapy Research*, v. 15, 127-130, 2001.

MIDDLETON, E. J. et al. Tumor promoter-induced basophil histamine release: effect of selected flavonoids. *Biochem. Pharmacol.*, v. 15, n. 36, p. 2048-2052, 1987.

MIDDLETON, E. J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v.52, p.673-751, 2000.

MONSERRAT, J. M. et al. Determination of Lipid Preoxides in Invertebrates Tisúes Using the Fe(III) Xylenol Orange Complex Formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v. 45, p. 177-183, 2003.

MORISSEAU, C. et al. Mechanism of mammalian soluble epoxide hydrolase inhibition by chalcone oxide derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 356, n. 2, p. 214-228, 1998.

NAKAGAWA, W.T.; LOPES, A. Conceitos Básicos em Oncologia In: AYOUB, A.; FRIAS, M.; BARROS, M.; KOBAYASHI, R. *Bases da Enfermagem em Quimioterapia*. São Paulo: LEMAR; 2000, p.1-19.

NAKAMURA, Y. et al. Dihydrochalcones: Evaluation as Novel Radical Scavenging Antioxidants *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 3309-3312, 2003.

NISHIKAWA, M. et al. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cell inhibits nephrotoxicity of cisplatin and increases the survival of cancer-bearing mice. *Cancer Letters*, v. 171, p. 133-138, 2001.

NEBERT, D. W. et al. Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and [Ah] Gene Battery in the Oxidative Stress Response, Cell Cycle Control, and Apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, v. 59, p. 65-85, 2000.

NERYA, O. et al. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*, v.65, p.1389–1395, 2004.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, p. 297-305, 2002.

NIERO, R. et al. Isolation of triterpenes and an acetophenone derivative with antispasmodic activity from *Euphorbia milli* Desmoul. Ex Boiss (Euphorbiaceae). *Acta Farmacéutica Boanaerense*, v. 15, p. 239-242. 1996.

NORDBERG, J. e ARNER E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian Thioredoxin system. In: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

OHKAWA, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, L. F. S. *Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico do extrato metanólico de Aleurides moluccana, xantoxilina e seus derivados*. 2001. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLSZEWER, E. *Radicais livres em Medicina* / Efrain Olszewer. 2. ed. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 1995. 204p.

OPLETALOVÁ, V. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential therapeutic agents in bacterial diseases. *Ceska Slov. Farm.*, v. 49, n. 6, p. 276-284, 2000.

OTTO, S. *Enfermagem Prática: Oncologia*. 1. ed. Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso, 2002, p. 526.

PATHAK, S. Organ- and tissue-specific stem cells and carcinogenesis. *Anticancer Res*, v. 22, p. 1353-1356, 2002.

_____. et al. Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells, and cancer. *International Journal Oncology*, v. 20, n. 3, p. 637-641, 2002.

PEÑA S. et al. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 46, p. 51-56, 2000.

PHRUTIVORAPONGKUL, A. et al. Studies on the Chemical Constituents of Stem Bark of *Millettia leucantha*: Isolation of New Chalcones with Cytotoxic, Anti-herpes Simplex Virus and Anti-inflammatory Activities *Chem. Pharm. Bull.*, v. 51, p. 187-190, 2003.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v.63, p. 1035-1042, 2000.

PIYACHATURAWAT, P. et al. Evaluation of the acute and subacute toxicity of a choleric phloracetophenone in experimental animals. *Toxicology letters*, v. 129, p.123 – 132, 2002.

QURESHI, S. O. A. et al. Boric acid enhances *in vivo* Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. *Toxicology*, v. 165, p. 1-11, 2001.

PRESTON, T. J. et al. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 49, p. 45-61, 2001.

RAJESHKUMAR, N. V. et al. Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 17-22, 2002.

RAM, V. J. et al. Oxygenated chalcones and bischalcones as potential antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 10, n. 19, p. 2159-2161, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M. RITTER, J. M. *Farmacologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

RAO, Y. K; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. *Bioorg Med. Chem.*, v. 15, p. 2679-2686, 2004.

REZK, B. M. et al., The antioxidant activity of phloretin: The disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v. 295, p. 9-13, 2002.

RICHARDSON, M. A. et al. Complementary/alternative medicine use in comprehensive cancer center and the implications oncology. *J.Clin. Oncol.*, v. 18, p. 2505-2514, 2000.

ROCHA, B. A.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural product in anticancer therapy. *Pharmacology*, v. 1, p. 364-369, 2001.

RODRIGUES, A. T. *Síntese, caracterização e atividade biológica de chalconas sintéticas*, 1997, 115f. Monografia de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 1997.

ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, v. 722, p. 225-254, 1999.

ROJAS, J. et al. The synthesis and effect of fluorinated chalcone derivatives on nitric oxide production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 12, n. 15, p. 1951-1954, 2002.

RUBIN, E.; FARBER, J.L. Neoplasia In: RUBIN, E.; FARBER, J.L. *Pathology*. 2. ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994.

RUBY, A. J. et al. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. *Cancer Letters*, v. 97, p. 33-37, 1995.

RUSTIGI, A. K.; PODOLSKY, D. K. The molecular basis of colon cancer. *Annual Rev. Med.*, v. 43, p. 61-68, 1996.

SABZEVARI, O. et al. Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. *Chemico-Biological Interactions*, v. 148, p. 57-67, 2004.

SAIRAFIANPOUR, M. et al. Leishmanicidal and antiplasmodial activity of constituents of *Smirnowia iranica*. *J. Nat. Prod.*, v. 65, n. 12, p. 1754-1758, 2002.

SANTOS, L. *Síntese de chalconas de interesse biológico*, 2000, 115p. Monografia de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Vale de Itajaí. Itajaí. 2000.

_____. *Avaliação do potencial hipolipemiante de algumas chalconas sintéticas utilizando diferentes modelos experimentais*, 2003, 156f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.

SAYDAM, G. et al. Cytotoxic and inhibitory effects of 4, 4'-dihydroxy chalcones (RVC-588) on proliferation of human leukemic HL-60 cells. *Leuk. Res.*, v. 27, n. 1, p. 57-64, 2003.

SCHECTER, R. L. et al. Glutathione S-transferase in chemotherapy resistance and in carcinogenesis. *Biochem. Cell. Biol.*, v. 70, n. 5, p. 349-343, 1992.

SEGURA, J. A., et al. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Letters*, v. 414, p. 1-6, 1997.

SEVANIAN A, URSINI F. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radic Biol Med.*, v. 29, p. 306-311, 2000.

SHIBATA, S. Anti-tumorigenic chalcones. *Stem Cells*, v. 12, n. 1, p. 44-52, 1994.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, p. 213-219, 1993.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184-191, 1988.

SMÂNIA, E. F. A. *Estudo Químico e de Atividade Antimicrobiana de Espécies de Ganoderma Karsten* 2003, 193 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Departamento de Química, Universidade Federal De Santa Catarina. Florianopolis, 2003.

STEBENS, W. E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 75, p. 265-276, 2003.

STOLL, R.; RENNER, C.; HANSEN, S. Chalcone derivatives antagonize between the human oncoprotein MDM2 and p53. *Biochem.*, v. 40, n. 2, p. 336-344, 2001.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactives products. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

VALADARES, M. C.; QUEIROZ, M. L. S. The effect of a titanocene Dichloride derivate, Ti IV (C₅H₅)₂, on the haematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 439, p. 35-42, 2002.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 46, n. 4, p. 351-360, 2002.

WEIJL, N.I. et al. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Ann. Oncol*, v. 9, p. 1331-1337, 1998.

WOLF, J.K.; RAMIREZ, P.T. The molecular biology of cervical cancer. *Cancer Invest.*, v, 19, p. 621-629, 2001.

WHO – World Health Organization. *Cancer*. Disponível em:
<<http://www.who.int/cancer/en/>> acesso em: 13 maio 2005.

YAGI, K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids*, v. 45, p. 337-351, 1987.

YOSHIDA, M. et al. Melatonin prevents the increase in hydroxyl radical-spin trap adduct formation caused by the addition of cisplatin in vitro. *Life Sci.* v.72, p. 1773–1780, 2003.

ZACCHINO, S. A. et al. *In Vitro* Evaluation of Antifungal Properties of Phenylpropanoids and Related Compounds Acting Against Dermatophytes. *Journal of Natural Products*, v .62, p. 1353-1357, 1999.

ZACCHINO, S. A. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: Yunes, R. A. (org.); Calixto, J. B. (org.), *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Argos, 2001, 500p.

ZWART, L. L. et al. P. E. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 202-226, 1999.
