



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

ALINE BERNARDES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA  
CHALCONA (*E*)-3-(4-NITROFENIL)-1-FENILPROP-2-EN-1-ONA

Anápolis - GO

2012

ALINE BERNARDES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA  
CHALCONA (*E*)-3-(4-NITROFENIL)-1-FENILPROP-2-EN-1-ONA

Dissertação de mestrado apresentada ao  
corpo docente do Programa de Mestrado  
em Ciências Moleculares como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Moleculares  
(Química Orgânica).  
Orientador (a): Dra. Caridad Noda Pérez

Anápolis – GO  
2012

“Eu estava sentado à mesa a escrever o meu compêndio, mas o trabalho não rendia; os meus pensamentos estavam noutra sítio. Virei à cadeira para a lareira e comecei a dormir.

Outra vez começaram os átomos às cambalhotas em frente dos meus olhos. Desta vez os grupos mais pequenos mantinham-se modestamente à distância.

A minha visão mental, aguçada por repetidas visões desta espécie, podia distinguir agora estruturas maiores com variadas conformações; longas filas, por vezes alinhadas e muito juntas; todas torcendo-se e voltando-se em movimentos serpenteantes.

Mas olha! O que é aquilo?

Uma das serpentes tinha filado a própria cauda e a forma que fazia rodopiava trocistamente diante dos meus olhos. Como se se tivesse produzido um relâmpago, acordei... passei o resto da noite a verificar as consequências da hipótese.

Aprendamos a sonhar, senhores, pois então talvez nos apercebamos da verdade.”

Friedrich August Kekulé von Stradonitz

*Aos meus pais, por tanto amor, mesmo quando não mereci, pelas palavras e olhares de conforto, pela segurança, pelos exemplos de valores e caráter, e por me inspirarem a nunca desistir de seguir um caminho de luz, feliz, por saber que nunca estarei só.*

*A minha irmã, Vanessa, por ser meu equilíbrio, meu exemplo de doçura, serenidade e companheirismo em momentos difíceis.*

*A minha família, pelos cuidados, conselhos e tanto carinho.*

*A todos meus amigos, pois ao lado deles, a gente lembra que no instante em que sorrimos, Deus está conosco, juntinho ao nosso lado. E a gente ri que nem menino arteiro.*

*A Prof<sup>a</sup> Caridad Noda Pérez, por ter me apresentado o instigante universo da pesquisa e por sua orientação, dedicação, paciência, competência e carinho, e ainda com a qual aprendi que no meio da dificuldade pode-se encontrar a oportunidade. Saiba que tem sido uma honra trabalhar com você.*

*A todos os amigos do laboratório de Radiobiologia e Mutagênese que tanto me auxiliaram na realização deste estudo, em especial a Carol, meu eterno agradecimento pela paciência, atenção e companheirismo.*

*Agradeço a Universidade Estadual de Goiás e ao programa de pós-graduação em Ciências Moleculares por terem proporcionado os meios para que eu alcançasse minha almejada titulação acadêmica.*

*Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.*

*E a todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho, muito obrigada!*

## RESUMO

As chalconas correspondem a uma classe de compostos que tem despertado o interesse da comunidade científica devido à miscelânea de atividades biológicas relacionadas a elas. Este trabalho apresenta a avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona *in vivo* pelo teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos. Para a avaliação da atividade mutagênica, os animais foram tratados com três diferentes doses da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (5, 10 e 20 mg/Kg p.c.) e para a avaliação da atividade antimutagênica foram administradas as mesmas doses (5, 10 e 20 mg/Kg p.c.), concomitantemente de uma dose de 4 mg/Kg de mitomicina C. A genotoxicidade foi avaliada pela frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e a citotoxicidade foi analisada pela razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/ENC). Os resultados obtidos na avaliação da mutagenicidade mostraram que todas as doses da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona aumentaram significativamente o número de EPCMN ( $p < 0,05$ ), quando comparados com o grupo controle negativo. Em relação à antimutagenicidade, todas as doses administradas em 24 horas reduziram significativamente a frequência de EPCMN, em relação ao grupo controle positivo ( $p < 0,05$ ). Contudo as doses de 5 e 10 mg/ Kg p.c. ao serem administradas em 48 horas não apresentaram atividade antimutagênica ( $p > 0,05$ ), enquanto a dose de 20 mg/ Kg p.c. co-administrada a MMC potencializou a ação mutagênica.

## ABSTRACT

Chalcones represent a class of compounds that have attracted the interest of the scientific community due to the patchwork of biological activities related to them. This paper presents the evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of a chalcone (E)-3-(4-nitrophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one *in vivo* micronucleus test in the mouse bone marrow. For the evaluation of mutagenic activity, the animals were treated with three different doses of chalcone (E)-3-(4-nitrophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (5, 10 and 20 mg / kg b.w.) and for the evaluation of the antimutagenic activity were administered the same doses (5, 10 and 20 mg / kg b.w.) concomitantly with a dose of 4 mg / kg of mitomycin C. The genotoxicity was evaluated by the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (EPCMN) and cytotoxicity was analyzed by the polychromatic erythrocytes and normochromatic ratio (EPC / ENC). The results of the assessment of the mutagenicity showed that all doses of chalcone (E)-3-(4-nitrophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one, significantly increased the number of EPCMN ( $p < 0.05$ ) compared with the negative controls. Concerning the antimutagenicity capacity/ effect, all doses after 24 hours significantly reduced the frequency of EPCMN, for the positive control group ( $p < 0.05$ ). However doses of 5 and 10 mg / kg b.w. to be administered within 48 hours showed no antimutagenic activity ( $p > 0.05$ ), while the dose of 20 mg / kg b.w. co-administered MMC enhanced the mutagenic action.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Produtos Naturais como Protótipos de Novos Fármacos.....	2
2.2. Compostos polifenólicos.....	2
2.2.1. Flavonóides.....	3
2.2.2. Chalconas.....	4
2.2.2.1. Síntese das chalconas – Reações de Claisen-Schmidt.....	6
2.3. Atividades biológicas das chalconas.....	8
2.3.1. Câncer e a atividade antitumoral das chalconas.....	9
2.3.1.1. Agentes antineoplásicos.....	20
2.3.1.1.1. Agente antineoplásicos alquilantes.....	22
2.3.1.1.2. Mitomicina C – Agente antineoplásico alquilante ciclo-celular não-específico.....	24
2.4. Glutationa.....	28
2.4.1. Adição conjugada da glutaciona a compostos $\alpha,\beta$ -insaturados.....	31
2.5. A quimioterapia e a resistência a múltiplos fármacos.....	34
2.4. Mutação.....	36
2.5. Antimutagenicidade.....	38
2.5.1. Efeito Janus.....	40
2.6. Teste do micronúcleo.....	40
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	45
3.1. Materiais e Métodos.....	45
3.1.1. Síntese, purificação e caracterização físico-química da chalcona CG1.....	45
3.1.1.1. Reagentes e Solventes.....	45
3.1.1.2. Equipamentos.....	45
3.1.1.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	45
3.1.1.2.2. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	45
3.1.1.2.3. Aparelho para medição do ponto de fusão.....	45
3.1.1.2.4. Espectrômetro de Infravermelho.....	46
3.1.1.3. Síntese da chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1).....	46
3.1.2. Teste do Micronúcleo.....	46
3.1.2.1. Camundongos.....	46

3.1.2.2. Reagentes e Soluções .....	47
3.1.2.3. Procedimento de execução .....	48
3.1.2.4. Análise Citogenética.....	48
3.1.2.4. Análise Estatística.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4.1. Síntese da chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1).....	51
4.2. Avaliação da Atividade mutagênica e antimutagênica.....	53
4.2.1. Resultados antecedentes de atividade antitumoral <i>in vitro</i> da chalcona CG1 .....	53
4.2.2. Atividade mutagênica e citotóxica da CG1 pelo teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos <i>in vivo</i> .....	54
4.2.3. Atividade antimutagênica e anticitotóxica da CG1 pelo teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos <i>in vivo</i> .....	60
5. CONCLUSÕES .....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
7. APÊNDICES .....	80
8. ANEXOS.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG1	Chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DL <sub>50</sub>	Dose letal para inativar 50% dos indivíduos de uma população em teste.
IC <sub>50</sub>	Concentração da substância necessária para matar 50% dos indivíduos de uma população em teste.
DMSO	Dimetilsulfóxido
ADN	Ácido desoxirribonucléico
ENC	Eritrócito normocromático
EPC	Eritrócito policromático
EPCMN	Eritrócito policromático micronucleado
HC	Hospital das Clínicas
Hz	Hertz
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IC <sub>50</sub>	Concentração da substância necessária para inibir 50% da resposta desejada
INCA	Instituto Nacional do Câncer
i.p.	Intraperitoneal
<i>J</i>	Constante de acoplamento
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
MHz	Mega Hertz
mM	Mili Mol
MMC	Mitomicina C
MMPs	Matrizes metaloproteinases
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de <i>tetrazolium</i>
nm	Nanômetros

<b>μL</b>	Micro litro
<b>μM</b>	Micro molar
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>p.c.</b>	Peso corpóreo
<b>QR</b>	Quinona Redutase
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>ARN</b>	Ácido ribonucléico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>UFG</b>	Universidade Federal de Goiás
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>CCNS</b>	Ciclo celular não-específico
<b>CCS</b>	Ciclo celular específico
<b>ROS</b>	Espécies de oxigênio reativas
<b>GSSG</b>	Glutationa dissulfeto
<b>GPx</b>	Glutationa peroxidase
<b>GO</b>	Glutationa oxidase
<b>GR</b>	Glutationa redutase
<b>MDR</b>	Multiple Drug Resistance
<b>IV</b>	Infravermelho

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Algumas diferenças entre tumores malignos e benignos.....	11
<b>Quadro 2.</b> Principais genes envolvidos no processo de carcinogênese.....	12
<b>Quadro 3.</b> Relação de classe de agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo- celular inespecíficos.....	22
<b>Quadro 4.</b> Agentes alquilantes úteis em doenças neoplásicas.....	24
<b>Quadro 5.</b> Classificação de antimutágenos por mecanismo de ação.....	39
<b>Quadro 6.</b> Estatística descritiva dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	84
<b>Quadro 7.</b> Teste de Normalidade dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	85
<b>Quadro 8.</b> Teste ANOVA dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	85
<b>Quadro 9.</b> Teste de Tukey HSD dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	86
<b>Quadro 10.</b> Estatística descritiva dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	87
<b>Quadro 11.</b> Teste de Normalidade dos dados obtidos na avaliação de	89

mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	
<b>Quadro 12.</b> Teste ANOVA dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	89
<b>Quadro 13.</b> Teste de Tukey HSD dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	90
<b>Quadro 14.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	90
<b>Quadro 15.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 10 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	91
<b>Quadro 16.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	91
<b>Quadro 17.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	91
<b>Quadro 18.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	92
<b>Quadro 19.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	93
<b>Quadro 20.</b> Estatística descritiva dos dados obtidos na avaliação de	93

antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	
<b>Quadro 21.</b> Teste de Normalidade dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	95
<b>Quadro 22.</b> Teste ANOVA dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	95
<b>Quadro 23.</b> Teste de Tukey HSD dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	96
<b>Quadro 24.</b> Estatística descritiva dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	96
<b>Quadro 25.</b> Teste de Normalidade dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	98
<b>Quadro 26.</b> Teste ANOVA dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	98
<b>Quadro 27.</b> Teste de Tukey HSD dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	99

<b>Quadro 28.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	99
<b>Quadro 29.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 10 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	100
<b>Quadro 30.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	100
<b>Quadro 31.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	101
<b>Quadro 32.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	101
<b>Quadro 33.</b> Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	102

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Porcentagem de inibição da chalcona CG1 através do ensaio do MTT.....	53
<b>Tabela 2.</b> Valores de IC <sub>50</sub> e intervalo de confiança de 95% em µg/mL da CG1.....	54
<b>Tabela 3.</b> Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) em medula óssea de camundongos após a administração de diferentes doses da chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1).....	82
<b>Tabela 4.</b> Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) em medula óssea de camundongos após a administração de diferentes doses da chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) co-tratadas com Mitomicina C.....	83

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura geral de um flavonóide.....	3
<b>Figura 2.</b> Estrutura da maioria dos subgrupos que compõem os flavonóides.....	4
<b>Figura 3.</b> Estrutura geral da chalcona.....	6
<b>Figura 4.</b> Estrutura da Licochalcona A.....	9
<b>Figura 5.</b> Chalconas hidroxiladas com elevadas atividades citotóxicas e anti-inflamatórias.....	9
<b>Figura 6.</b> Esquema de eventos envolvidos em carcinogênese química.....	12
<b>Figura 7.</b> Estruturas dos compostos 3'-metil-3-hidroxichalcona e 4'-metil-3-hidroxichalcona que apresentaram alta citotoxicidade contra células HeLa.....	14
<b>Figura 8.</b> Derivados de flavonóides submetidos avaliação citotóxica em estudo conduzido por Cabrera <i>et al.</i> (2007).....	15
<b>Figura 9.</b> 2'-Hidroxichalconas substituídas por grupo metoxi.....	16
<b>Figura 10.</b> Chalcona com alta atividade citotóxica contra células leucêmicas.....	16
<b>Figura 11.</b> Chalconas submetidas a avaliação antiproliferativa <i>in vitro</i> contra três linhagens de células cancerígenas.....	18
<b>Figura 12.</b> Chalcona com elevada atividade anti-invasiva contra células de carcinoma invasivo mamário.....	19
<b>Figura 13.</b> Estruturas das chalconas inibidoras das atividades das GSTs e QRs.....	20
<b>Figura 14.</b> Atividades dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular.....	21
<b>Figura 15.</b> Representação de uma monoalquilação e ligação cruzada interfitas e intrafitas entre um agente alquilante e o ADN.....	23
<b>Figura 16.</b> Ligação cruzada interhélices entre um agente alquilante bifuncional e o ADN.....	23

<b>Figura 17.</b> Estrutura da mitomicina C.....	25
<b>Figura 18.</b> Intermediário reativo da MMC formado a partir de hidrólise por catálise ácida (R-H).....	27
<b>Figura 19.</b> Estruturas das bases púricas susceptíveis a alquilação pela MMC.....	28
<b>Figura 20.</b> Glutationa: ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinilglicina).....	29
<b>Figura 21.</b> Esquema apresentando a formação do aduto A a partir da ligação covalente do grupo tiol da glutaciona (GSH) e uma chalcona.....	34
<b>Figura 22.</b> Resumo do processo de maturação das células da linhagem eritrocitária.....	42
<b>Figura 23.</b> Formação de micronúcleos em eritrócitos de medula óssea.....	44
<b>Figura 24.</b> Eritrócitos normocromáticos (ENC) e eritrócitos policromáticos (EPC) em uma lâmina do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos da CG1 visualizada em microscópio óptico de luz (aumento de 1000x).....	49
<b>Figura 25.</b> Eritrócito policromático micronucleado (EPCMN) de uma lâmina do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos da CG1 visualizada em microscópio óptico de luz (aumento de 1000x).....	50
<b>Figura 26.</b> Cristais obtidos a partir da recristalização da chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.....	51
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) da CG1.....	52
<b>Figura 28.</b> Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 24 horas de tratamento com a chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) e controles.....	55
<b>Figura 29.</b> Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 48 horas de tratamento com a chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) e controles.....	55
<b>Figura 30.</b> Redução de compostos com grupo nitro por enzimas.....	57
<b>Figura 31.</b> Razão EPC/ENC após 24 horas de tratamento com a chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-	58

nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) e controles.....	
<b>Figura 32.</b> Razão EPC/ENC após 48 horas de tratamento com a chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) e controles.....	58
<b>Figura 33.</b> Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 24 horas de tratamento com a chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) concomitantemente com MMC e controles.....	60
<b>Figura 34.</b> Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 48 horas de tratamento com a chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) concomitantemente com MMC e controles.....	61
<b>Figura 35.</b> Estrutura da plicatina B.....	62
<b>Figura 36.</b> Razão EPC/ENC após 24 horas de tratamento com a chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) comcomitantemente com MMC e controles.....	63
<b>Figura 37.</b> Razão EPC/ENC após 24 horas de tratamento com a chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) comcomitantemente com MMC e controles.....	64
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) da chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.....	80
<b>Figura 39.</b> Espectro no IV (KBr) chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.....	81
<b>Figura 40.</b> Aprovação do projeto protocolado sob o n°: 230/10 pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás.....	103

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Biossíntese dos flavonóides. (10) fenilalanina; (11) cinamoil-CoA; (12) malonil-CoA; (13) chalcona hidroxilada; (14) flavona.....	5
<b>Esquema 2.</b> Mecanismo da reação de condensação de Claisen-Schmidt.....	7
<b>Esquema 3.</b> Bioativação redutiva da mitomicina C e alquilação do ADN.....	26
<b>Esquema 4.</b> Ciclo catalítico da glutatona.....	30
<b>Esquema 5.</b> Estabilização por ressonância de cetonas $\alpha,\beta$ -insaturadas (enonas).....	32
<b>Esquema 6.</b> Mecanismo de adição conjugada do benzenotiol a enonas em solventes não polares.....	32
<b>Esquema 7.</b> Mecanismo geral da reação de Michael.....	33
<b>Esquema 8.</b> Síntese da chalcona ( <i>E</i> )-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.....	46
<b>Esquema 9.</b> Epoxidação de chalcona ao óxido.....	57

## 1. INTRODUÇÃO

Os flavonóides, aos quais se é relacionado um perfil terapêutico, se encontram divididos em subclasses baseadas nas diferenças estruturais em seu núcleo fundamental, e compondo uma dessas subclasses estão compostos extensivamente estudados e frequentemente submetidos a alterações estruturais em busca de moléculas mais ativas frente à miscelânea de atividades biológicas relatadas, as chalconas ou 1,3-diaril-2-propen-1-onas, quimicamente conhecidas como cetonas aromáticas  $\alpha,\beta$ -insaturadas (TOMÁS-BARBERÁN & CLIFFORD, 2000). Muitas atividades biológicas interessantes destes compostos têm sido relatadas, dentre as quais estão às atividades: anticarcinogênica (LAWRENCE *et al.*, 2006; MODZELEWSKA *et al.*, 2006), antiparasitária (NARENDER *et al.*, 2005; LAHTCHEV *et al.*, 2008), anti-inflamatória (WON *et al.*, 2005), antiviral (MALLIKARJUN, 2005), antibacteriana (TSUKIYAMA *et al.*, 2002), antidepressiva (OZDEMIR *et al.*, 2006), antioxidante (VOGEL *et al.*, 2008; NOWAKOWSKA, 2007) , analgésica e até herbicida (BITENCOURT *et al.*, 2007).

A preocupação com o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos é evidente, principalmente, devido à ação mutagênica se manifestar somente após muitos anos, no aumento da incidência de cânceres ou malformações congênitas. Assim, se faz necessária, a aplicação de testes rápidos e confiáveis que permitam detectar os danos provocados por este tipo de exposição, como o teste do micronúcleo ou mesmo a necessidade de avaliar possíveis agentes que possam atuar como preventivos ou remediadores desses agentes mutágenos. Os micronúcleos atuam como marcadores biológicos de danos genéticos e podem ser utilizados como indicadores de mutagenicidade.

O objetivo do presente trabalho foi a avaliação da mutagenicidade e/ ou antimutagenicidade e da citotoxicidade e/ou anticitotoxicidade da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona pelo teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos *in vivo*.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Produtos Naturais como Protótipos de Novos Fármacos**

As plantas tem um papel de destaque no desenvolvimento de novos fármacos são amplamente utilizadas clinicamente, ou orientam a síntese de protótipos de novos compostos terapêuticos (CALIXTO, 2003).

Partindo-se da premissa de que os produtos naturais são sintetizados por organismos vivos, conclui-se que tais compostos têm grandes chances de possuírem atividades biológicas. As diversas atividades biológicas sobre algum metabolismo de organismo vivo podem caracterizar atividades farmacológicas e contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos (SANDES & BLASI, 2000).

Pesquisas fundamentadas na química de produtos naturais e no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna têm como um de seus principais focos o estudo de metabólitos secundários de plantas (BARREIRO & BOLZANI, 2009) por serem encontrados em toda espécie vegetal e, frequentemente, terem atividades biológicas tornando-as matérias-primas valiosíssimas para a produção de fármacos (SANDES & BLASI, 2000).

Partindo da análise dos processos biossintéticos dos produtos naturais, são feitos planejamentos de sínteses químicas para formação de compostos inéditos, moléculas complexas de interesse farmacológico (CALIXTO, 2003; MONTANARI & BOLZANI, 2001).

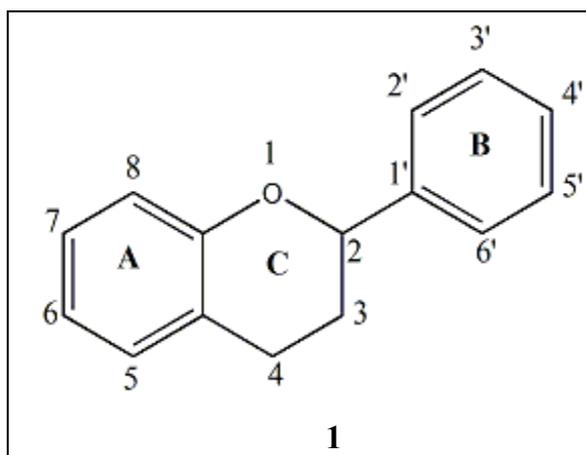
### **2.2. Compostos polifenólicos**

Os compostos fenólicos sintetizados nos vegetais, por via metabólica secundária, se caracterizam por possuir como estrutura fundamental um anel aromático ligado a no mínimo um grupo hidroxila (FERREIRA, 2005). Estes compostos sintetizados podem ser geralmente classificados em cinco grupos distintos: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas e taninos (MARTINEZ-FLORÉZ *et al.*, 2002; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004, CARDOSO *et al.*, 2009).

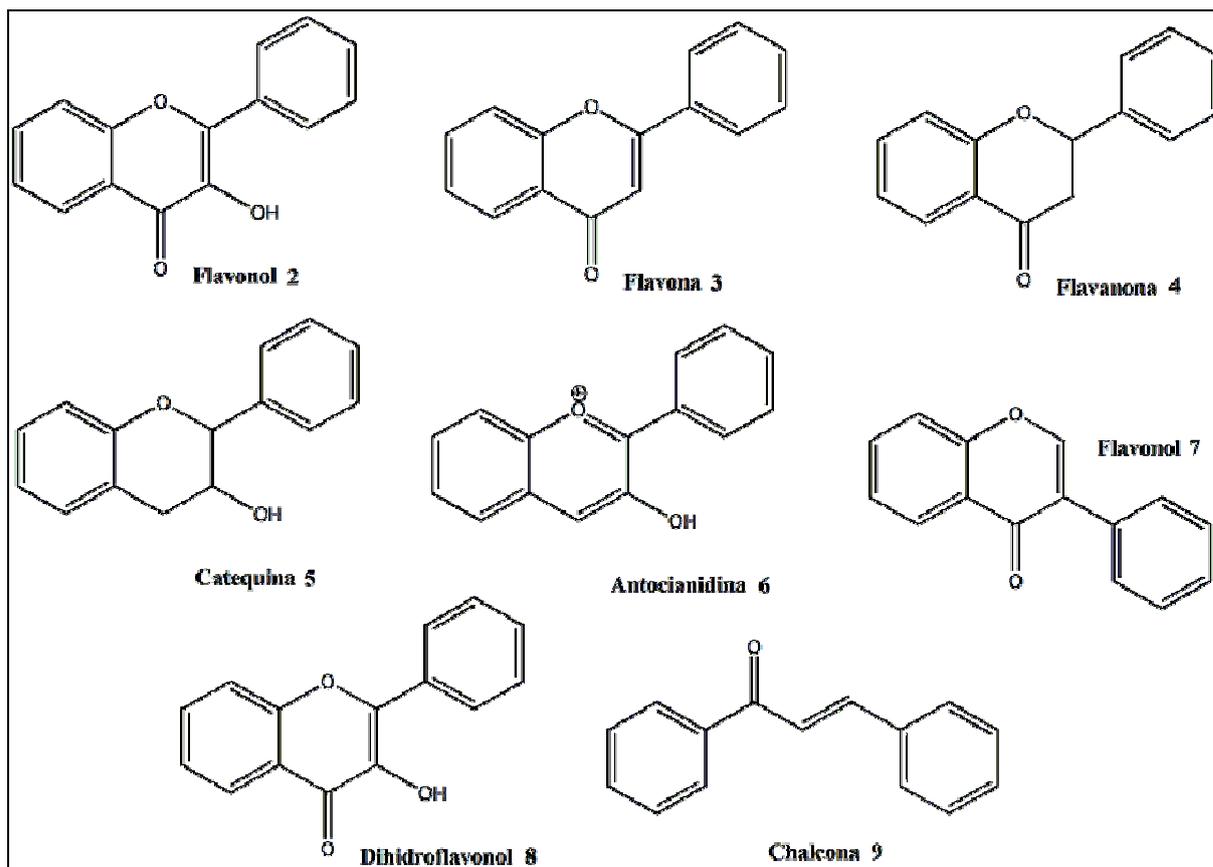
### 2.2.1. Flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo de compostos polifenólicos de origem vegetal com diversas estruturas químicas e características, sendo obtidos a partir da via dos fenilpropanóides. Encontram-se como pigmentos naturais em briófitas, pteridófitas e em grande variabilidade estrutural nas angiospermas, possuindo a função de protegê-las contra ação de oxidantes, raios UV, poluição ambiental, proteção contra micro-organismos patogênicos e substâncias tóxicas produzidas por alimentos e inibição enzimática (COOK & SAMMAN, 1996; MACHADO *et al.*, 2009; MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

Os flavonóides tem sua estrutura química geral definida por MACHADO *et al.* (2009) como “*substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromona, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte.*” O primeiro anel geralmente está ligado ao grupo fenila por um terceiro anel denominado pirano heterocíclico, o qual permite inúmeras variações e substituições originando a formação de compostos diferenciados como as flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalcona, auronas e antocianidinas. A estrutura geral de um flavonóide (**1**) é apresentada na Figura 1 e seus derivados na Figura 2 (MARTÍNEZ-FLORÉZ *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Estrutura geral de um flavonóide.

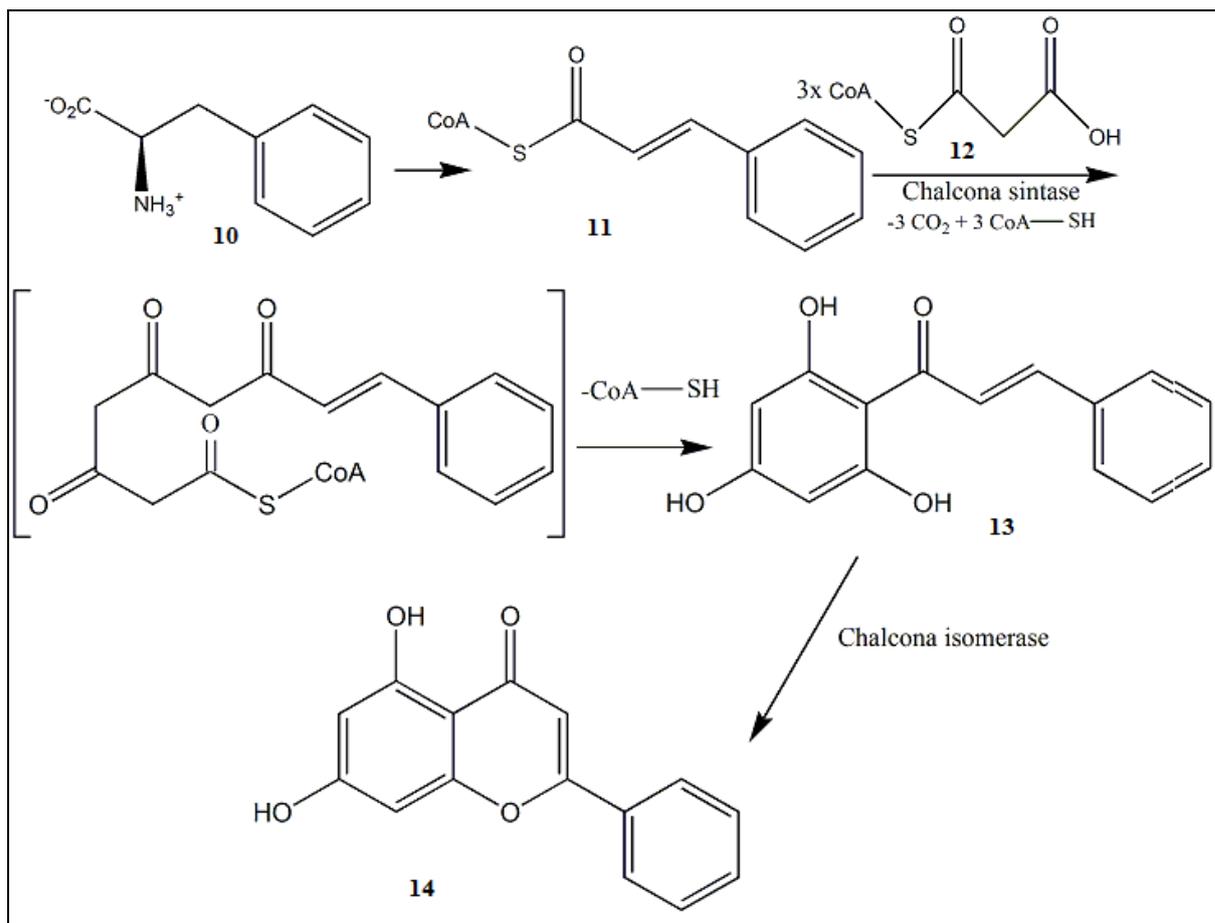


**Figura 2.** Estrutura da maioria dos subgrupos que compõem os flavonóides.

Durante o metabolismo, as substituições nas estruturas químicas dos flavonóides e metabólitos podem variar, determinando assim suas atividades bioquímicas.

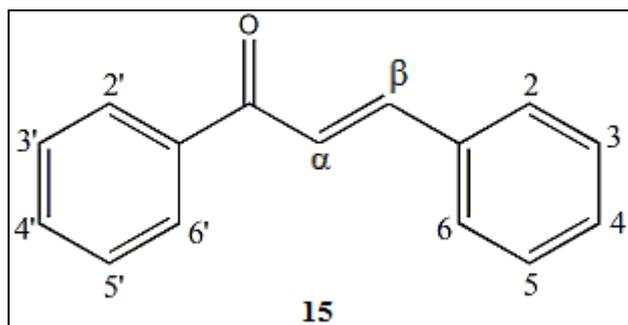
### 2.2.2. Chalconas

Chalconas são um grupo de compostos polifenólicos intermediários na biossíntese de flavonóides e isoflavonóides, como pode ser observado no Esquema 1, e constituem uma das maiores classes de compostos naturais abundantes em frutas, vegetais, chás, especiarias que tem despertado grande interesse em pesquisas químicas e farmacológicas por apresentarem inúmeras atividades biológicas (REDDY *et al.*, 2008; NOWAKOWSKA, 2007).



**Esquema 1.** Biossíntese dos flavonóides. **(10)** fenilalanina; **(11)** cinamoil-CoA; **(12)** malonil-CoA; **(13)** chalcona hidroxilada; **(14)** flavona.

Quimicamente, a chalcona tem sua estrutura fundamental descrita como uma cetona aromática  $\alpha,\beta$ -insaturada (1,3-difenil-2-propen-1-ona) **(15)** formada por dois anéis aromáticos A (advém da cetona) e B (advém do aldeído) conectados por uma cadeia aberta de três átomos de carbono, ficando conjugados uma porção olefinica e um grupamento carbonílico, como é apresentado na Figura 3 (NOWAKOWSKA, 2007). A conjugação entre o anel B e o sistema carbonílico insaturado confere a chalcona sua coloração característica amarelada (SANTOS, 2008).



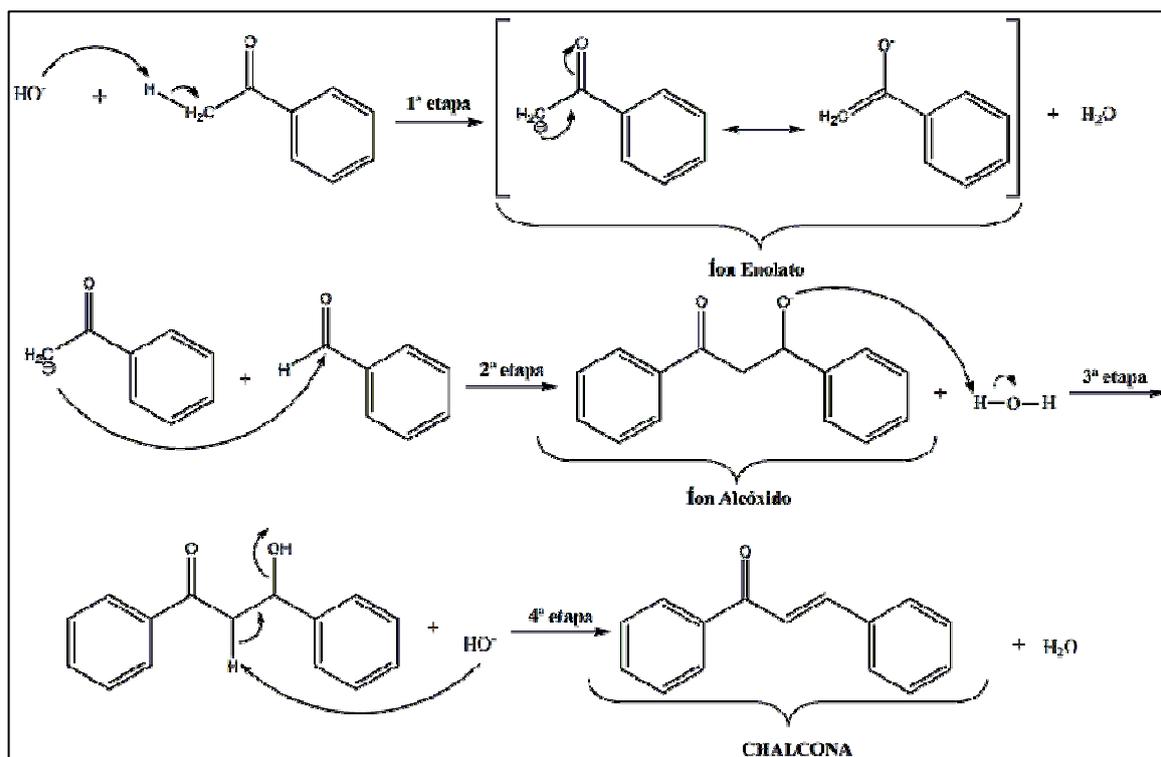
**Figura 3.** Estrutura geral da chalcona.

As chalconas são passíveis de diversas modificações desde substituintes de diversas naturezas em diferentes posições nos anéis A e B, adições halogênicas na porção olefinica até processos de isomerização *cis-trans*. Dentre todas as modificações citadas, os substituintes permitem uma abundância de classificação das chalconas devido a interações provocadas por 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-SOBRINHO & NETTO-FERREIRA, 2001; REBELLO, 2005).

#### 2.2.2.1. Síntese das chalconas – Reações de Claisen-Schmidt

A reação de condensação de Claisen-Schmidt é uma condensação aldólica cruzada que faz uso de cetonas como reagentes para condensar com aldeídos aromáticos (benzaldeído e derivados). Historicamente, o nome Claisen Schmidt advém de uma homenagem aos químicos alemães J.G. Schmidt, (descobriu a reação no ano de 1880) e Ludwig Claisen, quem desenvolveu a reação entre 1881 e 1889. Essas reações são viáveis na prática, em presença de bases, pois sob tais condições as cetonas não se autocondensam consideravelmente (CAMPOS, 1979; SOLOMONS & FRYHLE, 2001).

As chalconas são encontradas em produtos naturais e podem ser isoladas através de técnicas de extração, contudo, estas são geralmente obtidas a partir de sínteses orgânicas via reação de condensação de Claisen-Schmidt (GASULL *et al.*, 2000). O mecanismo da reação acontece como mostrado no Esquema 2 a seguir em quatro etapas:



**Esquema 2.** Mecanismo da reação de condensação de Claisen-Schmidt.

1ª etapa: A base ao se dissociar, promove o ataque nucleófilo ao  $H\alpha$  do composto carbonílico, no caso, a acetofenona, formando o íon enolato, o qual se torna estável devido à ressonância e uma molécula de água.

2ª etapa: O íon enolato age como nucleófilo e ataca o carbono do benzaldéido (ausente de  $H\alpha$ ) formando o íon alcóxido.

3ª etapa: O íon alcóxido também age como nucleófilo e ataca o H da molécula de água formando novamente o íon hidróxido.

4ª etapa: A desidratação do produto formado na etapa anterior induz a formação de uma dupla ligação, produzindo um produto final com duplas conjugadas, a cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (1,3-difenil-2-propen-1-ona).

Tradicionalmente, a síntese de chalconas ocorre via reação de condensação de Claisen-Schmidt de aril metil cetonas com aldeídos aromáticos sendo realizadas utilizando-se catalisadores em meio básico (NaOH, KOH, Ba(OH)<sub>2</sub>, hidrotalcitas, LiHMDS, NaNO<sub>3</sub> calcinado/fosfato natural) ou ácido (AlCl<sub>3</sub>, BF<sub>3</sub>, HCl seco, Zn(bpy)(OAc)<sub>2</sub>, TiCl<sub>4</sub>, Cp<sub>2</sub>ZrH<sub>2</sub>/NiCl<sub>2</sub>, zeólitas, RuCl) em fase homogênea ou heterogênea, incluindo também ácidos

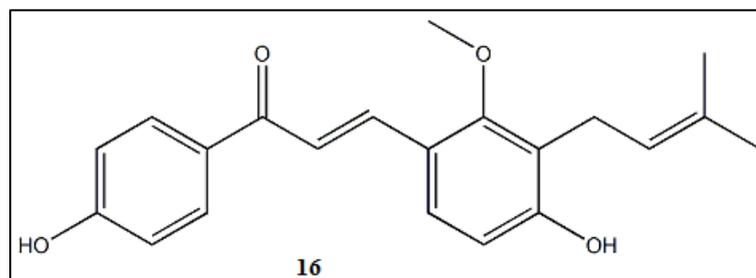
de Lewis e Brønsted, ácidos sólidos, bases sólidas e outros (BHAGAT *et al.*, 2006; DONG *et al.*, 2008).

O procedimento reacional de síntese via reação de condensação de Claisen-Schmidt também apresenta alguns pontos pouco interessantes como tempo reacional longo, usualmente é exigido um pré-preparo do catalisador, elevadas temperaturas e reagentes de alto custo, além do que, frequentemente, devido às elevadas temperaturas e longos tempos de reação os produtos são formados juntamente com impurezas necessitando de metodologias de purificação (BHAGAT *et al.*, 2006). Cuidados adicionais são fundamentais quando a reação é catalisada em meio básico, visto que o longo tempo de reação necessário para a síntese pode resultar na degradação do produto ou na formação de subprodutos via reações de adição de Michael (adições conjugadas de ânions enolato ao carbono  $\beta$  de compostos  $\alpha,\beta$ -insaturados), ocasionando a formação de impurezas indesejáveis (BHAGAT *et al.*, 2006; MATTOS & MARZORATI, 1999; SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

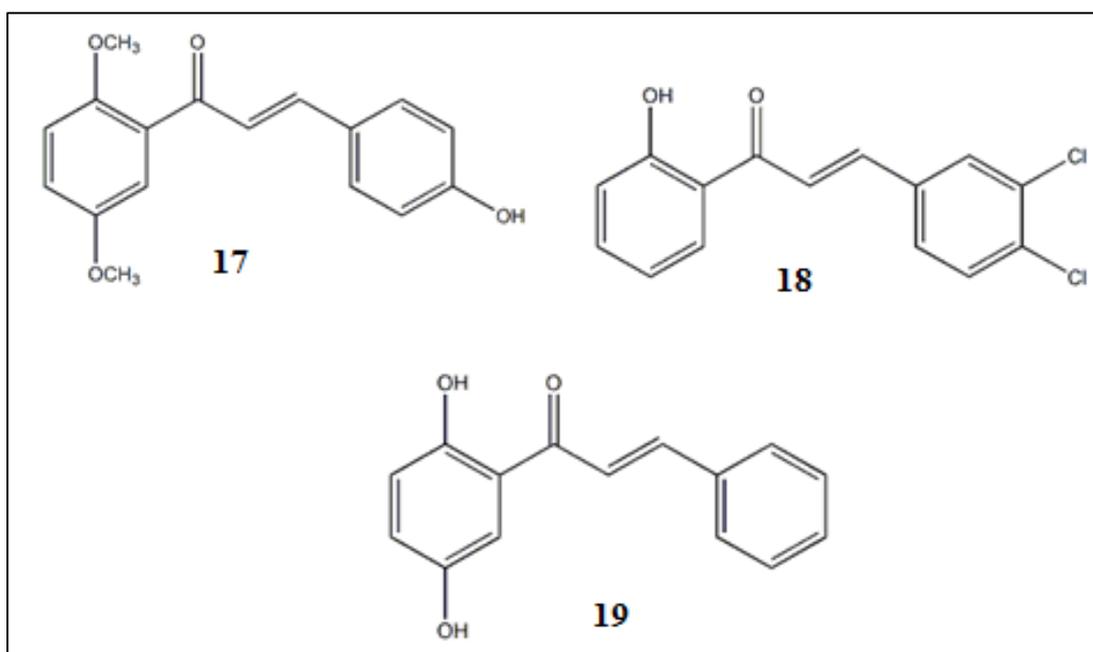
### 2.3. Atividades biológicas das chalconas

Quanto aos efeitos farmacológicos, as chalconas mostram-se promissoras por exibirem diversas atividades relatadas na literatura. A atividade antiparasitária é relatada por algumas chalconas, em especial a Licochalcona A (**16**), Figura 4, devido a sua alta atividade leishmanicida e antimalárica (NIELSEN *et al.*, 1998; NOWAKOWSKA, 2007). As Acil Hidrazidas também são relatadas como eficazes por serem mais estáveis e ativas que o protótipo antimalárico considerado atualmente (MOTTA, 2004). Em relação à atividade anti-inflamatória, Won *et al.* (2005) testou doze chalconas, dentre as quais, três chalconas hidroxiladas (2',5'-dimetoxi-4-hidroxichalcona (**17**), 2'-hidroxi-3,4-diclorochalcona (**18**), 2',5'-dihidroxichalcona) (**19**), Figura 5, apresentaram atividades citotóxicas elevadas, inibindo a produção de óxido nítrico em células como os macrófagos, revelando, assim, potencial tanto para tratamento anti-inflamatório como na prevenção do câncer. Efeitos bactericidas das chalconas foram relacionados por Nowakowska (2007) devido à capacidade de se conjugarem com grupos nucleofílicos como o grupo tiol, importante constituinte das proteínas que compõem a parede celular bacteriana; e quanto à atividade fungicida, as chalconas apresentam uma relação estrutura-atividade influenciada pelos substituintes do anel B, de modo que grupos que retiram elétrons da posição para, enfraquecem eletricamente o carbono  $\beta$  tornando-o um centro eletrofílico atraente ao ataque do grupo tiol, refletindo no

aumento da atividade antifúngica, enquanto que grupos que doam elétrons enfraquecem o potencial da chalcona (LAHTCHEV *et al.*, 2008; NOWAKOVSKA, 2007).



**Figura 4.** Estrutura da Licochalcona A.



**Figura 5.** Chalconas hidroxiladas com elevadas atividades citotóxicas e anti-inflamatórias.

### 2.3.1. Câncer e a atividade antitumoral das chalconas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda. O câncer pode se tornar um grande obstáculo para o desenvolvimento socioeconômico de países emergentes como o Brasil, já que as estimativas para o ano de 2012

apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2011).

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações que variam quanto idade de início, taxa de crescimento, estado de diferenciação celular, detecção de diagnóstico, potencial invasivo, potencial metastático, resposta ao tratamento e prognóstico (INCA, 2007).

A integridade de um determinado tecido, assim como sua função, é conferida por um equilíbrio estabelecido entre a proliferação e morte celular, mantido por um complexo de sinalização intra e extracelular. Perdendo esse equilíbrio, há proliferação de uma massa de células desordenadas que constituem o tumor primário. Na progressão tumoral, algumas células do tumor primário perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos (FERREIRA & ROCHA, 2004).

O câncer pode ser considerado uma doença genética que resulta de alterações simultâneas em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. As alterações genéticas envolvem a amplificação e ativação de proto-oncogenes quanto mutações que levam à perda e/ou ativação dos alelos de genes supressores de tumor (FERREIRA & ROCHA, 2004). Desde substituição de base em um gene a alterações em larga escala do genoma, as mutações progressivamente tornam a célula neoplásica independente de fatores reguladores do crescimento celular normal (DYKE *et al.*, 2008).

A divisão celular passa por ciclos de eventos programados que regulam a progressão entre as fases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M. Essa sequência acontece pela transmissão de sinais realizada por proteínas e um distúrbio em qualquer dessas proteínas envolvidas no ciclo celular pode levar a um desenvolvimento aberrante e/ou propagação de células aberrantes e uma promoção da tumorigênese. Cada etapa do ciclo celular é monitorada, passando por “checkpoints” os quais param a progressão do ciclo celular temporariamente ou permanentemente (DEVITA *et al.*, 2008).

O termo tumor significa crescimento canceroso e é usado de forma intercambiável com o termo neoplasia. Existem dois tipos básicos de neoplasias chamadas de benignas e malignas. Câncer é o termo comum aplicado para todas as neoplasias malignas. No Quadro 1 são expostas características que permitem a diferenciação entres os dois tipos de neoplasias.

**Quadro 1.** Algumas diferenças entre tumores malignos e benignos (Fonte: KANDEPU, 1999).

<b>Características</b>	<b>Tumor maligno</b>	<b>Tumor benigno</b>
Encapsulado	Raramente	Frequentemente
Diferenciado	Pouco	Parcialmente
Metástase	Presente	Ausente
Modo de Crescimento	Infiltrante e invasivo	Expansivo
Velocidade de Crescimento	Rápido	Lento
<b>Características celulares</b>		
Cromossomo	Anormal	Normal
Núcleo	Múltiplo	Único
Aderência	Ausente	Presente
Forma e tamanho	Irregular, pleomórfico	Regular, consistente

Carcinogênese é o processo de conversão de uma célula normal em uma célula maligna, sendo que os agentes indutores desse processo são denominados carcinógenos; e este processo está sequenciado, geralmente, na forma dos eventos apresentados na Figura 6. Frequentemente, é necessária a exposição repetida aos carcinógenos para que haja o desenvolvimento de tumores malignos. A maioria dos carcinógenos químicos necessita de ativação enzimática para reagir com grupos nucleofílicos e alterar, assim por modificação covalente, o ADN. Logo, os mecanismos de proteção celular (detoxificação de carcinógenos, reparo do ADN e eliminação das células que tenham ADN modificado) se mostram fundamentais para a proteção contra a iniciação do câncer. Para que a iniciação ocorra, é necessária a replicação e proliferação de células com ADN alterado, de forma a levar a mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor e iniciar o processo de carcinogênese. Posteriormente a iniciação, a promoção constitui a etapa em que há seleção e expansão das células iniciadas, podendo ocasionar também no desenvolvimento de um tumor benigno. Durante a promoção do tumor, o dano genético da célula iniciada altera a expressão dos genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular. Muitos carcinógenos são tanto iniciadores como promotores ao serem utilizados em altas doses (LOUREIRO *et al.*, 2002). No Quadro 2 salientam-se os principais genes envolvidos no processo de carcinogênese.



**Figura 6.** Esquema de eventos envolvidos em carcinogênese química (Adaptado de GUENGUERICH, 1992).

**Quadro 2.** Principais genes envolvidos no processo de carcinogênese (Adaptado de REGATEIRO *et al.*, 2002).

<b>Genes</b>	<b>Função dos genes</b>
Protooncogenes	Codificam proteínas constituintes de uma rede implicada na recepção e transdução de sinais e na regulação de expressão gênica. Participam na regulação da proliferação celular.
Antioncogenes ou genes de supressão tumoral	Participam na regulação da proliferação e diferenciação celular, contrabalanceando o estímulo proliferativo dos protooncogenes, através de ação inibidora.
Genes de reparação do ADN	Estabilizam o ADN assegurando processos complexos de reparação para evitar a acumulação de lesões no ADN que seriam reproduzidas durante a replicação, originando um clone portador de mutação eventualmente tumorigênica.
Genes de metabolismo de genotóxicos	Genes envolvidos em complexa rede de vias metabólicas de biotransformação de xenobióticos, alguns deles genotóxicos e potenciais carcinógenos.
Genes de apoptose	Genes envolvidos na apoptose, processo pelo qual as células morrem de forma programada, ativada por alterações a nível de estímulos específicos.

Há vários tipos de câncer e estes se diferenciam de acordo com os diversos tipos de células a partir das quais a doença se inicia ex.: sarcomas, linfomas, carcinomas e etc. Quanto às causas da doença, estas podem ser internas ou externas ao organismo, sendo esta última

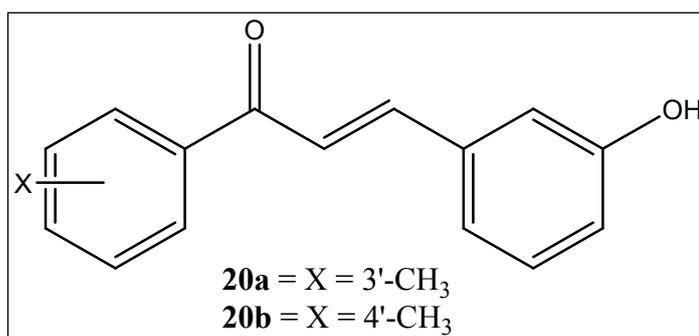
correspondente aos fatores de risco de natureza ambiental dependente da exposição à carcinógenos e substâncias ou agentes que podem danificar o material genético que abrange agentes químicos (ex.: tabaco, cloreto vinílico, benzo(a)pireno) vírus (ex.: papilomavírus humano, Hepadnavírus), radiação ultravioleta e ionizante e substâncias físicas (ex.: amianto). Os fatores internos correspondem à predisposição genética herdada, ou seja, hereditariedade (INCA, 1989).

Existem, atualmente, cinco tratamentos para o câncer definidos a seguir (MICKLOS *et al.*, 2005; COZZI, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005):

- Radioterapia: técnica de emissão de radiações ionizantes (comumente Raios-X, gama e elétrons) como recurso terapêutico, e busca a liberação de uma dose precisamente calculada em um volume tumoral com o mínimo de danos às células sadias vizinhas, resultando na erradicação do tumor. Esta se divide em duas modalidades: a braquiterapia (fontes radioativas em contato com o tumor) e teleterapia (fontes radioativas afastadas do paciente). E ainda, a radioterapia pode ser utilizada em caráter exclusivo, adjuvante, curativo ou paliativo;
- Cirurgia: a técnica que pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase;
- Quimioterapia: tratamento que utiliza medicamentos para destruir células que se dividem de maneira rápida, tanto as cancerosas como as normais. Os pacientes têm diferentes respostas a esses medicamentos, logo são ministrados diferentes tipos a cada vez que o mesmo recebe o tratamento. Todavia, apesar do grande número de agentes quimioterápicos, a necessidade médica ainda não é atendida efetivamente. As razões são: a falta de seletividade das drogas convencionais, levando a toxicidade; a promoção de metástase, implicando no desenvolvimento de tumores iniciais em locais diferentes do sítio primário; a heterogeneidade da doença que compreende mais de 100 tipos de câncer; a resistência intrínseca ou adquirida à quimioterapia desenvolvida após poucos ciclos terapêuticos (resistência a múltiplas drogas);
- A técnica de foto-radiação tem como vantagens a localização e a destruição com maior seletividade neoplasias localizadas em tumores superficiais pelo uso de radiação com fluorescência ( $\lambda$  de 620-640 nm) com o uso de fibras óticas;
- A imunoterapia faz uso do estímulo das próprias defesas do corpo como tratamento usado de forma adjuvante.

Estudos recentes tem mostrado que alguns tipos de chalconas podem inibir a proliferação do câncer, induzindo a apoptose de células cancerígenas, incluindo câncer de mama e ainda podem ser antimitóticas e/ou inibem a produção de algumas enzimas importantes no ciclo metabólico dessas células (CABRERA *et al.*, 2007; BHASKAR *et al.*, 2008).

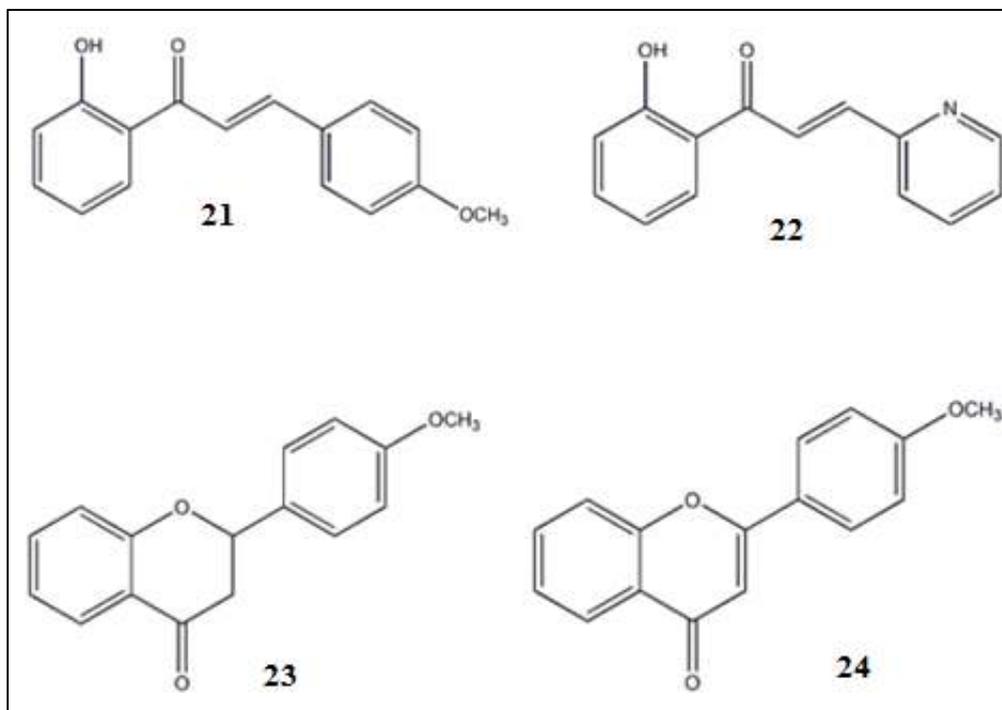
Estudos conduzidos por Shibata (1994) revelaram atividades relevantes quanto aos potenciais antitumorais dos compostos 3'-metil-3-hidroxicalcona (**20a**) e 4'-metil-3-hidroxicalcona (**20b**), Figura 7, os quais apresentaram eficácias de 100% e 97%, respectivamente, contra células HeLa (linhagem celular humana maligna continuamente cultivada e considerada imortal, derivada do carcinoma cervical de Henrietta Lacks) em concentrações de 5  $\mu\text{g/mL}$  (CORDEIRO, 2011).



**Figura 7.** Estruturas dos compostos 3'-metil-3-hidroxicalcona e 4'-metil-3-hidroxicalcona que apresentaram alta citotoxicidade contra células HeLa.

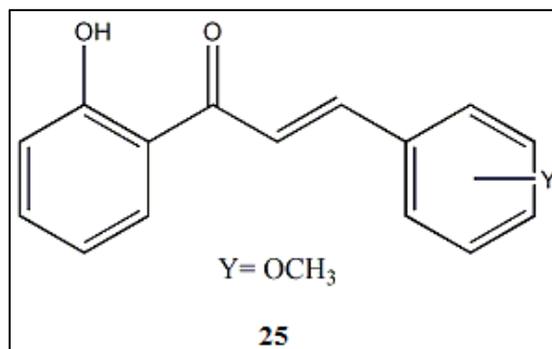
Cabrera *et al.* (2007) relataram a avaliação das atividades citotóxicas de flavanonas, flavonas e chalconas contra células tumorais humanas provenientes de câncer mamário e câncer do colo do útero. Os autores concluíram que as chalconas apresentaram maiores níveis de citotoxicidade do que as outras classes de compostos, com os mesmos substituintes. Comparando-se as atividades antitumorais da chalcona (*E*)-1-(2'-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona (**21**) e da flavona 2-(4-metoxifenil)-2-3-dihidrocromen-4-ona (**23**) (flavanona) e 2-(4-metóxifenil)-4H-cromen-4-ona (**24**), apresentadas na Figura 8, contra o carcinoma renal humano TK-10, o adenocarcinoma mamário humano MCF-7 e o adenocarcinoma de cólon HT-29, a ordem da atividade citotóxica diminui, geralmente na seguinte ordem: chalconas > flavanonas > flavonas. No estudo realizado por estes autores a

hidroxichalcona (*E*)-1-(2'-hidroxifenil)-3-(2-piridinil)-2-propen-1-ona (**22**) apresentou o maior potencial de atividade anticarcinogênica.



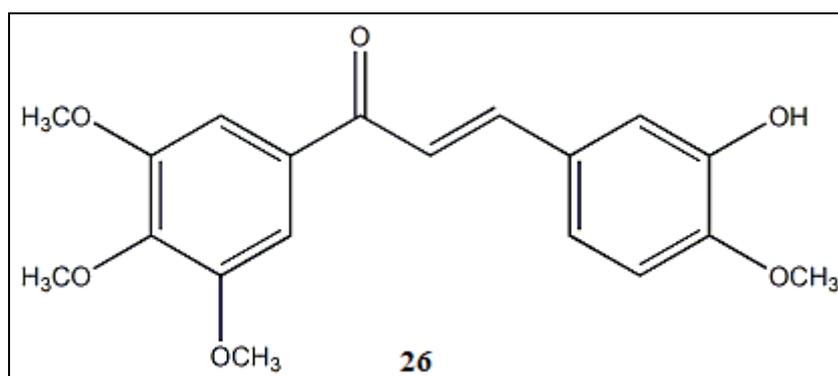
**Figura 8.** Derivados de flavonóides submetidos avaliação citotóxica em estudo conduzido por Cabrera *et al.* (2007).

Contudo, segundo Sabzevari *apud* Echeverria (2009), chalconas com maior número de grupos hidroxilas como substituintes nos anéis A e B são menos efetivas do que com menor número. Além disso, o autor avaliou o potencial antitumoral de 2'-hidroxichalconas (**25**), Figura 9, com grupos metóxi como substituintes em diferentes posições no anel B contra células cancerígenas situadas no fígado. O estudo constatou que a ausência dos grupos metoxi, provoca um aumento da atividade citotóxica contra esse tipo de câncer, reafirmando a importância das hidroxichalconas em estudos de compostos com potencial antitumoral.



**Figura 9.** 2'-Hidroxicalconas substituídas por grupo metoxi.

Em contraposição, de acordo com Lawrence *et al.* (2006), a hidroxicalcona (*E*)-3-(3-hidroxi-4-metóxfenil)-1-(3',4',5'-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona (**26**), Figura 10, apresentou atividade importante e promissora contra células de leucemia crônica, com IC<sub>50</sub> de 0,0043 μM. Este resultado revela possibilidades acerca da atividade dos substituintes metoxi, os quais podem contribuir nas pesquisas de agentes quimioterápicos mais seletivos do que as drogas existentes atualmente e o estudo de novas substâncias com melhores atividades e perfil de segurança pode contribuir para sanar outras dificuldades devido à complexidade da doença como: a propagação metastática, que implica na implantação do tumor em outros órgãos diferentes do seu sítio primário; a heterogeneidade da doença e a resistência intrínseca ou adquirida à quimioterapia desenvolvida após alguns ciclos terapêuticos (COZZI, 2003).



**Figura 10.** Chalcona com alta atividade citotóxica contra células leucêmicas.

Outro fator essencial para o desenvolvimento do câncer é a angiogênese, a qual promove a proliferação e expansão de tumores e ainda a metástase. Em relação a sua vascularização, existem duas fases de crescimento tumoral. Na fase inicial, quando o tumor ainda é avascular (massa tumoral < 0,5 mm), sua nutrição e oxigenação são alcançadas

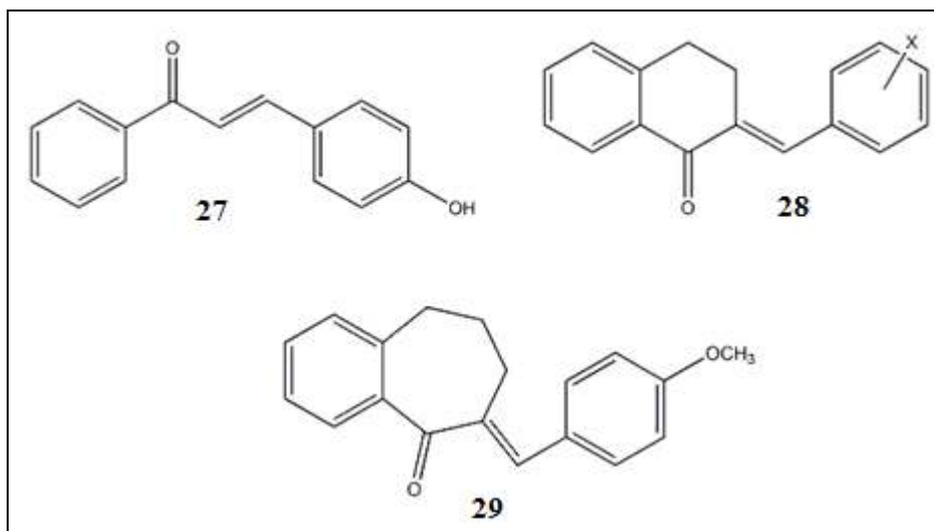
através da difusão a partir de tecidos vizinhos. Contudo quando a massa tumoral ultrapassa o valor de 0,5 mm, a difusão não é suficiente para seu crescimento, logo o tumor permanece em estado latente até que haja a angiogênese, ou seja, o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir da vascularização pré-existente no tecido, para sua sustentação, impedindo sua necrose e degeneração (BAMIAS & DIMOPOULOS, 2003; SILVA *et al.*, 2007)

O processo de angiogênese é complexo e inclui várias etapas de proliferação de células endoteliais, a organização em estruturas tridimensionais, e a interação com outras estruturas, a fim de formar uma nova rede vascular. Os novos vasos sanguíneos intratumorais fornecem uma maneira para as células de um tumor entrar na circulação e promoverem metástases em órgãos distantes do foco inicial (BAMIAS & DIMOPOULOS, 2003; SILVA *et al.*, 2007)

A angiogênese é fundamental nos processos fisiológicos de pessoas saudáveis apenas para o desenvolvimento de órgãos, cicatrização de feridas, proliferação endometrial, e gravidez. Assim, a supressão da angiogênese anormal pode oferecer estratégias terapêuticas no tratamento do câncer, sendo um alvo atrativo com pouca toxicidade esperada. Uma forma de superar o desenvolvimento de resistência à droga com potencial inibidor associado com a progressão do tumor é o tratamento dos mesmos quando eles são pequenos, ao invés de grandes dimensões em volume. Logo a aplicação clínica é mais bem sucedida com a aplicação de inibidores em pacientes com doenças micrometásticas (BAMIAS & DIMOPOULOS, 2003).

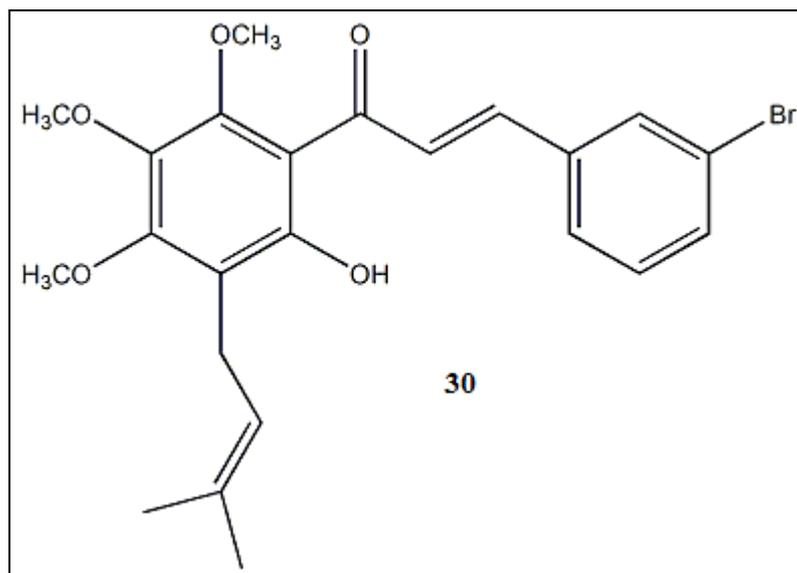
Muitos dos medicamentos antineoplásicos clinicamente bem sucedidos foram obtidos a partir de moléculas que ocorrem naturalmente ou que tenham sido desenvolvidos a partir de seus análogos sintéticos. Pilatova *et al.* (2010) em seu estudo, investigaram as atividades antiproliferativa *in vitro* de chalconas (4-hidroxicalcona (**27**), (*E*)-2-(*X*-benzilideno)-1-tetralonas (**28**) e (*E*)-2-(4'-metoxibenzilideno)-1-benzosuberona) (**29**), Figura 11, contra células Jurkat (leucemia aguda linfoblástica), células HeLa (câncer cervical humano) e células HUVECs (endotélio da veia umbilical humano). Os resultados quanto à citotoxicidade do composto (*E*)-2-(4'-metoxibenzilideno)-1-benzosuberona em relação às células Jurkat ( $IC_{50} = 5 \times 10^{-7}$  mol/L) foi a mais significativa. Em relação às células HeLa, o efeito máximo citotóxico, assim como nas células HUVECs, também foi apresentado por este composto em concentrações de  $c = 10^{-4} - 10^{-6}$  mol/L e  $c = 10^{-4} - 10^{-6}$  mol/L respectivamente. Aliados aos testes de citotoxicidade, uma série de ensaios *in vitro* complementares foram executados e novamente foram comprovados efeitos eficazes do composto (*E*)-2-(4'-metoxibenzilideno)-1-

benzosuberona) (**29**), Figura 11, frente à proliferação e migração de células endoteliais, atividades de receptores (MMPs) e secreção de agentes pró-angiogênicos como proteínas VEGF, em baixas concentrações de  $c = 10^{-7}$  e  $10^{-8}$  mol/L. Essa atividade em baixas concentrações não apresenta toxicidade, e demonstra que essa chalcona afeta várias vias importantes da angiogênese, tornando-a eficiente.



**Figura 11.** Chalconas submetidas a avaliação antiproliferativa *in vitro* contra três linhagens de células cancerígenas.

A invasão de células tumorais, como já reportado, geralmente leva à metástase, constituindo a principal causa de morte dos pacientes. A busca por compostos com propriedades anti-invasoras, tem por objetivo tanto a procura por novas terapias de tratamento do câncer como a análise dos mecanismos invasores dessas células tumorais. Diante deste cenário, Murkherjee *et al.* (2001) investigaram a atividade anti-invasiva da chalcona 1-[2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-4,5,6-trimetoxifenil]-3(3-bromofenil)propen-2-ona (**30**), Figura 12, e acharam uma inibição efetiva de células de carcinoma invasivo mamário em concentrações de apenas  $10 \mu\text{M}$ .

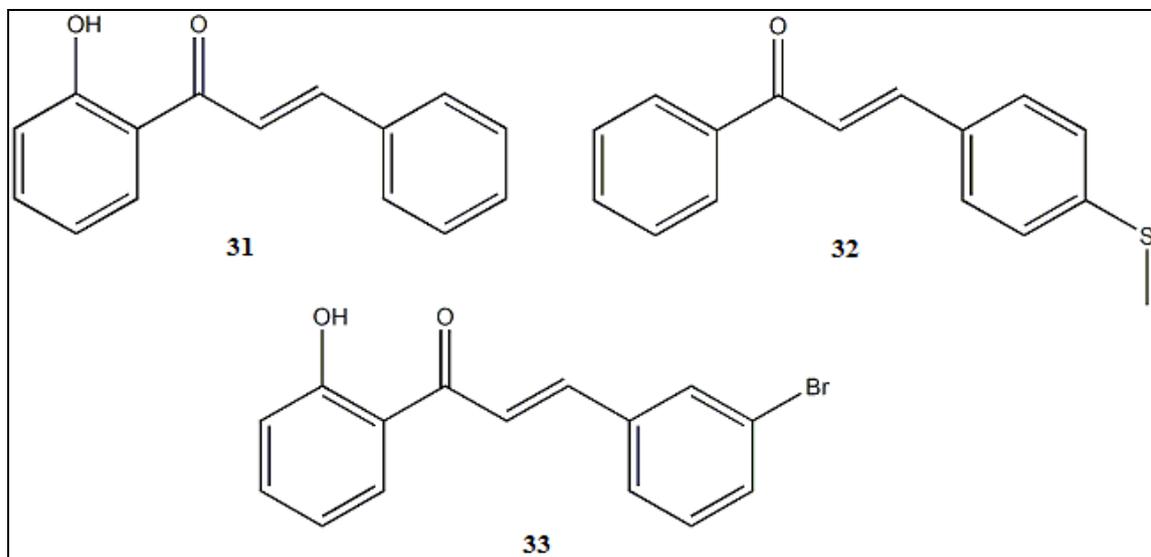


**Figura 12.** Chalcona com elevada atividade anti-invasiva contra células de carcinoma invasivo mamário.

Na ação antiproliferativa de células de câncer de ovário, sabe-se também, que a presença da ligação  $\alpha,\beta$ -insaturada é indispensável para a mutagenicidade, visto que, com a retirada da insaturação, decresce a atividade. A hidroxilação nas posições 2 e 3 do anel aromático aumenta a atividade enquanto a metilação nas posições 4 e 4' causa decréscimo na atividade (DE VICENZO *et al.*, 1995; EDENHARDER *et al.*, 1997).

A modificação do metabolismo de agentes cancerígenos é regulada por três diferentes grupos de enzimas, chamadas de enzimas de fase I, fase II e fase III. A fase I envolve enzimas (ex.: citocromo P450, citocromo b5 e NADPH-citocromo C redutase) que promovem oxidação de xenobióticos, redução e processos de hidrólise. Por outro lado, enzimas da fase II promovem conjugação de xenobióticos com ligantes endógenos, como glutathione e ácido glucurônico, a fim de aumentar a solubilidade e diminuir a toxicidade dos compostos a serem excretados. Na fase III, os metabólitos formados na fase II são transportados para o exterior da célula. Estudos recentes têm mostrado que um aumento na atividade enzimática da fase II e III, como das enzimas quinona redutase (QR) e glutathione S-transferase (GST) induz maior proteção celular contra agentes químicos cancerígenos nos estágios de promoção e iniciação. Como muitos carcinógenos químicos podem se tornar ativos pela interação com enzimas da fase I, agentes monofuncionais que induzem seletivamente o aumento das enzimas da fase II aparecem como candidatos desejáveis como quimiopreventivos. As chalconas 31 e 32 apresentadas na Figura 13 elevaram seletivamente em cerca de 30% a atividade enzimática

das GSTs em fígados de ratos enquanto a chalcona 33 aumentou seletivamente em cerca de 128% a atividade enzimática das QRs (CABRERA *et al.*, 2010).



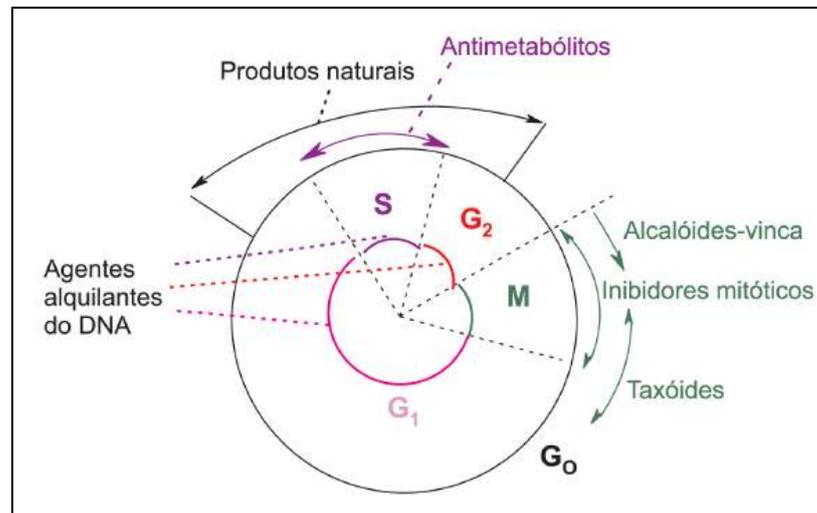
**Figura 13.** Estruturas das chalconas que elevam as atividades das GSTs e QRs.

### 2.3.1.1. Agentes antineoplásicos

Denominam-se agentes quimioterápicos antineoplásicos ou citostáticos, os fármacos usados para o tratamento de neoplasias quando a cirurgia ou radioterapia não é possível ou é ineficaz e como adjuvantes para cirurgia. Eles possuem como finalidade: curar, melhorar a sobrevida e/ou promover efeito paliativo, partindo-se do objetivo primário de destruir células neoplásicas, preservando as normais. Contudo, observa-se que os citotóxicos não são letais às células neoplásicas de modo seletivo. As diferenças existentes entre o crescimento das células malignas e os das células normais e as pequenas diferenças bioquímicas verificadas entre elas provavelmente se combinam para produzir seus efeitos específicos (FONSECA *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Diversos mecanismos estão associados à progressão de uma célula normal a uma célula neoplásica maligna, e a maior parte deles interferem em alguma etapa do ciclo celular. Assim, faz-se necessário a compreensão da metabolização dos fármacos existentes e o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos que atuem nessas etapas celulares por culminarem nas diferenciações que determinam a etiologia do câncer. A maioria das drogas utilizadas na quimioterapia antineoplásica interfere de algum modo nesse mecanismo celular, e a melhor compreensão do ciclo celular normal levou à definição clara dos mecanismos de

ação da maioria das drogas. Logo, na Figura 14, são classificados os agentes antineoplásicos mais comuns de acordo com a fase do ciclo celular, na qual seu principal mecanismo de ação quimioterapêutico se encontra (ALMEIDA *et al.*, 2008, INCA).



**Figura 14.** Atividades dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular (Fonte: ALMEIDA *et al.*, 2005).

Diversos mecanismos reguladores que podem afetar a proliferação celular concentram-se nas fases G<sub>1</sub> e S. Os fatores de crescimento, como os produtos de oncogênese, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação (“feedback”) (ex.: genes supressores tumorais) são inibidores da multiplicação celular. Outro mecanismo regulador é a apoptose (morte celular programada), que provoca a morte da célula em detrimento da possibilidade da célula tornar-se potencialmente maligna. Na fase G<sub>2</sub> há a síntese de componentes para a mitose como a produção do fuso mitótico que é feita na fase M. Após a divisão do material nuclear há a citocinese (que é a separação da célula mãe, formando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares), finalizando o ciclo de replicação celular (retorna à fase G<sub>0</sub>). A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular, passando da fase M para nova fase G<sub>1</sub> (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Bruce *et al.*(1969) e Reis *et al.* (2008) classificaram os quimioterápicos conforme a sua atuação sobre o ciclo celular em :

- Ciclo-celular inespecíficos (CCNS) - Atuantes nas células que estão ou não no ciclo proliferativo, como, por exemplo, a mostarda nitrogenada.

- Ciclo-celular específicos (CCS) - Atuantes somente nas células que se encontram em proliferação, como é o caso da ciclofosfamida. Há ainda uma subclasse denominada como: - ciclo-celular fase-específicos que são atuantes em determinadas fases do ciclo celular, como, por exemplo, o metotrexato (fase S), o etoposídeo (fase G2) e a vincristina (fase M).

No Quadro 3 a seguir são classificados os tipos de agentes antineoplásicos quimioterápicos mais comuns de acordo conforme sua atuação no ciclo celular (Adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2005).

**Quadro 3.** Relação de classes de agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular inespecíficos (Adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2005).

<b>Ciclo-celular específicos (CCS)</b>	<b>Ciclo-celular inespecíficos (CCNS)</b>
Agentes antimetabólitos	Agentes alquilantes
Agentes hormonais	Complexos de Coordenação da Platina
Alcalóides vegetais	Antibióticos naturais
Enzimas	Alcalóides pirrolizidínicos

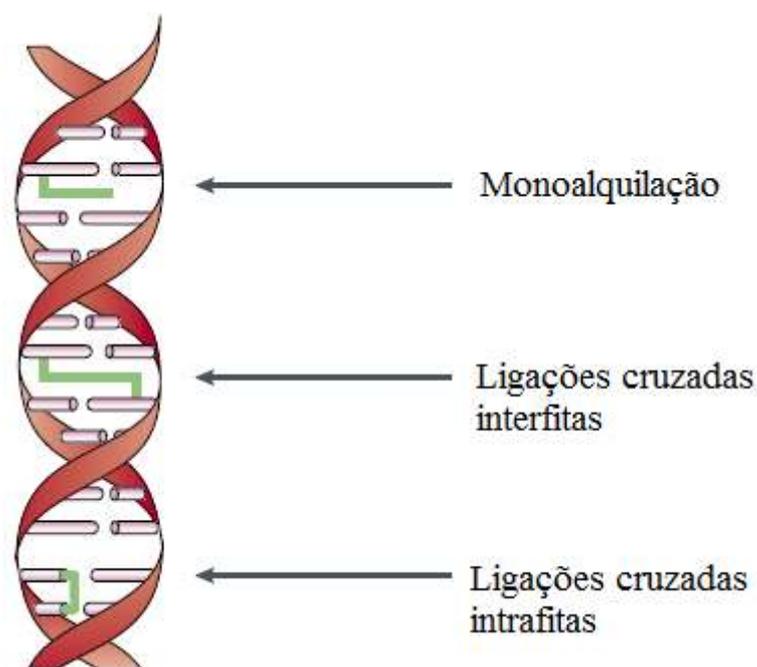
#### **2.3.1.1.1. Agente antineoplásicos alquilantes**

Os agentes alquilantes são os quimioterápicos mais antigos sendo datada sua utilização no tratamento do câncer desde 1940. Esses fármacos fazem uma interação com o ADN inibindo a síntese de novo material genético causando lesão irreparável do mesmo e são considerados antineoplásicos ciclo-celular inespecíficos (CCNS) (ALMEIDA *et al.*, 2005; HURLEY, 2002).

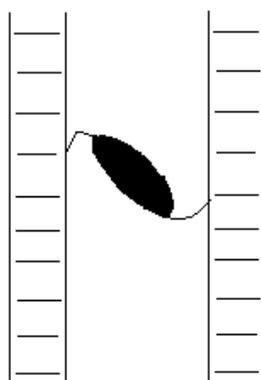
O fator mais importante para a atividade antitumoral e potencialidade para o uso dos agentes alquilantes em diferentes neoplasias, é que estes atuam como eletrófilos sobre macromoléculas nucleofílicas, particularmente o ADN, geralmente, modificando as bases púricas e pirimidínicas (ALMEIDA *et al.*, 2005).

As células são mais susceptíveis a alquilação nas fases G1 e S do ciclo celular, apresentando bloqueio em G2. Os agentes alquilantes possuem a capacidade de se ligar covalentemente ao ADN, preferencialmente ao grupamento amino N7 de guaninas (YANG &

WANG, 1999; LENGLET & CORDONNIER, 2010). Estes compostos podem ser monofuncionais, formando adutos em um único sítio no ADN ou bifuncionais ao formarem ligações cruzadas (“*Crosslink*”) com as fitas ou filamentos do ADN (HURLEY, 2002, MLADENOV *et al.*, 2007, ALMEIDA *et al.*, 2005). Estas ligações podem ser feitas entre bases da mesma fita (pontes intracadeia) ou fitas opostas do ADN (pontes intercadeia) e ainda estas ligações podem ocorrer entre o ADN e proteínas (HELLEDAY *et al.*, 2008). Nas Figuras 15 e 16 são expostos os diferentes tipos de ligações cruzadas e monoalquilação.



**Figura 15.** Representação de uma monoalquilação e ligação cruzada interfitas e intrafitas entre um agente alquilante e o ADN (Adaptado de HURLEY, 2002).



**Figura 16.** Ligação cruzada inter hélices entre um agente alquilante bifuncional e o ADN (Fonte: ALMEIDA *et al.*, 2005).

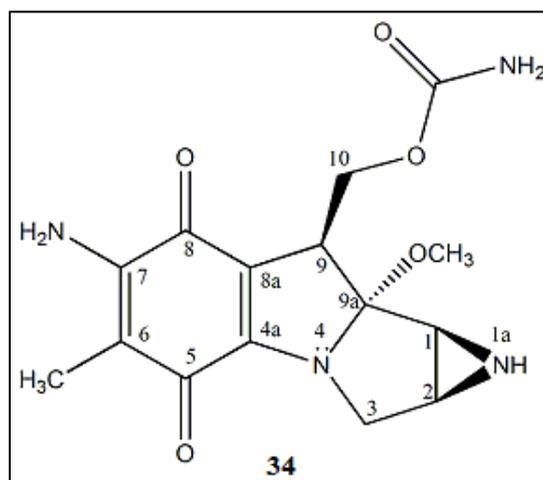
Todas estas ligações cruzadas e a monoalquilação produzem lesões no ADN, sendo as provocadas pelas ligações cruzadas interfilamentares as mais citotóxicas. A alquilação de um único filamento de ADN pode até ser reparada facilmente, mas as ligações cruzadas interfilamentares, como as produzidas por agentes alquilantes bifuncionais, exigem mecanismos mais complexos de reparação, pois bloqueiam a separação das fitas do ADN e impedem o acesso de várias enzimas ao ADN, culminando no bloqueio de processos fundamentais como a replicação, transcrição e reparação do ADN, levando conseqüentemente a morte celular (ALMEIDA *et al.*, 2005; MLADENOV *et al.*, 2007; HLAVIN *et al.*, 2010). Os agentes alquilantes continuam sendo amplamente utilizados no tratamento do câncer e constituem a base de várias multiterapias, muitos dos quais são descritos no Quadro 4.

**Quadro 4.** Agentes alquilantes úteis em doenças neoplásicas (Fonte: GOODMAN & GILMAN'S, 2006).

<b>Tipo de Agente</b>	<b>Nomes Genéricos</b>
Mostardas Nitrogenadas	Mecloretamina, Ciclofosfamida, Ifosfamida, Melfalana, Clorambucila
Etileneiminas e metilmelaminas	Alretamina, Tiotepa
Derivados da metilidrazina	Procarbazina
Alquil Sulfonato	Bussulfano
Nitrosuréias	Carmustina, Estreptozocina
Triazenos	Dacarbazina, Temozolomida

#### **2.3.1.1.2. Mitomicina C – Agente antineoplásico alquilante ciclo-celular não-específico**

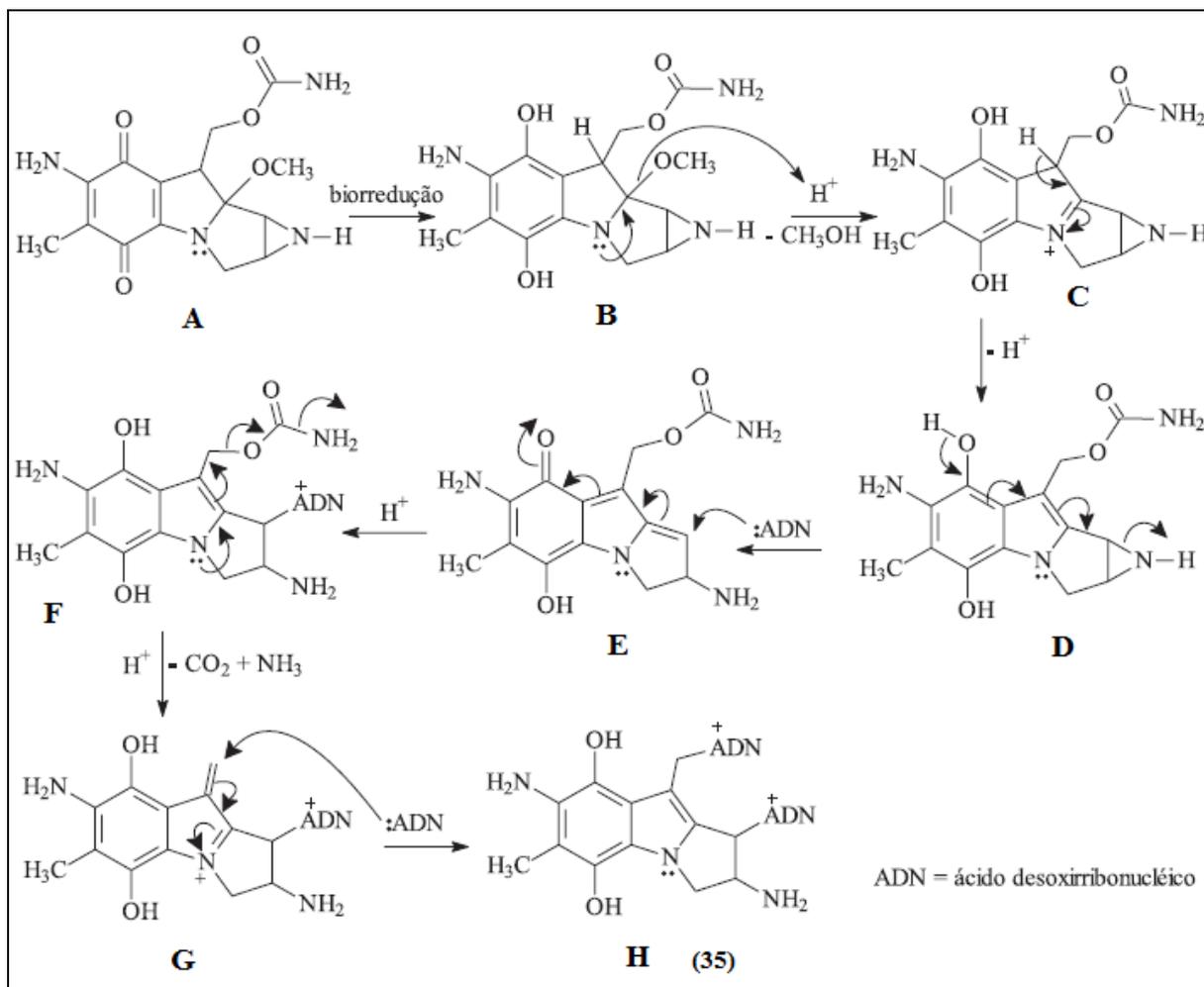
A mitomicina C (MMC) (**34**) (Figura 17) pertence à classe de antibióticos antitumorais, as mitomicinas, e foi primeiramente isolada em 1958 como cristais azuis-violeta a partir de filtrados da fermentação da *Streptomyces caespitosus*. Este antibiótico é solúvel em água e solventes orgânicos e sua estrutura química, na qual as funções quinona, aziridina e carbamato estão arrançadas em volta de um pirrol (VERWEIJ & PINEDO, 1990).



**Figura 17.** Estrutura da mitomicina C.

Quanto ao seu mecanismo de ação, a MMC busca inibir a síntese de ADN, contudo para que se torne ativa, esta droga requer ativação enzimática redutora. Após a ativação, os intermediários reativos formados, semiquinona ou hidroquinona, se ligam ao ADN por alquilação mono- ou bifuncional através de ligações cruzadas entre duas fitas complementares (ligações interfitas) (VERWEIJ & PINEDO, 1990, ALMEIDA *et al.*, 2005, OLIVEIRA & ALVES, 2002).

A ativação via biorredução da mitomicina C e a posterior alquilação do ADN é apresentada no Esquema 3, na qual se observa que o nitrogênio heterocíclico apresenta um caráter de nitrogênio de amida devido à conjugação do par de elétrons não ligante do nitrogênio da carbonila da quinona. Mas, após sofrer biorredução, este nitrogênio passa a ter um caráter de amina, apresentando maior poder nucleofílico e favorecendo, então, a expulsão do grupo metoxila (OLIVEIRA & ALVES, 2002).



**Esquema 3.** Bioativação redutiva da mitomicina C e alquilação do ADN (Fonte: Oliveira e Alves, 2002).

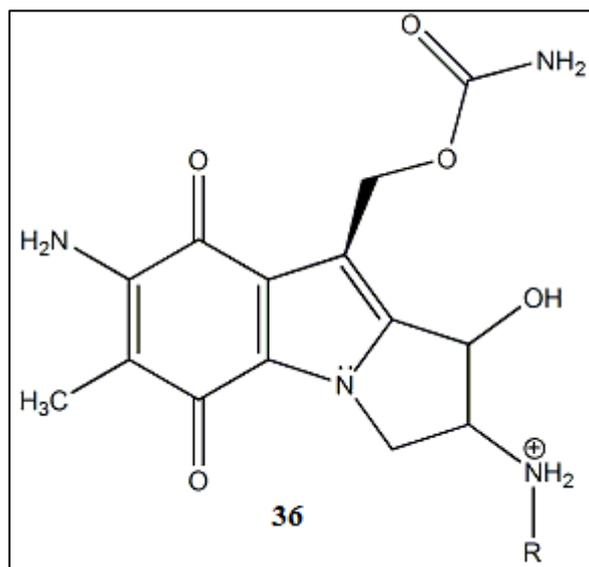
A redução monoelétrica ou bieletônica, em condições anaeróbicas, com posterior perda espontânea do metanol leva a formação de um intermediário instável e reativo (D). A formação da quinona metide (E) então resulta do rearranjo da hidroquinona seguida por uma adição nucleofílica do ADN levando ao produto mono-alkilado (F). O carbamato como bom grupo abandonador, promoveria a formação de um aduto com ligação cruzada no ADN (H). Logo, a principal rota para a ligação bifuncional da MMC a nucleófilos e ao ADN (ligações cruzadas) é inicialmente a ligação covalente monofuncional ao C1 e posteriormente ao C10. Acredita-se que a semiquinona é a função que se liga primeiramente ao ADN e as evidências desta afirmativa tem aumentado pelo fato da redução de um elétron ter se mostrado suficiente para ativar o C1 E C10 como centros eletrofílicos (VERWIJ & PINEDO,1990).

O ciclo metabólico de redução da mitomicina C em condições aeróbicas é diferente. Os radicais semiquinona e hidroquinona reagem com oxigênio molecular gerando radicais

como ânions superóxido, hidroxilas ou peróxidos de hidrogênio. A citotoxicidade desses radicais altamente reativos é exercida através da lipoperoxidação ou danos em ácido nucleicos podendo ser neutralizados por enzimas e outros componentes do sistema antioxidante (VERWIJ & PINEDO,1990).

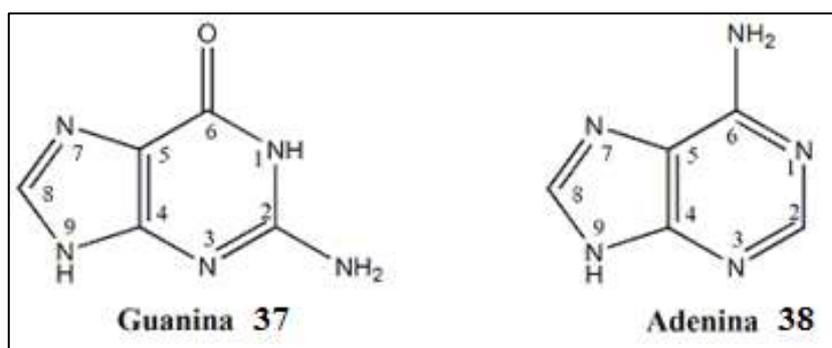
A ativação através da redução da MMC pode ser iniciada ou modulada por sistemas enzimáticos como DT-diaforase, NADPH-citocromo P450 redutase, xantina oxidase, NADPH-citocromo C redutase, algumas flavoproteínas transhidrogenases e também por agentes redutores químicos como tiosulfato de sódio e borohidreto de sódio (VERWIJ & PINEDO,1990).

Sob condições ácidas, também é gerado um intermediário reativo da MMC o qual também se liga covalentemente ao ADN (VERWIJ & PINEDO,1990). A estrutura do intermediário da MMC gerado por hidrólise por catálise ácida é mostrada na Figura 18.



**Figura 18.** Intermediário reativo da MMC formado a partir de hidrólise por catálise ácida (R-H).

Os sítios de ligação da MMC no ADN são a posição N6 no resíduo adenina ou as posições N2, N7 ou O6 no resíduo guanina. (VERWIJ & PINEDO,1990). As estruturas químicas das bases púricas podem ser visualizadas na Figura 19.



**Figura 19.** Estruturas das bases púricas susceptíveis a alquilação pela MMC.

Entre suas funções, além de inibir a síntese do ADN e inibir a mitose, a MMC induz a produção de anormalidades cromossômicas, como trocas de cromátides em células de leucócitos, contudo não há evidências que esta última atividade esteja relacionada com as duas primeiras mencionadas. A toxicidade da MMC também a classifica com teratogênica e carcinogênica. (VERWIJ & PINEDO,1990).

Uma vantagem associada à administração da MMC como agente antineoplásico é que este é preferencialmente ativado a seu intermediário citotóxico em ambientes hipóxicos como demonstra estudos em que foram observadas maiores citotoxicidades em linhagens de células murino tumorais EMT-6 e S-180 hipóxicas do que em tecidos bem-oxigenados como a medula óssea quando houve inibição de enzimas responsáveis por ativação e desativação da MMC. Assim esta toxicidade preferencial pode potencializar tratamentos contra tumores sólidos, tornando a administração conjunta de MMC e radiação mais efetiva, já que este último se mostra mais potente em células tumorais aeróbicas (VERWIJ & PINEDO,1990).

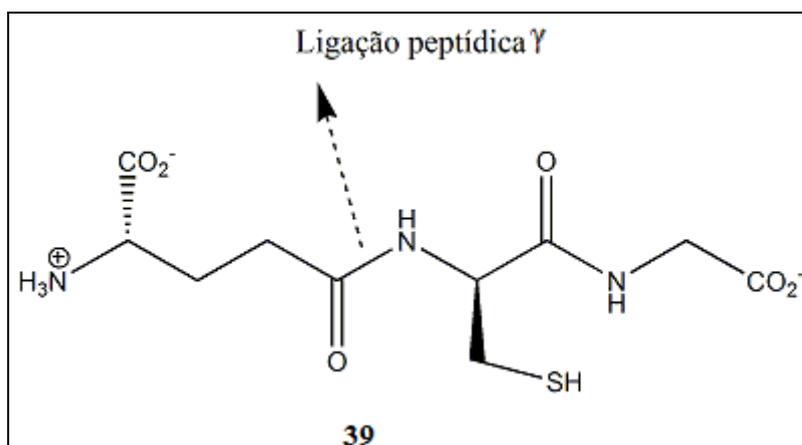
O mecanismo de resistência a MMC não está totalmente elucidado, mas provavelmente envolve mudanças na acumulação da droga, bioativação de espécies alquilantes, e reparo por excisão de nucleotídeos. MMC também parece compartilhar o fenótipo de resistência a múltiplas drogas que engloba a doxorubicina, vincristina e outros produtos naturais (VERWIJ & PINEDO,1990).

## 2.4. Glutathione

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (HO<sup>•</sup>), é consequência natural da respiração

aeróbica. A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares resultam também na formação de espécies reativas, os eletrófilos, como aldeídos e, hidroxialdeídos-, cetoaldeídos- $\alpha,\beta$ -insaturados e/ ou seus respectivos epóxidos. De todo o oxigênio que é diariamente consumido, 2 a 5% é convertido em radicais livres, o que não significa que seja inteiramente prejudicial, pois em doses pequenas combatem bactérias e vírus. Contudo, estas espécies em doses elevadas devem ser neutralizadas pelo sistema antioxidante porque podem causar danos estruturais a muitas biomoléculas, como lipídeos de membrana, ADN, proteínas, carboidratos, etc. (CARNEY, 2004, HUBER & ALMEIDA, 2008).

Entre as principais defesas antioxidantes não enzimáticas da célula estão às vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e a glutaciona (GSH), todos atuantes como captadores de radicais (REISCHL *et al.*, 2007). A glutaciona, um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) (**39**) solúvel em água, destaca-se por ser o tiol de baixa massa molecular em maior concentração intracelular ( $\sim 0,2\text{mM} - 2\text{mM}$ ) em células animais e abrange diversas funcionalidades diretas ou indiretas em muitos fenômenos biológicos importantes, incluindo síntese de proteínas e ADN, metabolismo e proteção celular (NAVARRO *et al.*, 1999; JÚNIOR *et al.*, 2001). A estrutura química da glutaciona (GSH) é apresentada na Figura 20.

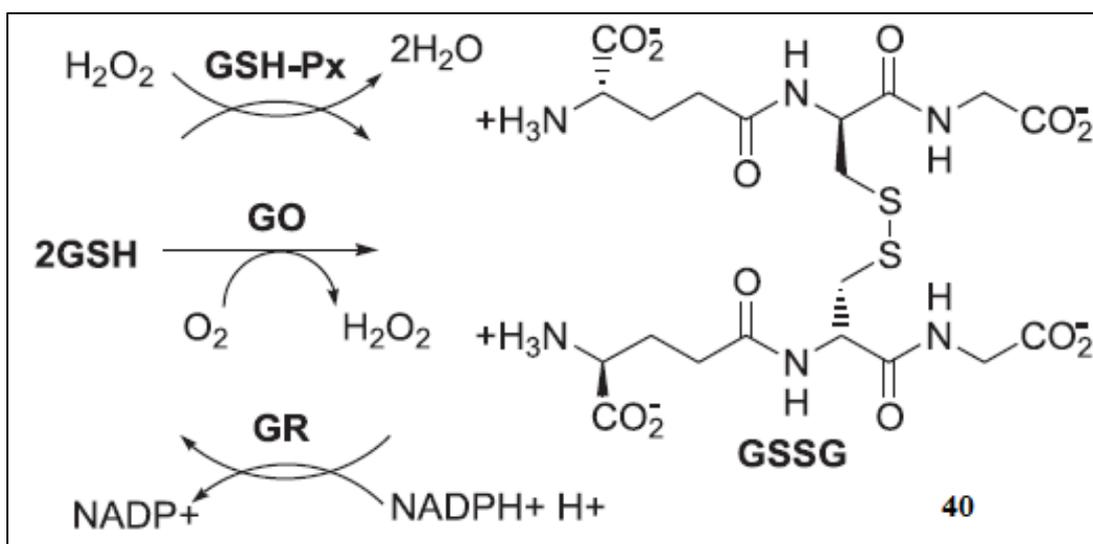


**Figura 20.** Glutaciona: ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinilglicina).

A biossíntese da GSH ocorre no meio intracelular pela ação consecutiva de duas enzimas:  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase e a glutaciona sintetase. A  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase sofre regulação pela GSH através de um feedback negativo, o que previne a produção

excessiva desta ou o acúmulo do intermediário  $\gamma$ -glutamilcisteína (HUBER & ALMEIDA, 2008)

A glutathiona pode existir na região intracelular como dissulfeto de glutathiona (GSSG) ou glutathiona reduzida (GSH) (TOWNSEND *et al.*, 2003). Para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é mantida em níveis muito altos (SIES & MOSS, 1978; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutathiona redutase (GR) reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular. Já as enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona oxidase (GO) catalisam a oxidação de GSH à GSSG como é apresentado esquematicamente no Esquema 4 (SLEKAR *et al.*, 1996, HUBER & ALMEIDA, 2008). Alterações na expressão da GR e GPx tem sido associadas a uma grande variedade de patologias como hepatite, HIV e câncer (TOWNSEND *et al.*, 2003).



**Esquema 4.** Ciclo catalítico da glutathiona (Fonte: HUBER & ALMEIDA, 2008).

Em 1879 foi reportado que a administração de bromobenzeno e de clorobenzeno em cachorros foi seguida por excreção urinária de compostos chamados de ácidos mercaptúricos. Trabalhos posteriores constataram que a GSH pode reagir com uma grande variedade de xenobióticos formando conjugados de glutathiona/ xenobióticos (WADLEIGH & YU, 1986).

Compostos com um centro eletrolítico podem facilmente se conjugar com a GSH; algumas vezes um centro eletrolítico é introduzido por outra reação, por exemplo, por ação de

oxigenases microsossomais formando epóxidos. A interação de xenobióticos com GSH pode ser espontânea ou catalisada por glutathione transferases (GSTs). GSTs é um grupo de enzimas multifuncionais que catalisa a conjugação da forma reduzida da glutathione (GSH), evidenciando seu papel como agente redutor e nucleófilo por possuir o grupo sulfidril (-SH) altamente polarizável, com vários xenobióticos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (MEISTER & ANDERSON, 1983; ALMEIDA & HUBER, 2008; WADLEIGH & YU, 1987). Assim, dentre as várias reações catalisadas por essas enzimas, destaca-se a adição nucleofílica de GSH em átomos de carbonos saturados (ex.: haletos de alquila, lactonas e epóxidos), átomos de carbonos insaturados (ex.: compostos  $\alpha,\beta$ -insaturados, quinonas e quinoniminas, e ésteres) e os átomos de carbonos aromáticos (ex.: haletos de arila e compostos aromáticos com grupos nitro). Os substratos tem em comum um grau de considerável de hidrofobicidade e possuem centros eletrofílicos que são submetidos à substituição nucleófila, adição nucleofílica de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas ou epóxidos, ou, no caso de hidroperóxidos, ataque nucleofílico no oxigênio eletrofílico, resultando em redução (WADLEIGH & YU, 1986; HAMMOND et al., 2001).

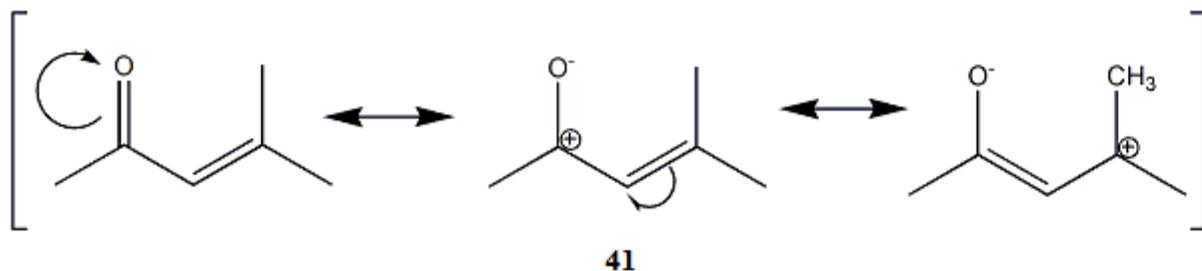
Uma vez formados, os conjugados da glutathione/ xenobióticos são convertidos em ácidos mercaptúricos por uma série de reações iniciadas pela condução ao meio intercelular por transportadores específicos. No meio intercelular, os conjugados de glutathione/ xenobióticos são clivados pela ação das enzimas  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase e dipeptidases presentes e posteriormente, são *N*-acetilados e excretados. As vias de metabolização de conjugados glutathione/xenobióticos e o modo de excreção final varia de acordo com os xenobióticos e espécies (HUBER & ALMEIDA, 2008; MEISTER & ANDERSON, 1983).

#### **2.4.1. Adição conjugada da glutathione a compostos $\alpha,\beta$ -insaturados**

As chalconas possuem uma porção enona  $\alpha,\beta$ -insaturada que é um típico aceitador da adição de Michael que equivale a uma adição conjugada. Nesta reação ocorre adição 1,4 do nucleófilo ao composto carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado ao invés de uma adição 1,2 comum com o ataque nucleófilo diretamente ao grupo carbonila (ZHOU, 2011).

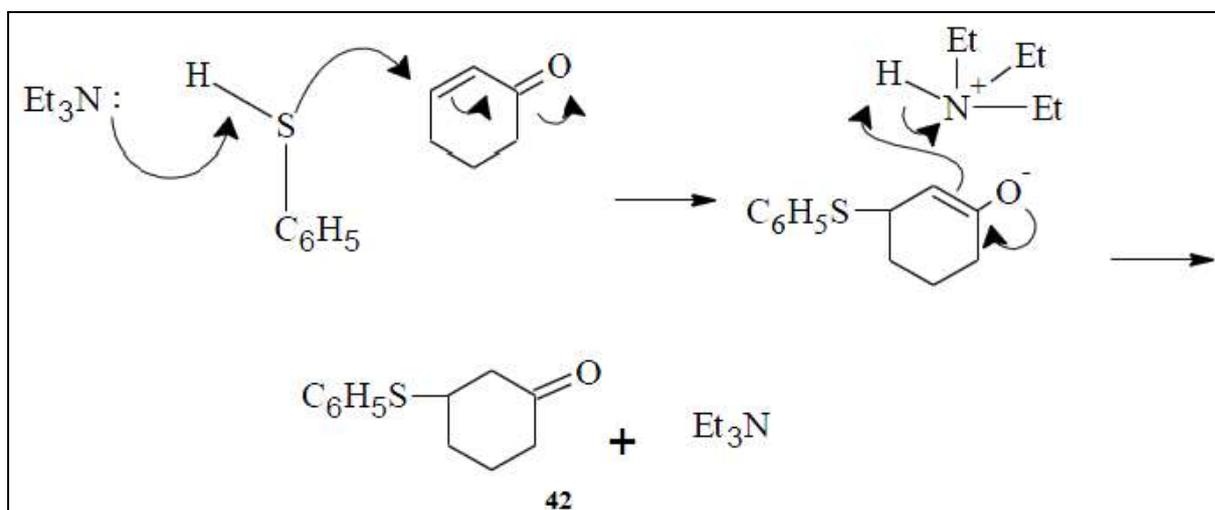
O mecanismo geral envolve ataque de nucleófilos no carbono  $\beta$  da estrutura insaturada. Este modo de ataque nucleofílico é devido à estabilização através de ressonância de enonas. A ressonância promove a deslocalização de uma carga positiva parcial no carbono

$\beta$ , tornando-o susceptível a ataques de agentes nucleofílicos, como mostrado no Esquema 5 (PARDO *et al.*, 1993; CASTELLI *et al.*, 2007).



**Esquema 5.** Estabilização por ressonância de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas (enonas).

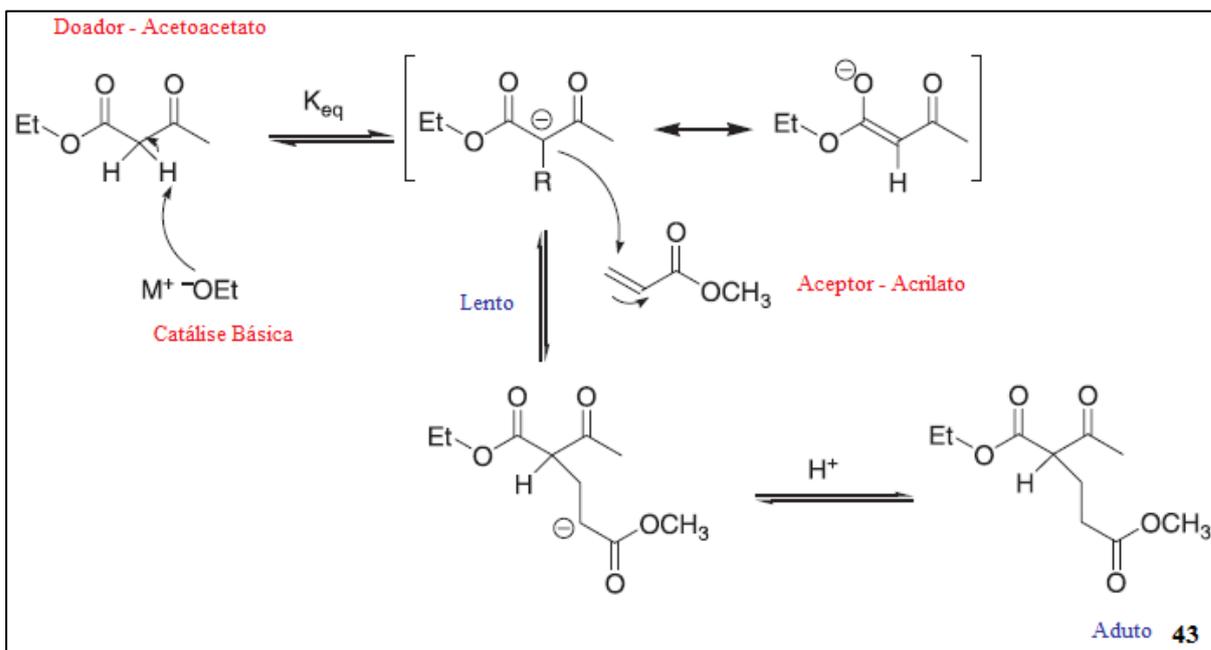
A seguir, no Esquema 6, é apresentado o mecanismo típico da reação de Michael envolvendo ataque nucleofílico de um grupo tiol a uma enona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Na reação, observa-se a transferência de elétrons do nitrogênio para o enxofre, e então para o carbono  $\beta$  do intermediário enolato. Este passo determina a velocidade da reação (PARDO *et al.*, 1993).



**Esquema 6.** Mecanismo de adição conjugada do benzenotiol a enonas em solventes não polares.

Uma das reações de Michael mais conhecidas é a adição do acetoacetato de etila ao acrilato de metila em catálise básica. Primeiramente, o acetoacetato de etila é desprotonado pela base, proporcionando um ânion enolato (doador de Michael), em equilíbrio como mostra o Esquema 7. O ânion enolato, em seguida, reage com a olefina, o acrilato (aceptor de Michael), formando o aduto 1,4. A carbonila do acrilato estabiliza o ânion resultante até a

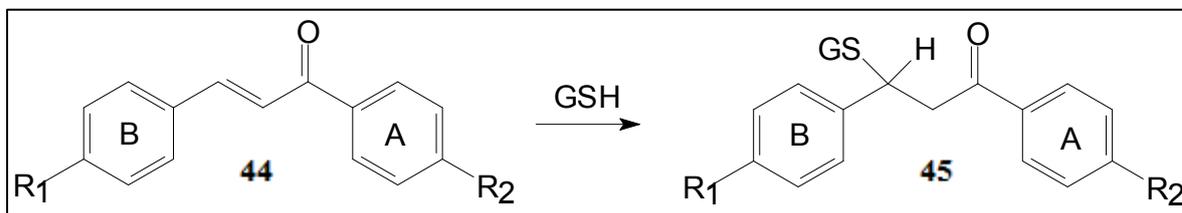
transferência de próton ocorrer, regenerando a base. A força motriz para a adição conjugada global é a mudança de entalpia que acompanha a substituição de uma ligação  $\pi$  por uma ligação  $\sigma$ , assim, há a preferência por adição 1,4 em relação a adição 1,2. Em alguns casos, no entanto, em condições de reações cineticamente controladas, pode haver ataque ao carbono carbonílico, em vez do carbono  $\beta$  da olefina (MATHER *et al.*, 2006).



**Esquema 7.** Mecanismo geral da reação de Michael.

Cetonas  $\alpha,\beta$  - insaturadas tem sido descritas como tendo grande afinidade por grupos tióis e pouca ou quase nenhuma afinidade por grupos hidroxí e amino (DIMMOCK *et al.*, 1988). Esta especificidade reduz as chances de interações destes compostos com ácidos nucleicos, reduzindo, assim seus possíveis efeitos carcinogênicos e mutagênicos; efeitos estes apresentados pelo uso de alguns agentes alquilantes como quimioterápicos. A afinidade preferencial dessas cetonas e também de alguns alquilantes seletivos por tióis podem culminar em vantagens já relacionadas à toxicidade seletiva por tumores, pois grupos tióis, presentes principalmente nas cisteínas das glutatona são reportados em altos níveis em estágios prévios a mitose (CAIRNS, 1980; SCHAUENSTEIN *et al.*, 1985; FARMER, 1982). A Figura 21 mostra a alquilação da glutatona (GSH) promovida pela atração eletrofílica da insaturação da chalcona pelo grupo tiol levando a formação dos adutos através de uma adição conjugada ao carbono  $\beta$  do aceitador, característica da adição de Michael (MATTOS & MARZORATI,

1999; DIMMOCK *et al.*,1998; NAM *et al.*, 2004; SOLOMONS & FRYHLE, 2009; VIA *et al.*,2009).



**Figura 21.** Esquema apresentando a formação do aduto A a partir da ligação covalente do grupo tiol da glutathiona (GSH) e uma chalcona (Adaptado de DIMMOCK *et al.*, 1998).

## 2.5. A quimioterapia e a resistência a múltiplos fármacos

Um dos grandes obstáculos para o sucesso do tratamento de pacientes com câncer é o fenômeno conhecido como resistência a múltiplos fármacos (também conhecida como MDR, em inglês, *Multiple Drug Resistance*) e baseia-se na habilidade das células tumorais em desenvolverem resistência simultânea a diferentes agentes antineoplásicos, estruturalmente e funcionalmente não relacionados (KRISHNA & MAYER, 2000).

A resistência aos fármacos é um fenômeno multifatorial que pode ser intrínseca – manifestada no primeiro ciclo de tratamento e a característica responsável pela resistência é inerente à própria célula, vinculada ao processo original de transformação e, resistência adquirida - caracteriza-se pelo desenvolvimento de resistência da célula tumoral durante o tratamento quimioterápico possivelmente como um resultado da seleção de populações tolerantes (GOLDIE, 2001; HOOIJBERG, *et al.* 2006; HUBER & ALMEIDA, 2008).

Diferentes mecanismos estão envolvidos no fenômeno conhecido como resistência a múltiplos fármacos, os quais podem ser classificados em dois grandes grupos descritos a seguir:

(1) MDR não-clássica: não está associado com transporte celular. Este tipo de resistência é causado, principalmente, por alterações na atividade de sistemas enzimáticos específicos como o sistema das topoisomerases culminando na redução da atividade citotóxica de fármacos, independente da sua concentração intracelular que permanece inalterada. Alterações das proteínas envolvidas na via apoptótica como as proteínas da família Bcl-2 e p53 também podem levar a redução da quimiosensibilidade das células tumorais, desde que os

efeitos citotóxicos dos quimioterápicos seja via processo apoptótico (KRISHNA & MAYER, 2000).

(2) MDR clássica: caracteriza-se pela superexpressão de proteínas nas células malignas, tais como, as proteínas transportadoras na membrana celular, as quais funcionam como bombas de efluxo de agentes citotóxicos, diminuindo sua concentração intracelular (OZBEN, 2006).

O principal mecanismo relacionado a MDR clássica é a superexpressão de proteínas pertencentes à superfamília de proteínas de membrana *ATP Binding Cassete* (ABC), que atuam como transportadores ativos, também chamados de ATPases de transporte. Dos 48 transportadores ABC humano, treze parecem estar implicados na resistência. Estas proteínas incluem MDR1 (ABCB1), nomeadamente a glicoproteína P, e MRP1 (ABCC1), as quais levam à diminuição da concentração intracelular de vários compostos quimioterápicos (KRISHNA & MAYER, 2000; MATHEW & DIPAOLA, 2007).

A associação da redução de níveis de GSH celular com a sensibilização de células tumorais a agentes citotóxicos como radiação e muitas drogas terapêuticas tem sido demonstrada em vários casos. Por exemplo, Durse *et al.* (1989) mostrou que a redução de GSH reverteu, parcialmente, a resistência a várias drogas em linhagens celulares de câncer de mama. Assim, agentes quimioterápicos podem vir a exercer uma toxicidade preferencial contra tecidos tumorais após quimiossensibilização provocada pela redução dos níveis de GSH (BIAGLOW *et al.*, 1984; GREEN *et al.*, 1984; KRAMER *et al.*, 1987; OZOLS *et al.*, 1987; SKOV *et al.*, 1992).

O sistema enzimático GSH/ GSTs é apontado como um dos mais importantes para MDR. Os mecanismos de resistência relacionados a esse sistema envolvem principalmente: alterações nos níveis de GSH e/ou na expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na sua síntese; alterações na expressão dos genes que codificam as GSTs; e/ou alterações do transporte dos conjugados de GSH e compostos reativos. No último caso, o aumento da eficiência do transporte de conjugados de GSH, ocorre como consequência do aumento de GSH e/ou do aumento da expressão dos genes que codificam os transportadores destes conjugados (HUBER & ALMEIDA, 2008; TOWNSEND & TEW, 2003).

Outro papel de destaque relacionado à GSH no fenômeno de MDR a relaciona com a atividade das proteínas MRP1. Alguns trabalhos têm demonstrado que a MRP1 exerce o transporte de compostos quimioterápicos para o espaço extracelular quando estes se

encontram conjugados à GSH, além do que o aumento da expressão de MRP1 está correlacionado diretamente com o aumento de  $\gamma$ -GCS em células tumorais (ZAMAN *et al.*, 1995; BORST *et al.*, 2000; COLE & DEELEY, 2006; KUO *et al.*, 1998; ISHIKAWA *et al.*, 1996). Lautier *et al.* (1996) constataram elevada expressão da MRP1 em células HeLa (câncer cervical humano) transfectadas com uma significativa diminuição das concentrações intracelulares de GSH. Além disso, está comprovado que a redução da concentração de GSH diminui a resistência mediada pela MRP1, contra alcalóides de vinca (vimblastina, vincristina, vinorelbina e vindesina) e antraciclina. No entanto, a interação entre GSH e MRP1 não está completamente esclarecida (KUO *et al.*, 1998; ISHIKAWA *et al.*, 1996, BORST *et al.*, 2000).

## 2.4. Mutação

O ADN (ácido desoxirribonucleico) constitui o material genético de todos os seres vivos e é formada por uma sequência de pares de bases nitrogenadas, organização na qual todas as informações genéticas se encontram armazenadas (LEWIN, 2001). Devido a grande importância de sua função, o ADN também é a única molécula biológica que possui mecanismo próprio para prevenção e reparação de falhas em seu metabolismo garantindo a estabilidade do genoma (LEHNINGER *et al.*, 1995). Contudo, falhas podem passar despercebidas pelo mecanismo de reparo celular ocasionando as alterações em sua constituição chamadas de mutações, decorrentes de processos celulares normais (mutações espontâneas) ou causadas por exposição do organismo a agentes químicos, físicos ou biológicos (mutações induzidas) (LEWIN, 2001).

Mutação é uma alteração permanente do material genético, a qual não provém de segregação ou recombinação e que pode ocorrer tanto em células somáticas podendo ocasionar um processo carcinogênico, quanto em células germinativas, produzindo doenças genéticas e malformações advindas de efeitos teratogênicos (RABELLO-GAY *et al.*, 1991; GRIFFITHS *et al.*, 1998). As mutações podem ainda serem classificadas basicamente em genômicas e cromossômicas:

- A mutação gênica ocorre pela alteração de um alelo de um gene por outro alelo diferente em *locus* cromossômico (mutação de ponto), perda ou inserção de subunidades de nucleotídeos. Geralmente, há a alteração do funcionamento de um gene desde a uma perda

completa de expressão do gene ou à formação de uma proteína variante com propriedades alteradas (RABELLO-GAY *et al.*, 1991; GRIFFITHS *et al.*, 1998).

- Em outro nível de alteração genética, apresenta-se a mutação cromossômica, definida como rearranjos na estrutura dos polímeros de dupla hélice do ADN, os cromossomos, por alteração de cromossomos inteiros ou apenas segmentos, ou ainda alterações de grupos inteiros de cromossomos. Os efeitos relativos às novas organizações cromossômicas e dos genes neles contidos podem culminar em anomalias de funcionamento da célula e do organismo como resultado do número ou posição anormal de genes ou mesmo destruição da estrutura de um gene na translocação (RABELLO-GAY *et al.*, 1991; GRIFFITHS *et al.*, 1998).

É importante desmistificar, ressaltando que o aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies partindo-se da variabilidade de seres e seleção. Contudo, quando este pequeno número de mutações não implica em mudanças detectáveis ou determinam a morte celular ou revelam-se como vantagens na evolução e variabilidade genética, essas alterações podem gerar crescimento desordenado das células (ERDTMANN, 2003).

As mutações cromossômicas se mostram determinantes em várias doenças genéticas com uma percentagem de 0,61% em relação ao número de nascimentos vivos humanos, aproximando-se dos níveis de incidência de mutações gênicas expostos por GRIFFITHS (1998) de 1,2%. Esse resultado é inesperado se considerarmos que todas as mutações cromossômicas surgem como novas a cada geração.

A identificação de compostos naturais ou sintéticos com propriedades mutagênicas e antimutagênicas tem enorme aplicabilidade como medida preventiva ou mesmo de remediação para que o ser humano reduza a taxa de mutações, diminuindo assim a incidência de câncer e outras doenças genéticas, a partir do aumento da exposição a agentes antimutagênicos até mesmo através da dieta e limitando a influência de agentes mutagênicos (EVENTI *et al.*, 2009).

Em geral, a genotoxicidade de um agente mutagênico, principalmente de agentes químicos, pode ser avaliada de acordo com sua interação com o ADN ou através dos efeitos dessa interação a partir das seguintes constatações (VAN GOETHEM *et al.*, 1997):

- a formação de adutos no ADN revela a capacidade do composto de se ligar ao material genético e a sua potencialidade em induzir principalmente mutações gênicas;

- o teste Cometa ou eluição alcalina mostra a capacidade do agente em quebrar o ADN;
- e os testes de micronúcleos ou aberrações cromossômicas avaliam mutações cromossômicas e/ou genômicas.

## 2.5. Antimutagenicidade

Mutágenos não estão somente envolvidos em genotoxicidade e carcinogênese, mas também estão envolvidos na inserção e patogênese de diversas doenças crônico-degenerativas incluindo desordens hepáticas, neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, diabetes, artrites, inflamação crônica e nos processos de envelhecimento (BHATTACHARYA, 2011).

Numerosos estudos tem sido conduzidos nas ultimas quatro décadas para identificar compostos que poderiam proteger humanos contra danos no ADN e suas consequências (BHATTACHARYA, 2011)..

De fato, o termo “antimutagênico” era usado originalmente para descrever aqueles agentes que reduzem a frequência ou taxa de mutação espontânea ou induzida independente do mecanismo envolvido (WATERS *et al.*, 1990).

Antimutágenos são definidos como agentes que previnem a transformação de um composto mutagênico em um mutágeno, inativam o mutágeno ou previnem a reação do mutágeno com o ADN. Outro tipo de antimutágeno pode induzir, reparar ou inativar diretamente ou indiretamente enzimas de reparo do ADN em processos de replicação e recombinação (FERGUSON, 1994).

Os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos foram classificados em dois processos maiores, denominados desmutagênese e bio-antimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores, ou antimutagênicos, atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no ADN, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo a ativação metabólica de pró-mutagênicos ou sequestrando moléculas reativas. Na bio-antimutagênese, os antimutagênicos atuam sobre o processo que leva a indução de mutações, ou no reparo das lesões causadas no ADN (KADA *et al.*, 1978). Posteriormente, outra classificação mais detalhada foi sugerida, considerando o modo de ação dos antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos, bem como o ambiente de ação, extra ou intracelular (DE FLORA &

RAMEL, 1988). Cada estágio de ação em potencial dependente da ação intracelular ou extracelular é subdividido como mostra o Quadro 5.

**Quadro 5.** Classificação de antimutágenos por mecanismo de ação (Fonte: RAMEL *et al.*, 1986, BHATTACHARYA, 2011).

<b>1. Extracelular</b>
a. Inibidores de formação principalmente via inibição das enzimas promotoras da bioativação de pró-carcinógenos e pró-mutágenos, particularmente o sistema microsomal dos citocromos P450.
b. Sequestradores de mutágenos.
c. Inativadores de pró-mutágenos ou mutágenos.
<b>2. Intracelular</b>
a. Bloqueando agentes para prevenir mutágenos de interagir ou reagir com alvos celulares através dos seguintes mecanismos: (i) Inibidores da conversão a espécies carcinogênicas finais; (ii) Compostos que elevam a atividade de enzimas detoxificantes tais como glutatona transferase tendendo a inibir uma série de substancias carcinogênicos, como por exemplo, isotiocianatos tais como benzil isotiocianato e antioxidantes como BHA (2,3-Tercbutil-4-hidroxianisol); (iii) Compostos que reagem diretamente com eletrófilos.
b. Sequestradores de radicais.
c. Supressores da expressão da neoplasia em células previamente expostas a doses carcinogênicas de um agente mutágeno.
d. Supressores de agentes que afetam o reparo do ADN.

Componentes sintetizados por plantas são sinalizados como potenciais quimiopreventivos com respeito a carcinogênese humana e podem atuar nos estágios de promoção e progressão da doença. Fito-antimutágenos pertencem a uma variedade de diferentes compostos químicos como compostos fenólicos, pigmentos, sulfetos alílicos, glucosinolatos, taninos, antocianinas, flavonoides, fito-esteróis, inibidores de proteases e fito-estrógenos (BHATTACHARYA, 2011; EDENHARDER *et al.*, 1993).

A atividade antimutagênica pode ser dependente das condições experimentais como rota ou tempo de exposição relativo à exposição ao mutágeno. Variando-se os níveis de

dosagem de alguns compostos com atividade antimutagênica resultou em aumento da atividade mutagênica em certas doses. Atividade antimutagênica também é afetada por combinações entre compostos químicos diferentes (WATERS *et al.*, 1990).

### **2.5.1. Efeito Janus**

Há um grupo de compostos químicos tidos como substâncias moduladoras quanto a efeitos genotóxicos e antígenotóxicos, os quais, em sua maioria, são compostos encontrados em plantas ou extratos. Estes compostos são também conhecidos como mutágenos e carcinógenos Janus, nome dado em referência ao deus romano Janus por ser descrito como tendo uma cabeça com duas faces. Um número razoável de químicos possuem tanto efeitos antimutagênicos como mutagênicos. Por exemplo, o  $\beta$ -caroteno foi o primeiro anticarcinogênico presumível a ser usado em larga escala, até que ensaios clínicos revelaram que o tratamento com o composto estava associado a um aumento de incidência de câncer maior em vez da esperada redução. Outros exemplos incluem testosterona,  $\beta$ -estradiol, dietilestilbestrol, vanilina etc (BHATTACHARYA, 2011, WATERS *et al.*, 1990).

### **2.6. Teste do micronúcleo**

Cerca de 90% de todos os cânceres são causados por fatores ambientais, tais como o fumo, a dieta, o estado nutricional e a exposição ocupacional (IARC, 1990). Dessa maneira, estudos que avaliam o potencial mutagênico de diferentes substâncias são extremamente importantes. Dentre os testes de avaliação de genotoxicidade preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, o teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito e recomendado para a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001; RIBEIRO, 2003). Matter & Schmid (1971) verificaram em roedores a correlação entre aberrações cromossômicas e o aparecimento de anomalias nucleares (micronúcleos) em eritrócitos jovens, após a expulsão do núcleo. Os autores, utilizando várias doses de Trenimon, concluíram que a incidência dessa anomalia era dose-dependente, e que a sensibilidade para este então chamado “teste do micronúcleo” era similar às tradicionais análises citogenéticas, considerando-o como um teste rápido e simples na detecção de mutagenicidade.

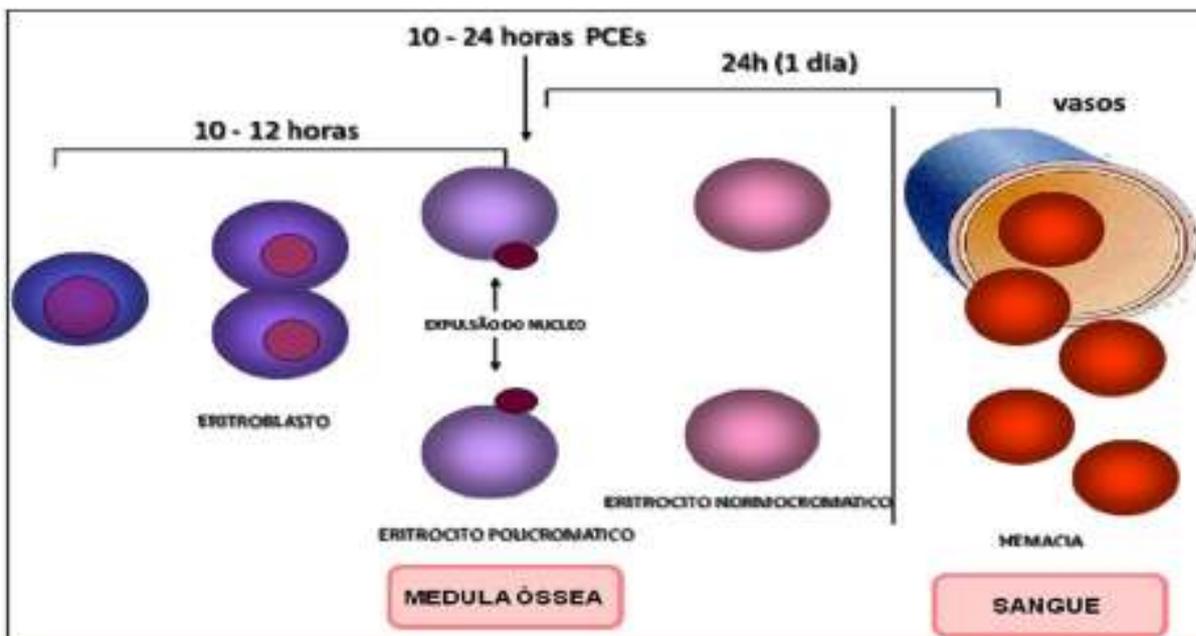
Historicamente, os micronúcleos foram descritos há mais de um século, sendo chamados de “fragmentos de material nuclear” por Howell ou “corpúsculos intraglobulares” na terminologia utilizada por Jolly no início do século passado. O termo “Corpúsculos de Howell-Jolly” ficou conhecido entre os hematologistas para designar o aparecimento de eventos de micronúcleos (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

O Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é um teste amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR *et al.*, 1987; HAYASHI *et al.*, 1994).

Micronúcleo é definido como um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula durante a divisão celular por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que se atrasam em relação aos demais. Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentais induzidas ou ainda, de falhas no fuso celular, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (RAMIREZ & SALDANHA, 2002). Em animais tratados com conhecidos agentes clastogênicos como 2,3,5-Tris-etilenoiminobenzoquinona(1,4) ou mitomicina C foram encontrados micronúcleos no citoplasma de várias células da medula óssea: eritroblastos, mielócitos, mieloblastos, eritrócitos, etc. Schmid (1975) relatou que a maioria desses micronúcleos detectados em tais experimentos é encontrados em eritrócitos. Além disso, quando o tempo de tratamento com o agente clastogênico é entre 24 e 30 horas, a maioria dos micronúcleos são encontrados em eritrócitos policromáticos recém-formados.

Os micronúcleos são contados nos eritrócitos jovens (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975). Quando os eritroblastos expõem seu núcleo, ao se transformarem em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis. O processo de maturação dos eritroblastos até eritrócitos normocromáticos é apresentado na Figura 22. Durante um período de 10 a 24 horas, os eritrócitos jovens são policromáticos (ARN-positivos), isto é, coram-se em azul e não em vermelho. Se contarmos os micronúcleos apenas nesse tipo de célula, saberemos que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. Como o período entre a última divisão e a formação do eritrócito policromático (EPC) é de 8 a 12 horas, é óbvio que só irá encontrar micronúcleos induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo dentro do qual os micronúcleos podem ser detectados corresponde à duração do estágio de policromático, entre 10 e 24 horas. Resultados positivos no teste de micronúcleos indicam que a substância induz micronúcleo que são resultados de danos cromossômicos ou danos no

aparato mitótico no eritroblastos das espécies testadas. Resultados negativos indicam que sobre as condições de teste, a substância não produz micronúcleo nos eritrócitos policromáticos das espécies testadas (RABELO-GAY, 1991).



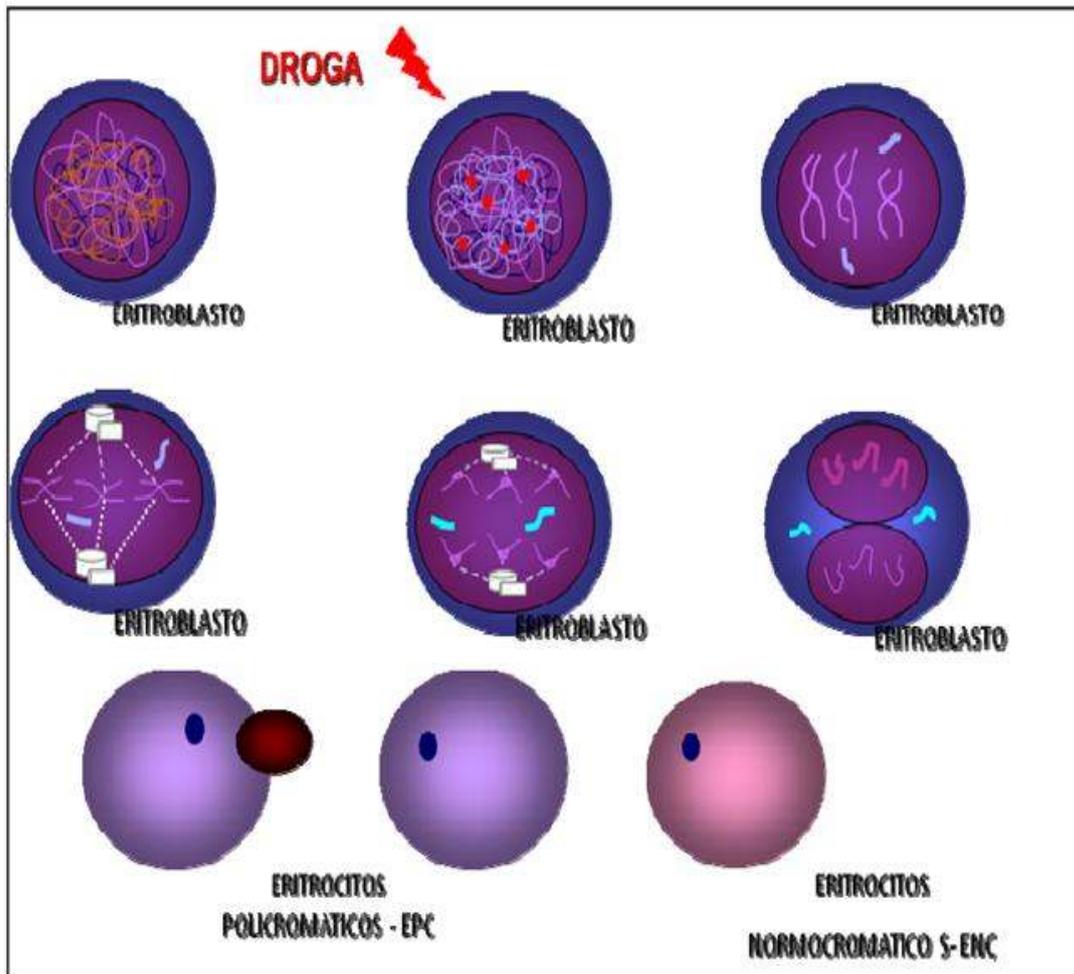
**Figura 22.** Resumo do processo de maturação das células da linhagem eritrocitária (RIBEIRO, 2003).

Comparado com outros testes em medula óssea *in vivo*, o teste do Micronúcleo é tecnicamente mais simples, pode ser conduzido em menor tempo, tem um resultado menos subjetivo, detecta tanto agentes clastogênicos como aneugênicos, tem baixo custo, geralmente requer o uso de um menor número de animais, podendo ser automatizado para a análise de micronúcleo por análise de imagem e citometria de fluxo (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003). É capaz de considerar e avaliar as diferentes fases da farmacocinética das drogas, avaliar danos cromossômicos e é especialmente relevante para a avaliação dos riscos mutagênicos, na medida em que permite a consideração de fatores de metabolismo *in vivo*, processo de farmacocinética e de reparo do ADN e possui reprodutibilidade satisfatória, já que foi adaptado por vários autores ao estudo em diferentes espécies. É necessário ainda considerar que ensaios realizados com animais em laboratório oferecem vantagens também acerca de reproduzir as condições de exposições humanas aos agentes tóxicos. Um ensaio *in vivo* também é útil para a investigação complementar de efeitos mutagênicos detectados por um sistema *in vitro* (OECD, 1997; GARAJ-VRHOVAC & ZELJEZIC, 2002).

O procedimento original para o Teste de Micronúcleo foi desenvolvido por Schmid e colaboradores (MATTER & SCHMID, 1971; SCHMID *et al.*, 1971; NICHOLS *et al.*, 1972; SCHMID, 1973) e, subsequentemente, modificado por HEDDLE e colaboradores (HEDDLE, 1973; SALAMONE *et al.*, 1980; HEDDLE & SALAMONE, 1981).

O aumento da frequência de micronúcleos não indica necessariamente se há possibilidade de transformação maligna, na medida em que a técnica não permite avaliar a importância dos fragmentos quebrados para a linhagem celular avaliada, tão pouco se o ADN presente no micronúcleo pode ou não ser transcrito. Por outro lado, se houver exposição sucessiva a agentes genotóxicos a capacidade de reparo do organismo fatalmente será suplantada, o que pode levar a fenômenos degenerativos capazes de gerar morte celular ou danos cumulativos no sentido da transformação maligna (CARRARD *et al.*, 2007).

A formação de micronúcleos na divisão celular são eventos que podem ser induzidos por um estresse oxidativo, exposição aos clastógenos (Figura 23), defeitos genéticos no ciclo celular e/ou nos genes de reparo do ADN, como também de deficiências em nutrientes exigidos como cofatores no metabolismo do ADN e no maquinário de segregação cromossômica (FENECH, 2005). Todos esses eventos podem causar a formação de micronúcleo por rearranjos cromossômicos, expressões gênicas alteradas ou aneuploidia, os quais são efeitos associados com fenótipo de instabilidade cromossômica frequentemente presente no câncer (FENECH, 2002).



**Figura 23.** Formação de micronúcleos em eritrócitos de medula óssea (RIBEIRO, 2003).

A relação entre a indução de micronúcleos e o aparecimento de câncer se torna mais evidente ao considerar resultados como o que mostrou uma maior frequência de micronúcleos em pacientes com câncer não tratados e em indivíduos afetados por doenças congênitas propensas ao câncer, como, por exemplo, a ataxia telangiectasia e o que constata a relação entre agentes genotóxicos indutores de micronúcleo (radiação ionizante e ultravioleta) e carcinogênese (FENECH *et al.*, 1999; FENECH, 2002; FENECH, 2005; CHANG, 1997; VAN SCHOOTEN, 2002).

### **3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Materiais e Métodos**

##### **3.1.1. Síntese, purificação e caracterização físico-química da chalcona CG1**

###### **3.1.1.1. Reagentes e Solventes**

Utilizados na síntese, purificação e caracterização físico-química da chalcona:

- Acetofenona 99% (Across Organics ®)
- KOH 85% (Vetec ®)
- *p*-nitroacetofenona 99% (Sigma ®)
- Metanol (Dinamica ®)
- DMSO deuterado (Aldrich ®)

###### **3.1.1.2. Equipamentos**

###### **3.1.1.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Cromatoplaça de sílica gel 60 HF254 em alumínio (Merck ®).

###### **3.1.1.2.2. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

O espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  foi obtido em aparelho BRUKER modelo DRX 400 MHz de 9,4 Tesla (pertencente à UFSCar). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão expressos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz) em relação a um padrão interno de TMS ou o próprio solvente. Para a amostra analisada, utilizou-se DMSO- $d^6$  como solvente.

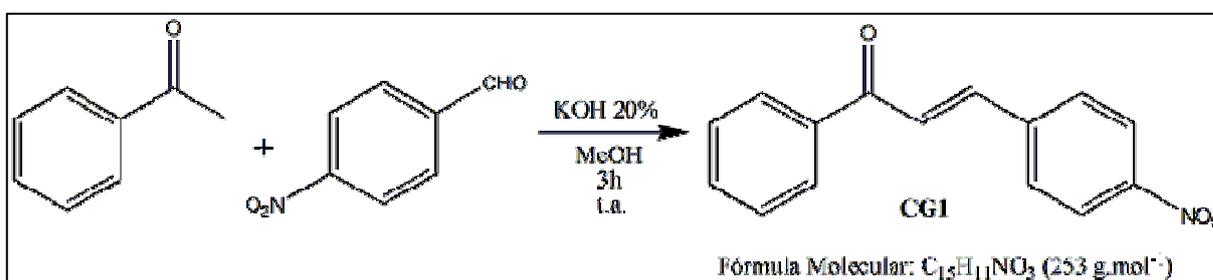
###### **3.1.1.2.3. Aparelho para medição do ponto de fusão**

O ponto de fusão do composto foi determinado em um aparelho KARL KOLB Scientific-Technical-supplies FrankFurt/M Germany e expresso em graus Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ).

#### 3.1.1.2.4. Espectrômetro de Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados num equipamento MOBEM modelo M102 com transformada de Fourier e calibração interna e no Spectrum 100 da Perkin Elmer. As amostras foram incorporadas em pastilhas de KBr e as absorções estão expressas em número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### 3.1.1.3. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1)



**Esquema 8.** Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.

Foram utilizados (0,233 mL/ 2,0 mmol) acetofenona e *p*-nitrobenzaldeído (0,302 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20% (p/v). A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 3 horas (Esquema 8). Observou-se a formação do precipitado (amarelo) que foi filtrado e recristalizado em metanol.

#### 3.1.2. Teste do Micronúcleo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás (CEPMHA/HC/UFG nº 230/10) – (Anexo – Figura 40).

##### 3.1.2.1. Camundongos

Foram utilizados 80 camundongos *Mus musculus* (Swiss Webster) out bred, do sexo masculino, pesando  $35 \pm 10$  g, com idade de 7 a 12 semanas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Antes da realização do experimento, os animais permaneceram por 7 dias no laboratório, onde foram mantidos em gaiolas de polipropileno de dimensão de

40x30x16 cm com 5 animais cada, forradas com maravalha trocadas diariamente, e alimentados com ração comercial (Albina, Ecibra Ltda) e água filtrada, ambos oferecidos "*ad libitum*". Os animais foram mantidos a temperatura ambiente de 25 °C, umidade 50% ± 20% e um ciclo de luz 12 h claro/escuro.

### 3.1.2.2. Reagentes e Soluções

---

#### Solubilização das células

---

Soro fetal bovino (Soralí ®)

---

#### Fixador

---

Metanol absoluto (Labsynth ®)

---

#### Tampão Fosfato (pH 6,8)

---

##### Solução A

Fosfato de potássio monobásico – K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Reagen ®).....	8,1654 g
Água destilada .....	1000 mL

---

##### Solução B

Fosfato de sódio dibásico anidro – Na <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> (Synth ®).....	8,5176 g
Água destilada.....	1000 mL

---

#### Corante Giemsa tamponado\*

Tampão fosfato (pH 6,8)	200 mL
Corante Giemsa (Doles)	9 mL

---

#### Mitomicina (MMC)

MMC (Bristol-Myers Squibb ®)	5 mg
Água destilada	5 mL

---

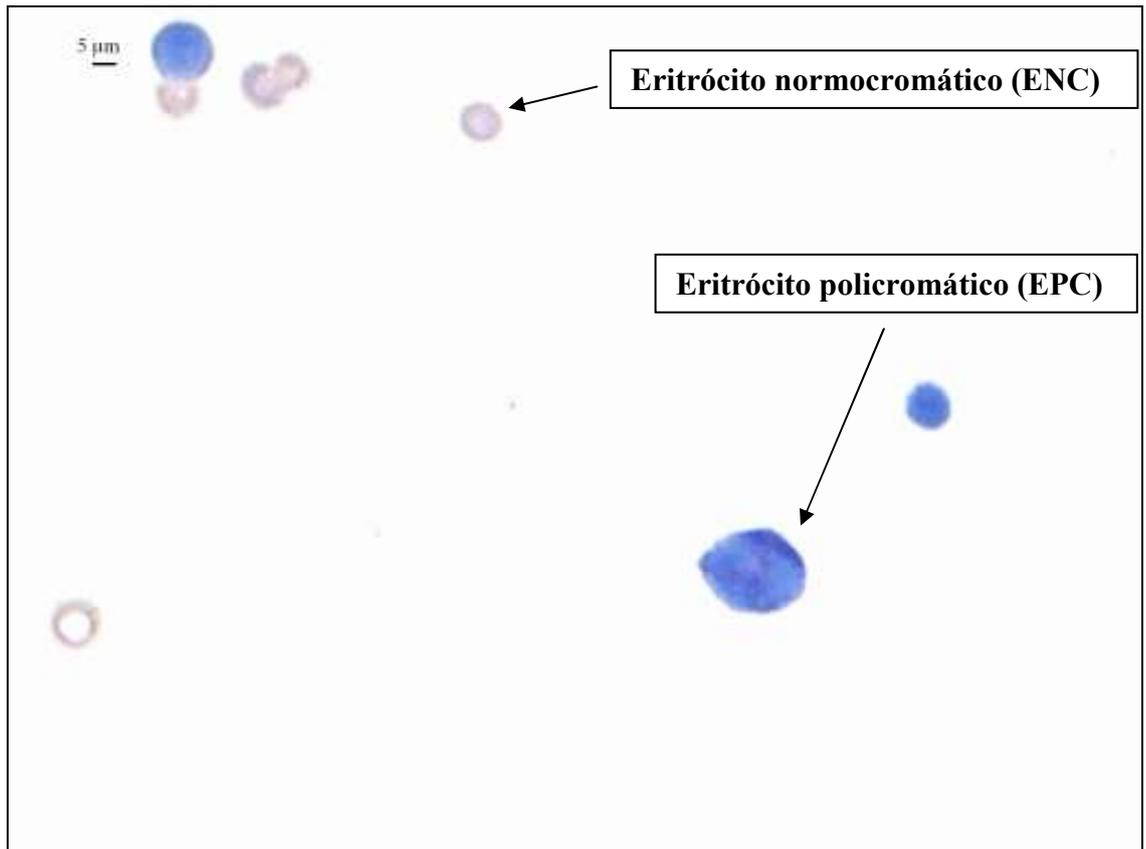
\*Filtrado em papel filtro.

### **3.1.2.3. Procedimento de execução**

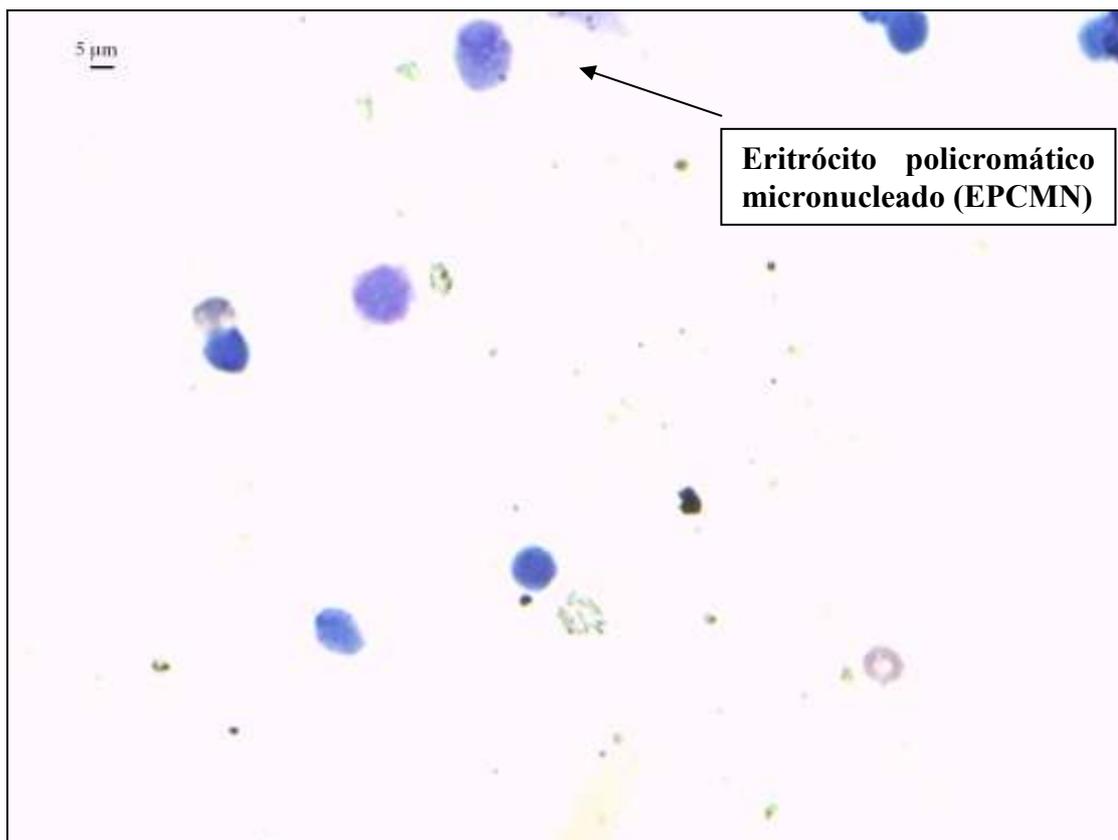
Os camundongos foram divididos em grupos de cinco animais cada. Os animais foram tratados em diferentes tempos (24 e 48 horas), via intraperitoneal, com as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona solubilizadas em quantidade mínima de DMSO. O grupo controle negativo foi tratado com DMSO enquanto que o grupo controle positivo recebeu uma dose única intraperitoneal (i.p.) de 4 mg/Kg (80% da DL<sub>50</sub>) de mitomicina C (MMC). Para avaliação da antimutagenicidade, foram administradas as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg (solubilizadas em quantidade mínima de DMSO) concomitantemente de uma dose de 4 mg/Kg de MMC. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. As epífises do fêmur foram cortadas e a medula óssea lavada com 1 mL de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 1.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado com pipeta Pasteur. Uma gota de suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro onde foi feito o esfregão celular. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução do Corante Giemsa tamponado com pH 6,8 por um período de 15 minutos (Heddle, 1973). Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em temperatura ambiente.

### **3.1.2.4. Análise Citogenética**

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum Olympus BH-2 com a finalidade de se detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão (1000x), avaliando-se 2000 EPC em duas lâminas para cada animal. Para avaliação da citotoxicidade, foram contados também eritrócitos normocromáticos (ENC), e a razão EPC/ENC foi determinada conforme Schmid (1975). Nas Figuras 24 e 25 visualizam-se os eritrócitos policromáticos, eritrócitos normocromáticos e eritrócitos policromáticos micronucleados como vistos sob esta metodologia proposta.



**Figura 24.** Eritrócitos normocromáticos (ENC) e eritrócitos policromáticos (EPC) em uma lâmina do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos da CG1 visualizada em microscópio óptico de luz (aumento de 1000x).



**Figura 25.** Eritrócito policromático micronucleado (EPCMN) de uma lâmina do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos da CG1 visualizada em microscópio óptico de luz (aumento de 1000x).

#### **3.1.2.4. Análise Estatística**

As freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 2000 EPC de cada grupo foram comparadas em relação ao grupo controle negativo ou positivo pelo teste ANOVA e foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

As freqüências de EPC e ENC de cada grupo tratado com a CG1 foram comparadas com o grupo controle negativo ou positivo pelo teste qui-quadrado e foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

Toda análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSS (Statistical Package for Social Science) 20.0.0 para Macintosh (Apple Computers).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1)

A chalcona CG1 foi obtida através da reação de condensação de Claisen Schimidt, como mostra o Esquema 9 com alto rendimento (87%). O precipitado obtido foi recristalizado em metanol e foram obtidos cristais grandes e de coloração amarela como mostrado na Figura 26. A pureza da chalcona foi avaliada através da cromatografia em camada delgada, RMN <sup>1</sup>H, IV e seu ponto de fusão foi medido e então comparado com dados da literatura.



**Figura 26.** Cristais obtidos a partir da recristalização da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1).

Os dados relativos à caracterização físico-química da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona. foram os seguintes: p.f. (°C): 157–160; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO – d<sub>6</sub>, δppm): 7,78 (1H, #, H<sub>2</sub>); 8,30 (1H, d, *J*=8,0, H<sub>3</sub>); 8,30 (1H, d, *J*=8,0, H<sub>5</sub>); 7,78 (1H, #, H<sub>6</sub>); 7,85 (1H, d, *J*=16, H<sub>β</sub>); 7,67 (1H, d, *J*=16, H<sub>α</sub>); 8,03-8,06 (2H, m, H<sub>2</sub>' e H<sub>6</sub>'); 7,52-7,56 (2H, m, H<sub>3</sub>' e H<sub>5</sub>'); 7,61-7,65 (2H, m, H<sub>4</sub>'). (*J*= Hz; #: Sobreposição de sinais). IV (KBr) (cm<sup>-1</sup>): 1514/1336 (N-O), 1596 (C=C, C *sp*<sup>2</sup>), 1658 (C=O).

O ponto de fusão encontrado foi entre 157-160 °C, estando de acordo com o referenciado, 158-160 °C, pela base de dados de produtos da empresa Sigma-Aldrich® e por Silva *et al.* (2010) de 160-163°C. No espectro de Ressonância Magnética Nuclear (<sup>1</sup>H – RMN) fica evidenciada, além dos anéis aromáticos, a insaturação olefínica que deve se fazer presente em todas os compostos classificados como chalconas. Geralmente, os sinais dos prótons ligados aos carbonos *sp*<sup>2</sup> da insaturação olefínica ficam sobrepostos aos sinais de prótons aromáticos, como ocorre no espectro da chalcona sintetizada (Figura 27), onde os sinais referentes aos prótons olefínicos se situam na região de 7,67 ppm a 7,85 ppm, sobrepostos pelo sinal dos prótons aromáticos posicionados em *orto* com relação ao grupo

olefínico ligado ao anel. Outra contribuição do RMN, no caso das chalconas, é evidenciar a estereoquímica desses compostos, uma vez que a constante de acoplamento,  $J$ , entre os hidrogênios olefínicos ( $H\alpha$ - $H\beta$ ) estando situada na faixa de 15 – 16 Hz, indica a pureza geométrica do composto na configuração  $E$  (PAVIA, 2010). Observa-se também que o elevado deslocamento químico encontrado nos hidrogênios de anéis é devido ao grupo nitro que promove um efeito de desblindagem característico de substituintes que retiram elétrons.

Em relação ao espectro no IV pode-se verificar a presença de grupos funcionais característicos (Apêndice, Figura 39), como absorções de estiramento  $C=C$  ( $C, sp^2$ ) de anel aromático ocorrendo aproximadamente em  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Nota-se que a conjugação de uma ligação  $C=C$  a um grupo carbonila diminui as frequências de absorção, apresentando um estiramento  $C=O$  abaixo de  $1710\text{ cm}^{-1}$ . O grupo nitro possui estiramento forte em  $1514\text{ cm}^{-1}$  e também em  $1336\text{ cm}^{-1}$ .

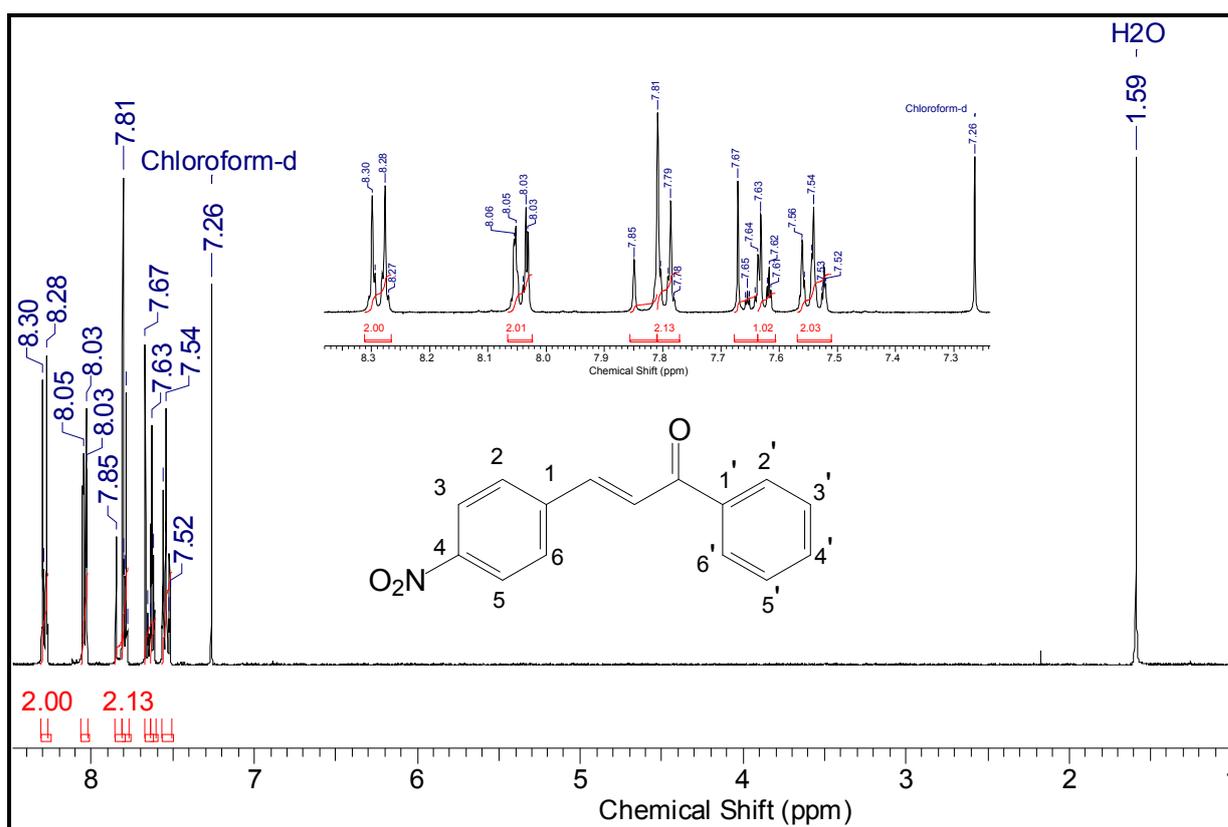


Figura 27. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) da CG1.

## 4.2. Avaliação da Atividade mutagênica e antimutagênica

### 4.2.1. Resultados antecedentes de atividade antitumoral *in vitro* da chalcona CG1

O interesse na avaliação mutagênica e antimutagênica da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona originou-se como base deste trabalho devido principalmente aos resultados relevantes obtidos por um *screening in vitro* da atividade antitumoral pelo teste MTT desse composto investigado conduzido por pesquisas anteriores (PÉREZ *et al.*, 2010, RAMALHO, 2011) realizadas na Universidade Estadual de Goiás em parceria com o Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

A análise de citotoxicidade pelo método MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do National Cancer Institute dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN, *et al.*, 1990). O método baseia-se na análise colorimétrica da conversão do sal (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio) em azul de formazan por enzimas metabolicamente ativas. A chalcona CG1 foi testada na concentração única de 5 µg/mL, através do método de MTT nas linhagens MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon) e SF-295 (sistema nervoso central). Os resultados das atividades citotóxicas reveladas por Pérez *et al.* (2010) estão expressos na Tabela 1, com seus respectivos desvios-padrão.

**Tabela 1.** Porcentagem de inibição da chalcona CG1 através do ensaio do MTT (Fonte: PÉREZ *et al.*, 2010).

Linhagem celular (média e desvio padrão)		
MDA-MB-435	HCT-8	SF-295
89,20% (± 0,10%)	<b>98,23%</b> (± 0,12%)	76,56% (± 9,93%)

Foi considerada relevante a inibição da proliferação da linhagem de células tumorais HCT-8 sendo maior que 90%, além disso, como este composto apresentou inibição  $\geq 75\%$  em pelo menos duas linhagens testadas, foi submetido a avaliações posteriores para a determinação da IC<sub>50</sub>, sendo acrescida a atividade contra linhagem de células tumorais HL-60 (leucemia) e teste de atividade hemolítica (RAMALHO, 2011). Os resultados de IC<sub>50</sub> são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores de IC<sub>50</sub> e intervalo de confiança de 95% em  $\mu\text{g/mL}$  da CG1 (Fonte: RAMALHO, 2011).

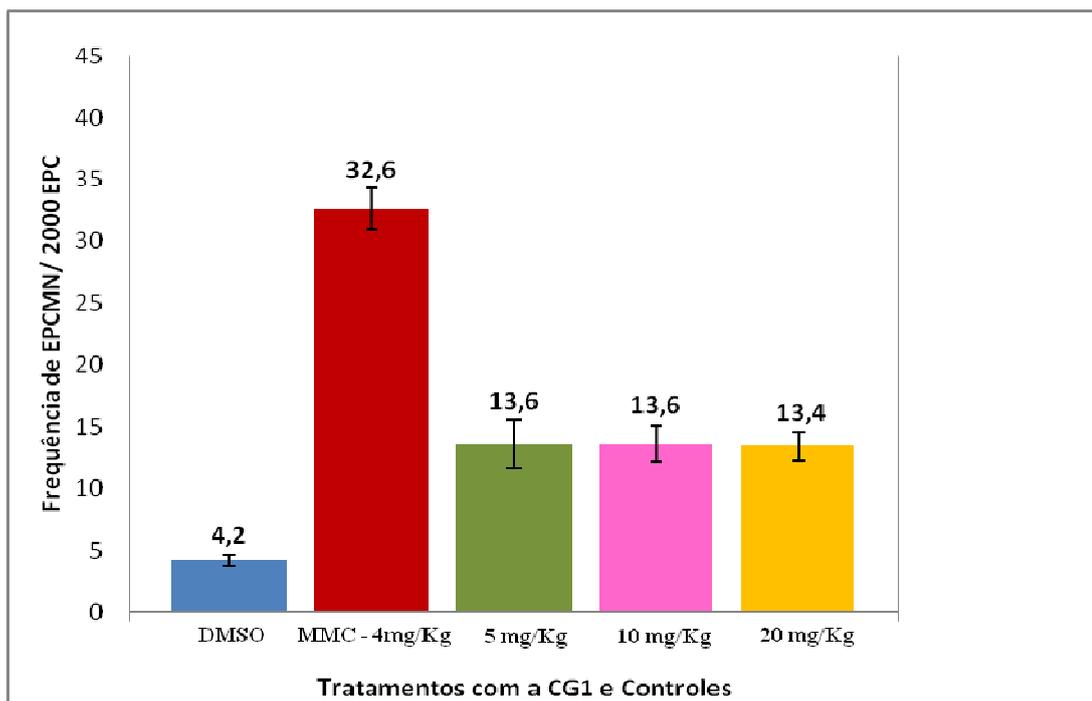
<b>Linhagem celular</b>			
<b>HCT-8</b>	<b>HL-60</b>	<b>MDA-MB-435</b>	<b>SF-295</b>
0,2821	0,7060	1,625	1,545
(0,13-0,59)	(0,59-0,84)	(1,14-2,23)	(1,28-1,85)

O composto CG1 revelou elevado potencial citotóxico, com IC<sub>50</sub> menor que 1  $\mu\text{g/mL}$ , não apresentando seletividade entre as linhagens testadas. No teste de atividade hemolítica o composto CG1 não causou danos diretos à membrana celular nas concentrações testadas de 50  $\mu\text{g/mL}$  (RAMALHO, 2011).

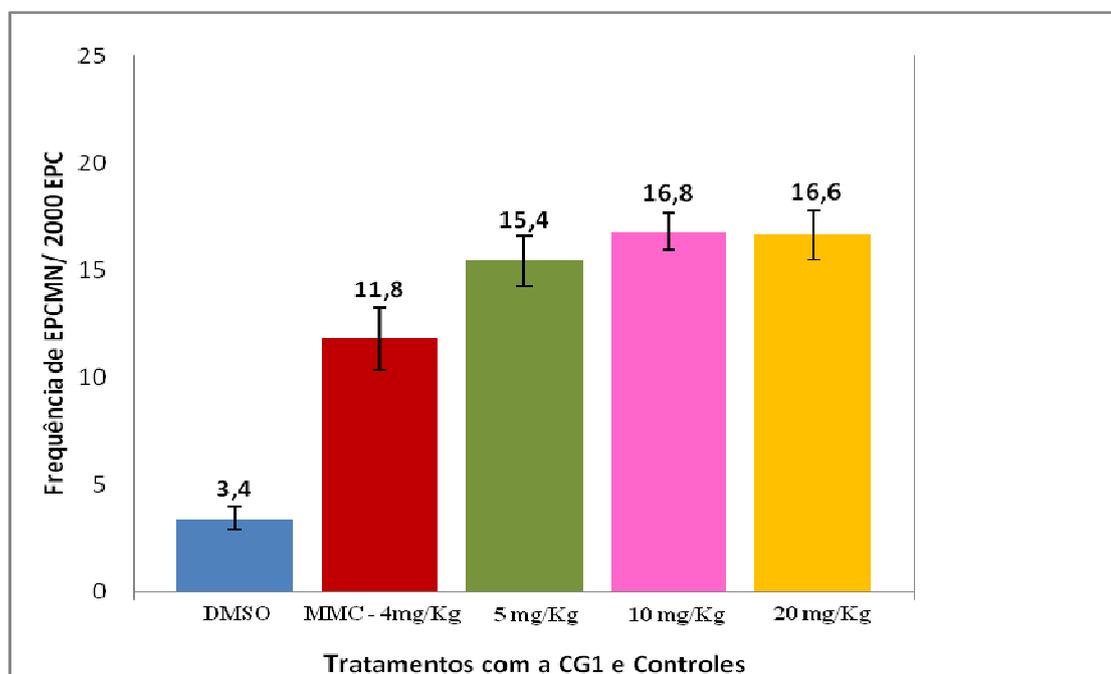
#### **4.2.2. Atividade mutagênica e citotóxica da CG1 pelo teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos *in vivo***

A análise de dados obtidos resultantes da frequência de EPCMN e da relação EPC/ENC em grupos experimentais submetidos a diferentes tratamentos com a chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona e aos controles positivo e negativo nos tempos de 24 horas e 48 horas estão apresentados nas Figuras 28, 29, 31 e 32 construídos a partir dos dados descritos na Tabela 3 (Apêndice) e os testes estatísticos podem ser observados nos Quadros 6-19 (Apêndices).

Para a avaliação da ação mutagênica do chalcona CG1 (Figuras 28 e 29), as frequências de EPCMN dos grupos, nos quais as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg p.c. foram administradas, tiveram suas médias comparadas com a frequência observada ao administrar somente o controle negativo em tratamentos de 24 horas e 48 horas.



**Figura 28.** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 24 horas de tratamento com a chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) e controles.



**Figura 29.** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 48 horas de tratamento com a chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) e controles.

Os tratamentos conduzidos em 24 horas revelaram uma média de 13,6; 13,6; 13,4 EPCMN/2000 EPC para as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg p.c respectivamente enquanto o controle negativo apresentou uma média de apenas 4,2 EPCMN/2000 EPC. O aumento de frequência observada de EPCMN nos tratamentos com a CG1 quando comparados ao controle negativo foram confirmadas por análise estatística (ANOVA) e assim constatou-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das doses administradas em relação ao DMSO (CN), confirmando, dessa forma, a existência de atividade mutagênica relevante do composto avaliado. A maioria das substâncias mutagênicas testadas apresentam perfis dose-dependente, onde o aumento da frequência de EPCMN relaciona-se como o aumento da dose administrada. Contudo, entre as doses de CG1 administradas não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

Quanto aos tratamentos conduzidos em 48 horas, observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de EPCMN para as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg p.c. com uma média de 15,4; 16,8 e 16,6, respectivamente, enquanto que para o controle negativo a média foi de 3,4, detectando assim que a CG1 também apresenta atividade mutagênica relevante. Ao comparar os gráficos representativos dos tratamentos e controles nas figuras 28 e 29, constatou-se que houve um pequeno aumento entre as médias de EPCMN quando os tratamentos ocorreram de 24 para 48 horas, contudo essa diferença detectada não foi significativa ( $p > 0,05$ ) e entre os valores de EPCMN observados para as doses de CG1 nos tratamentos de 48 horas também não foi constatada significância ( $p > 0,05$ ).

A atividade mutagênica conferida ao composto CG1 está possivelmente relacionada com a presença do grupo nitro como substituinte visto que este composto ao ser comparado com outra chalcona sem substituições revelou em estudo conduzido por Poirer & Weisburger (1974) ter potencial mutagênico e carcinogênico maior, podendo esta atividade ainda estar relacionada com o metabolismo redutor enzimático gerando intermediários nitrosos e N-hidroxilados (Figura 30) elevando assim seu potencial carcinogênico. E de acordo com Guengerich (1992), quanto aos possíveis intermediários N-hidroxilados, estes são muito reativos com grupos tióis presentes em proteínas e também podem ser acetilados tornando-se promotores de reações relacionadas com a formação de adutos no ADN, alterando-o e podendo gerar instabilidade cromossômica. A mutagenicidade apresentada mesmo que moderada também está de acordo com os resultados apresentados por Rashid *et al.* (1986) que observou que a CG1 foi mais mutagênica em bactérias *Salmonella typhimurium* do que outras 17 chalconas *p*-monossustituídas avaliadas.



**Figura 30.** Redução de compostos com grupo nitro por enzimas (Fonte: GUENGERICH, 1992).

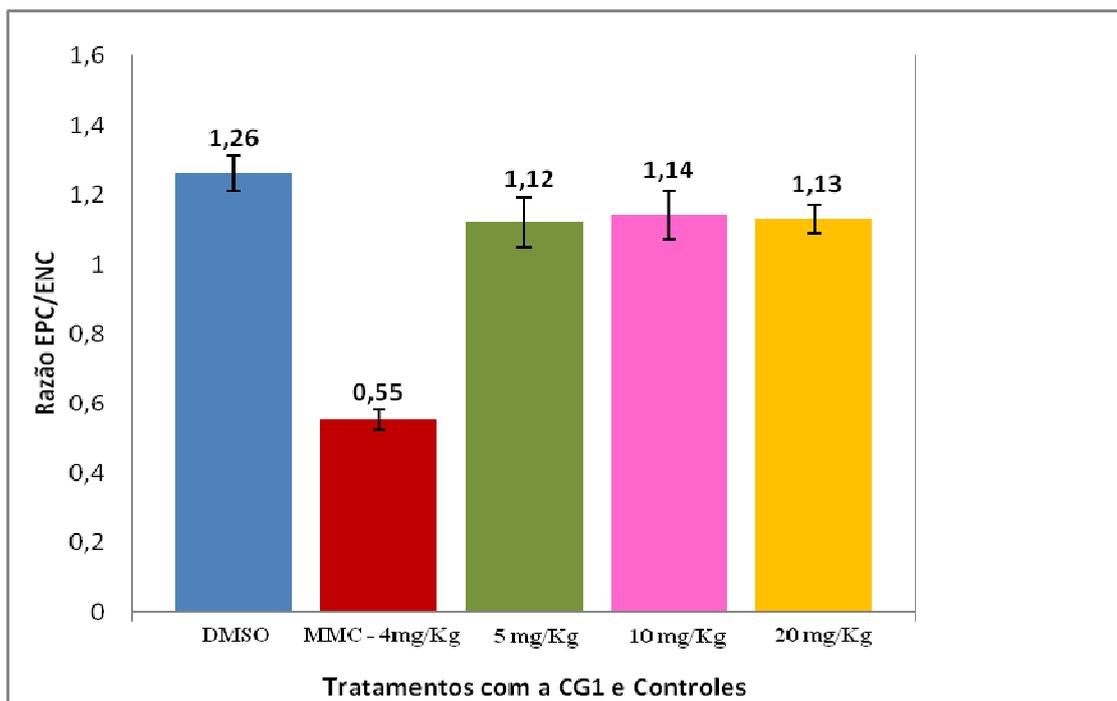
Muitos agentes mutagênicos são conhecidos por serem eletrófilos tornando-os bastante reativos com macromoléculas nucleofílicas como o ADN. Compostos com grupamentos nitro localizados em uma série de isômeros de chalconas nas posições meta, orto e para tiveram suas atividades mutagênicas avaliadas e constatou-se uma redução da atividade nos compostos *m*-monossustituídos devido a uma perda dos efeitos de ressonância - efeitos importantes para estabilizar o eletrófilo formado, e nos compostos *o*-monossustituídos devido à existência de efeitos estéricos desestabilizando o eletrófilo (MULLIN *et al.*, 1987).

Outro mecanismo pelo qual as chalconas podem exercer sua atividade mutagênica é através da formação de éóxidos que são considerados mais eletrofílicos do que a porção olefínica, pois as chalconas modificam a atividade das enzimas promotoras da metabolização de xenobióticos incluindo éóxido hidrolases (GANU & ALWORTH, 1978; MULLIN & HAMMOCK, 1982). Todavia, demonstrou-se que no caso da chalcona CG1, seu óxido, apresentado no Esquema 9, não é responsável pela atividade mutagênica, pois grupos retiradores de elétrons na posição *para* como o grupo nitro reduz fortemente a taxa de epoxidação enzimática, além do que a presença de grupos doadores de elétrons diminui a eletrofílicidade do éóxido formado (SATPATHY & NAYAK, 1976; CHANDA *et al.*, 1971).

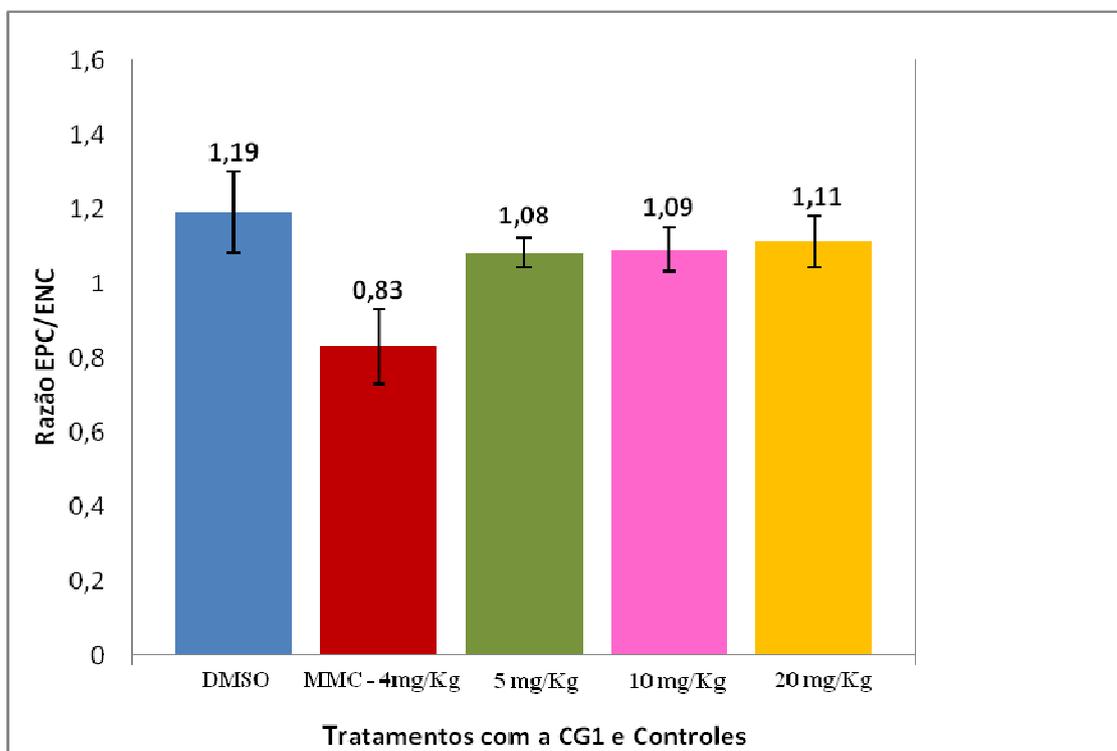


**Esquema 9.** Epoxidação de chalcona ao óxido.

A avaliação citotóxica foi determinada pelas razões de EPC/ ENC em grupos tratados e grupos controles. A significância estatística foi avaliada pelo teste qui-quadrado e considerados significativos com valores de ( $p < 0,05$ ) (Figuras 31 e 32).



**Figura 31.** Razão EPC/ENC após 24 horas de tratamento com a chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) e controles.



**Figura 32.** Razão EPC/ENC após 48 horas de tratamento com a chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) e controles.

As razões EPC/ENC observadas nos tratamentos de 24 horas ao serem administradas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg p.c. foram de 1,12; 1,14 e 1,13, respectivamente, e ao serem comparadas com a razão EPC/ENC do controle negativo que foi de 1,26 foi constatada diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Contudo, a partir da pequena diminuição das razões EPC/ENC, visualizadas nas figuras 31 e 32, infere-se que essa ação citotóxica apresentada é fraca. Já quanto aos tratamentos de 48 horas, as razões de EPC/ENC foram de 1,08; 1,09 e 1,11 para os grupos tratados com 5, 10 e 20 mg/Kg p.c da CG1, respectivamente, enquanto que a razão EPC/ENC apresentada pelo grupo negativo foi de 1,19. A aplicação pelo teste qui-quadrado mostrou que não apresentou diferença significativa entre as razões EPC/ENC dos grupos tratados em relação ao grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ), revelando que a CG1 não demonstrou ação citotóxica relevante quando administrada nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg e tempo de 48 horas.

A atividade citotóxica avaliada nos tratamentos de 24 horas quando administrada a CG1 nas dosagens propostas corroboram com estudos realizados por Vincenzo *et al.* (2001); Mousinho (2010); Cheng *et al.* (2008), nos quais foram observados atividades inibitórias de chalconas e análogos, inclusive da chalcona CG1, decorrentes de indução apoptótica em várias linhagens de células cancerígenas *in vivo* e *in vitro* devido a uma parada na fase G2/M do ciclo celular. A atividade anti-mitótica foi associada principalmente pela inibição da polimerização das tubulinas impedindo a formação do fuso mitótico. A dissociação dos microtúbulos, formados pela polimerização das tubulinas, inibe a divisão celular e eventualmente ocasiona a morte celular. Contudo, quando essa inibição associa-se a outras disfunções celulares como a relacionada a proteína p53 em decorrência de processos mutagênicos, a fuga da apoptose pelas células pode levar à formação de células aneuplóides ou micronucleadas (MANFREDI & HORWITZ, 1984; FUKASAWA, 2005; DECORDER *et al.*, 2008). De acordo com Eventi *et al.* (2009), a efetiva interação com tubulinas está relacionada com as estruturas das chalconas levando em conta seus substituintes, rigidez, solubilidade da molécula e conformação do anel A e anel B; assim, infere-se que o grupo nitro confere a chalcona uma interação moderada, visto que a citotoxicidade não foi tão pronunciada.

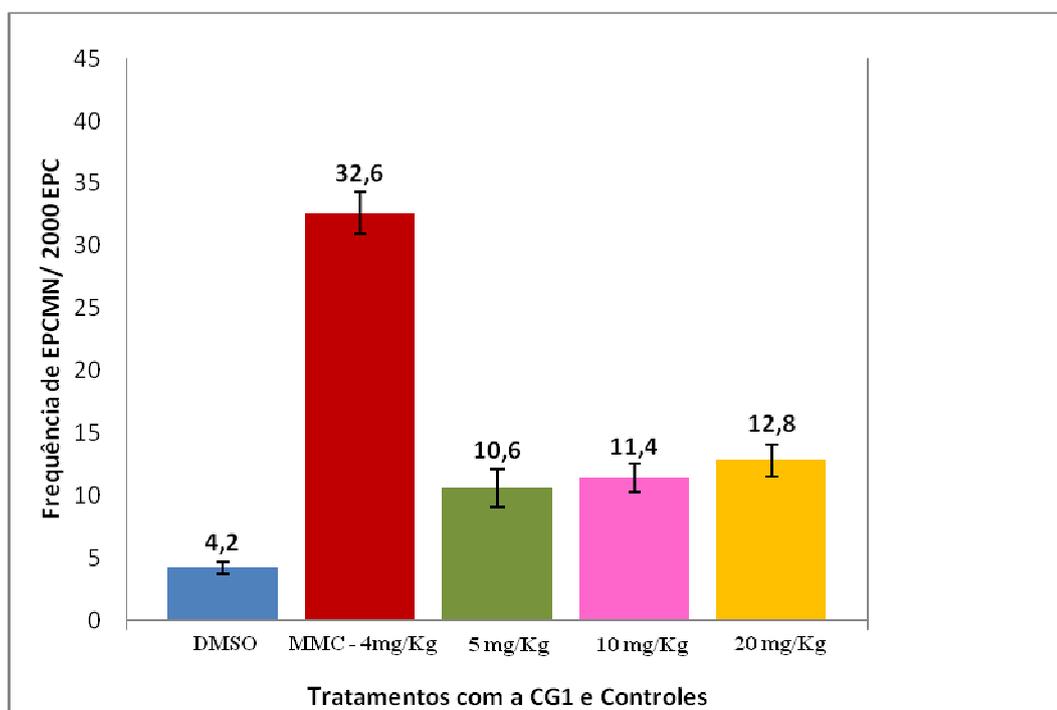
Nos tratamentos de 48 horas, não houve atividade antiproliferativa significativa da CG1, possivelmente devido a sua eliminação biológica promovida principalmente por enzimas detoxicantes como GSH transferases que apresentam como cofator a glutathiona

(GSH), a qual pode combinar-se com compostos como as chalconas por possuírem forte atração com grupos tióis, tornando-as facilmente eliminadas pela bile, urina ou fezes.

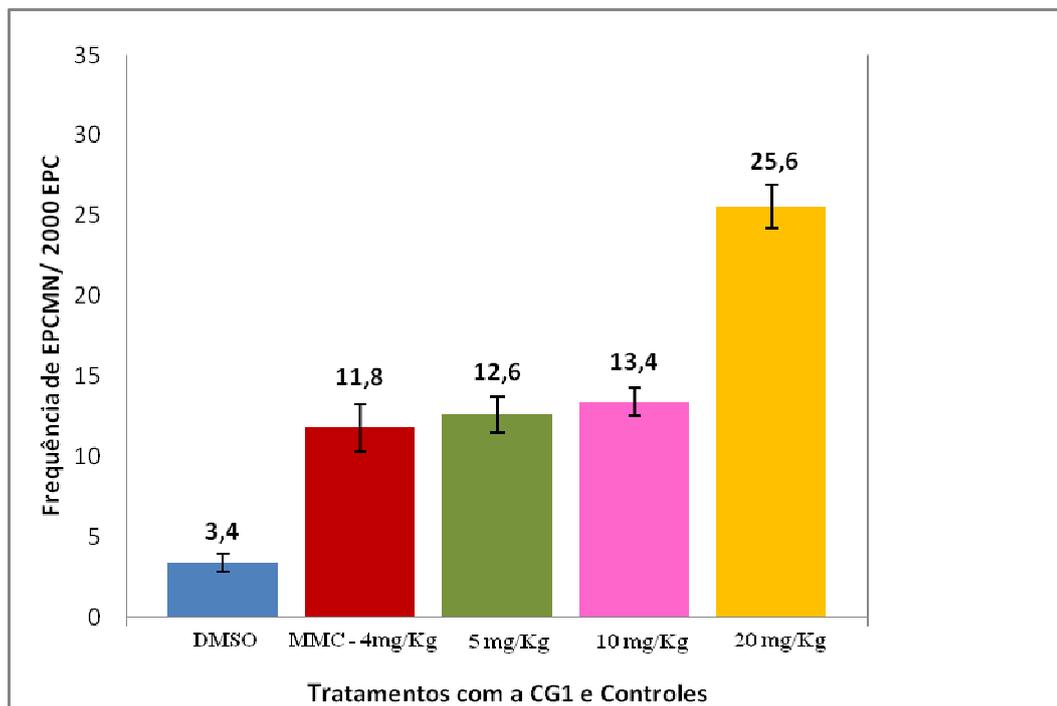
#### 4.2.3. Atividade antimutagênica e anticitotóxica da CG1 pelo teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos *in vivo*

Nas Figuras 33, 34, 36 e 37, apresenta-se a análise de dados resultantes da frequência de EPCMN e da relação EPC/ENC em grupos experimentais submetidos a diferentes tratamentos com a administração concomitantemente da chalcona CG1 e da MMC e dos controles positivo e negativo nos tempos de 24 horas e 48 horas. Os gráficos representam dados também contidos na Tabela 4 (Apêndice) e os testes estatísticos podem ser observados nos Quadros 20-33 (Apêndices).

Partindo do mesmo princípio utilizado para a avaliação mutagênica, para análise da ação antimutagênica da chalcona CG1 foram comparadas as frequências de EPCMN dos grupos tratados com as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg p.c. co-tratados com 4 mg/Kg de MMC com frequências de EPCMN obtidas quando somente o controle positivo foi aplicado em tratamentos de 24 horas e 48 horas.



**Figura 33.** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 24 horas de tratamento com a chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) concomitantemente com MMC e controles.

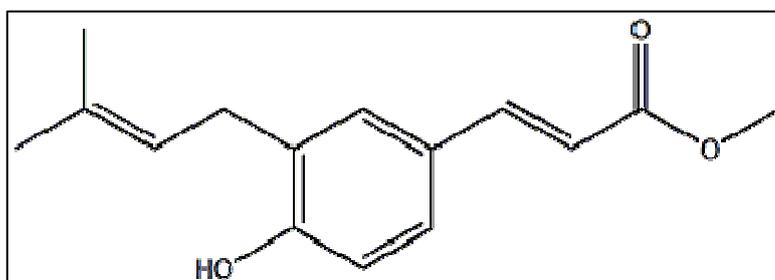


**Figura 34.** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 48 horas de tratamento com a chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) concomitantemente com MMC e controles.

Os tratamentos conduzidos em 24 horas revelaram uma média de 10,6; 11,4 e 12,8 EPCMN/2000 EPC para as doses de 5, 10 e 20 mg/ Kg p.c co-tratados com 4 mg/Kg p.c. de MMC, respectivamente, enquanto o controle positivo apresentou uma média de 32,6 EPCMN/2000 EPC. A redução relevante de EPCMN observada na figura 33 dos três tratamentos com a CG1 e MMC quando comparados ao controle positivo foram aplicados por análise estatística (ANOVA) e assim constatou-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ), confirmando, assim a ação antimutagênica relevante da CG1. A comparação entre os co-tratamentos não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, quanto aos tratamentos conduzidos em 48 horas, não se observou uma redução significativa ( $p > 0,05$ ) na frequência de EPCMN para as doses de 5 e 10 mg/Kg p.c. co-tratadas com 4 mg/Kg p.c. de MMC com uma média de 12,6 e 13,4 respectivamente, em relação à média apresentada pela administração do controle positivo de 11,8. Para a dose de 20 mg/Kg de CG1 e mitomicina C em 48 horas, constatou-se uma ação aumentada de frequência de EPCMN em relação ao grupo controle positivo ( $p < 0,05$ ). Portanto, para o tempo de 48 horas, a chalcona CG1 potencializou a ação da MMC. Ao comparar os gráficos representativos dos tratamentos e

controles nas figuras 33 e 34 observa-se melhor o quanto é discordante as médias de EPCMN dos tratamentos em relação ao controle positivo em 24 horas enquanto há certa homogeneidade dessa relação quando o tratamento prolonga-se para 48 horas quando as doses administradas foram de 5 e 10 mg/Kg de CG1. Somente entre os valores de EPCMN observados para os grupos co-tratados com doses de 5 e 10 mg/Kg de CG1 e 4 mg/ Kg de MMC em relação a dose de 20 mg/Kg de CG1 nos tratamentos de 48 horas foi constatada diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

A mitomicina C (MMC), protótipo de droga anticâncer, requer metabolismo de redução enzimática (Esquema 3) para produzir intermediários que se ligam irreversivelmente ao ADN provocando danos através da alquilação mono- e bifuncional de resíduos de guanina (WALLAU *et al.*, 2005; EVENTI *et al.*, 2009). Em referência a estudos já conduzidos por EVENTI *et al.* (2009), nos quais constatou-se considerável redução do potencial clastogênico da MMC em células sanguíneas e linfócitos pela administração da plicatina B (chalcona apresentada na Figura 35), sugere-se, então que um dos efeitos pelo qual o efeito antimutagênico e anticitotóxico da CG1 possa ocorrer seria afetando o modelo de redução metabólico da MMC inibindo a NADPH citocromo P-450 redutase, enzima que catalisa via redução por adição de um elétron.

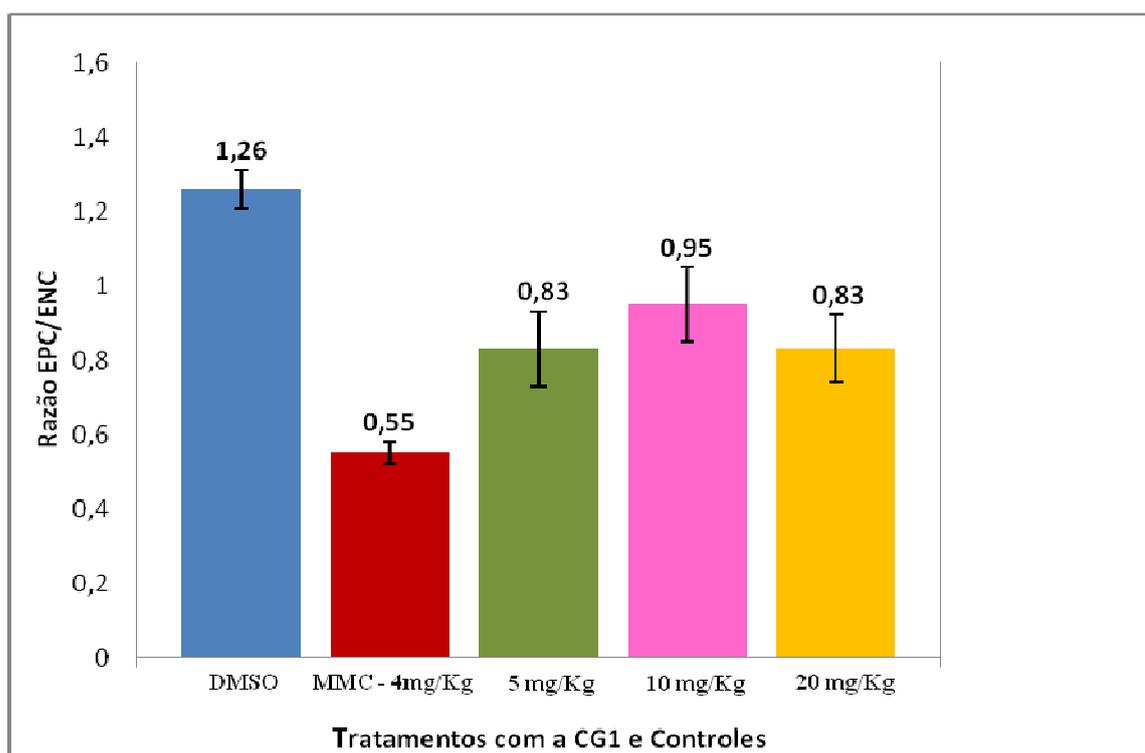


**Figura 35.** Estrutura da plicatina B.

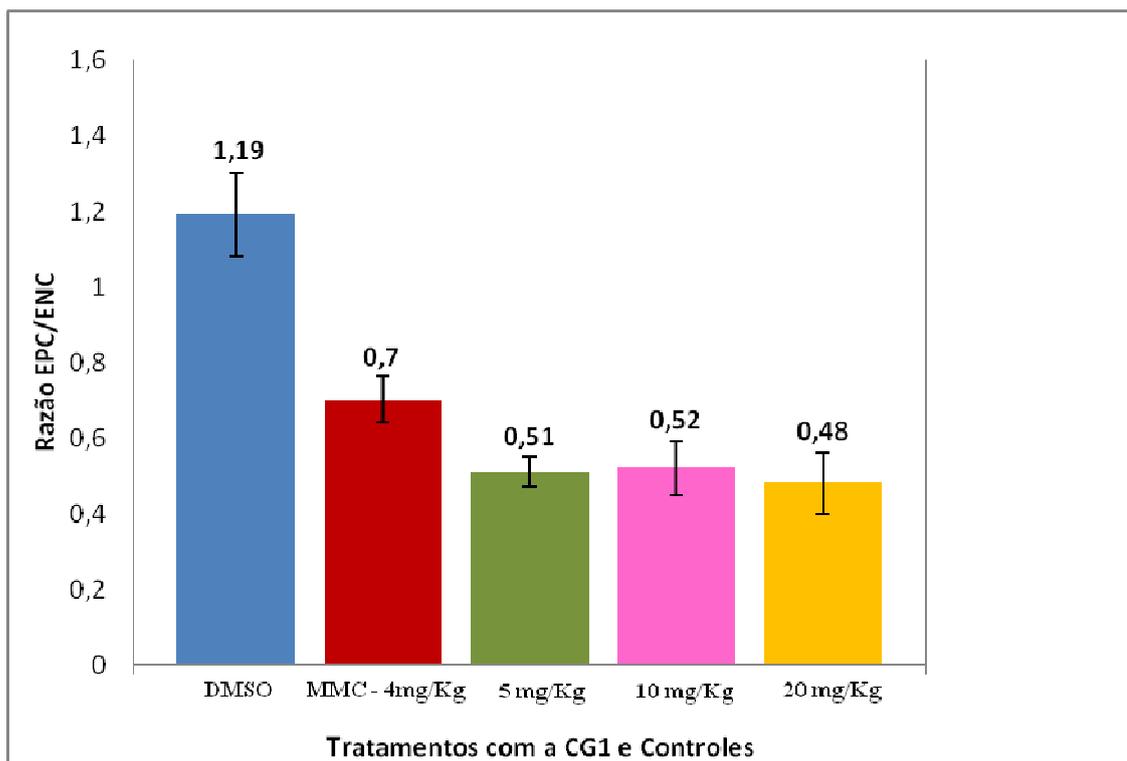
O aumento significativo de EPCMN na dose de 20 mg/Kg no tratamento de 48 horas pode indicar que maiores doses de CG1, ao serem administradas junto com a MMC em maiores tempos de exposição *in vivo*, possibilitam que a porção de CG1 presente no organismo ainda que seja insuficiente para viabilizar a inibição de enzimas do sistema metabólico redutor que ativam os intermediários genotóxicos da mitomicina C (MMC), seja capaz de promover uma sensibilização celular a estes agentes alquilantes, pois a CG1, assim como outras chalconas, é susceptível a adição de Michael na porção ene-ona ( $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$ ), o que pode promover a ligação desta com receptores particulares como as enzimas da fase II,

enzimas promotoras da conjugação de xenobióticos (por exemplo, MMC) com ligantes endógenos, como a glutathiona que possui o grupo tiol (ZI & SIMONEAU, 2005; HUBBER & ALMEIDA, 2008). Observa-se então, que nos tratamentos de 48 horas provavelmente houve uma sensibilização celular provocada pela inibição do sistema de detoxificação de xenobióticos principalmente pela diminuição do nível de glutathiona disponível devido a favorável conjugação desta com a CG1, acentuando os efeitos mutagênicos e citotóxicos da mitomicina C.

A avaliação anticitotóxica foi determinada ao se comparar, pelo teste qui-quadrado com significância estatística ( $p < 0,05$ ), as razões de EPC/ ENC, quando administradas as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg p.c. de CG1 co-tratadas com 4 mg/Kg p.c. em relação a razões de EPC/ ENC referentes ao controle positivo nos tempos de exposição de 24 e 48 horas (Figuras 36 e 37).



**Figura 36.** Razão EPC/ENC após 24 horas de tratamento com a chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) concomitantemente com MMC e controles.



**Figura 37.** Razão EPC/ENC após 48 horas de tratamento com a chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) concomitantemente com MMC e controles.

As razões EPC/ENC observadas nos tratamentos de 24 horas ao serem administradas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg p.c. co-tratadas com 4 mg/Kg p.c. de MMC foram de 0,83; 0,95 e 0,83, respectivamente, e ao serem comparadas com a razão EPC/ENC do controle positivo que foi de 0,55 foi constatada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) determinando a ação anticitotóxica também da CG1. Todavia, em relação aos tratamentos de 48 horas, as razões de EPC/ENC foram de 0,51; 0,52 e 0,48 para os grupos co-tratados com 5, 10 e 20 mg/Kg p.c. de CG1 e 4 mg/Kg p.c. de MMC, respectivamente, enquanto que a razão EPC/ENC apresentada pelo controle positivo foi de 0,70. A aplicação pelo teste qui-quadrado mostrou que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as razões demonstradas, contudo devido a uma redução das razões relativas aos tratamentos, aponta-se que a CG1 não demonstra ação anticitotóxica quando co-administrada com a mitomicina C pelo tempo de exposição de 48 horas, mas promove maior nível de citotoxicidade.

Pela ação antimutagênica e anticitotóxica da CG1 ter sido demonstrada em tratamento simultâneo com a MMC (agente mutagênico), sugere-se que esta possa atuar como um agente do tipo desmutagênico (ANTUNES & ARAÚJO, 2000). Além disso, a exemplo de diversos compostos antimutagênicos encontrados nos alimentos atuantes como antioxidantes, a CG1

pode exercer sua atividade anticitotóxica sequestrando radicais livres induzidos pela administração da MMC.

A chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona por ter apresentado tanto efeito mutagênico quanto antimutagênico possivelmente integra um grupo de substâncias químicas chamadas de carcinógenos e mutágenos Janus, nome dado em referência ao deus romano Janus por ser descrito como tendo uma cabeça com duas faces, uma olhando para frente e outra olhando para trás. Muitas substâncias consideradas antimutagênicas tem também demonstrado serem pró-carcinogênica ou carcinogênica, sendo a natureza bifásica de muitas delas relatadas por modularem a mutagenicidade ou carcinogenicidade de aminas heterocíclicas. A maioria desse grupo de compostos moduladores são produtos biossintetizados por plantas, da qual fazem parte as chalconas (BHATTACHARYA, 2011; TOGORIE *et al.*, 1983).

## 5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi investigado o potencial mutagênico, antimutagênico, citotóxico e anticitotóxico da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) pelo teste de micronúcleo em médula óssea de camundongos *in vivo*. Com base nos dados obtidos, concluiu-se que:

- A chalcona CG1 apresentou atividade mutagênica nas doses de 5, 10 e 20 mg/ Kg p.c. tanto nos tratamentos de 24 horas como de 48 horas, contudo a atividade citotóxica, ainda que moderada, só foi observada nos tratamentos de 24 horas.

- Quanto a avaliação antimutagênica e anticitotóxica, a chalcona CG1 confirmou atividade antimutagênica e anticitotóxica nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg p.c. co-administradas com 4 mg/Kg p.c. de MMC apenas nos tratamentos de 24 horas. E observou-se que no tratamento de 48 horas com a dose de 20 mg/Kg p.c. co-administrada com 4 mg/Kg p.c. de MMC, a CG1 potencializou a atividade mutagênica, possivelmente, induzindo um mecanismo de quimiossensibilização celular. A atividade citotóxica também foi acentuada nas doses de 5, 10 e 20 mg/ Kg p.c. co-administradas com 4 mg/Kg p.c. de MMC nos tratamentos de 48 horas.

- Os resultados da dupla atividade mutagênica e antimutagênica demonstrados pela chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) podem fornecer subsídios para uma possível utilização do composto como possibilidade terapêutica contra o câncer.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V.L., LEITÃO, A., REINA, L.C.B., MONTANARI, C.A., DONNICI, C.L. “Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o ADN: uma introdução.” *Química Nova*, v. 28, n.1, p. 118-129, 2005.

ANTUNES, L. M. G., ARAUJO, M. C. P. “Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos.” *Rev. Nutr.*, v.13, n.2, pp. 81-88, 2000.

BAMIAS, A., DIMOPOULOS, M. A., “Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy”. *European Journal of Internal Medicine*, v. 14, n. 8, p. 459-469, 2003.

BARREIRO, E. J., BOLZANI, V. S., “Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos”. *Revista Química Nova*, v. 32, n. 3, São Paulo, 2009.

BHAGAT, Srikant *et al.*, “LiOH.H<sub>2</sub>O as a novel dual activation catalyst for highly efficient and easy synthesis of 1,3-diaryl-2-propenones by Claisen-Schmidt condensation under mild conditions”. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.244, p. 20-24, 2006.

BHASKAR, M.V. *et al.*, “Design, synthesis, and biological evaluation of Mannich bases of heterocyclic chalcone analogs as cytotoxic agents”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n.8, p. 7358-7370, 2008.

BHATTACHARYA, S. “Natural Antimutagens: a review.” *Research Journal of Medicinal Plant*, v. 5, p. 116-126, 2011.

BIAGLOW, J.E., VARNES, M.E., EPP, E.R., CLARK, E.P., ASTOR, M. “Factors involved in depletion of glutathione from A549 human lung carcinoma cells: implications for radiotherapy”. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v.10, p. 1221–1227, 1984.

BITENCOURT, H. R.; SANTOS, L. S.; SOUZA FILHO, A.P.S, “Atividade alelopática de chalcona sintética, de seus precursores e de cetonas e aldeídos relacionados”. *Planta Daninha*, v. 25, n.4, p. 747-753, 2007.

BORST, P., EVERS, R., KOOL, M., WIJNHOLDS, J. “A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins.” *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 92, p. 1295-1302, 2000.

BRUCE, W. R., MEEKER, B. E., POWERS, W. E., VALERIOTE, F. A. “Comparison of the Dose- and Time-Survival Curves for Normal Hematopoietic and Lymphoma Colony-Forming Cells Exposed to Vinblastine, Vincristine, Arabinosylcytosine and Amethopterin”. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 42, p. 1015-1023, 1969

CABRERA, M. *et al.*, “Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 3356-3367, 2007.

CABRERA, M., LAVAGGI, M.L., CROCE, F., CELANO, L., THOMSON, L., FERNÁNDEZ, M., PINTOS, C., RAYMONDO, S., BOLLATI, M., MONGE, A., CERÁIN, A.L., PIRO, O.E., CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M.”Identification of chalcones as *in vivo*

liver monofunctional phase II enzymes inducers.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 5391-5399, 2010.

CAIRNS, J. “The origin of human cancers”. *Nature*, v. 289, p. 353 - 357 1981.

CALIXTO, João B., “Biodiversidade como fonte de medicamentos”. *Ciência e Cultura*, v. 55, N. 3, São Paulo, 2003.

CAMPOS, M. de Moura. *Química Orgânica*, v. 3, ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p. 983-992, 1976-1979.

CARDOSO, R. M., BARRÈRE, A. P. N., TROVÃO, F. C. S. “Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde.”. Einstein: *Educ Contin Saúde*, v. 7, pt 2, p. 106-109, 2009.

CARNEY, D., HUANG, P., PELICANO, H. “ROS: stress in câncer cell and therapeutic implications.” *Drug Resistance Updates*, v. 7, n. 2, p. 97-110, 2004.

CARRARD, V.C., COSTA, C.H., FERREIRA, L.A., LAUXEN, I.S., RADOS, P.V. “Teste de micronúcleos – Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal.” *R. Fac. Odontol. Porto Alegre*, v. 48, n. 1/3, p. 77-78, 2007.

CASTELLI, V. V. A., CORT, A. D., MANDOLINI, L., PINTO, V., SCHIAFFINO, L. “A kinetic study of the conjugate addition of benzenethiol to cyclic enones catalyzed by a nonsymmetrical uranyl-salophen complex”. *J Org Chem*, v. 72, n. 14, p. 5383-5386, 2007.

CESARIN-SOBRINHO, D., NETTO-FERREIRA, J.C., “Efeito da Substituição por Átomos de Flúor no Equilíbrio Conformacional de Chalcona”, *Revista Química Nova*, v. 24, n. 5, São Paulo, 2001.

CHANDA, B.K., KAR, J.N., BEHERA, G.B., ROUT, M.K. “Kinetics of ring opening of epoxides”. *J. Indian Chem. Soc.*, v. 48, p. 867–871, 1971.

CHENG, J.H., HUNG, C.F., YANG, S.C., WANG, J.P., WON, S.J., LIN, C.N. “Synthesis and cytotoxic, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities of 2',5'-dialkoxylchalcones as cancer chemopreventive agents.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p.7270-7276, 2008.

CHOY, W. N. “Regulatory genetic toxicology tests.” In: *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment* (Choy, W. N. ed.), Marcel Dekker, Inc, New York, p. 93-113, 2001.

COLE, S.P., DEELEY, R.G. “ Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1.” *Pharmacological Sciences*, v. 27, n. 8, p. 438-446, 2006.

COOK, N.C., SAMMAN, S., “Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources”, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

CORDEIRO, M. “*O segredo da imortalidade*”. *Revista Ciência Hoje*, edição 294, 2011.

COZZI, PAULO, “The discovery of a new potential anticancer drug: a case history”, *II Farmaco*, v. 58, n. 4, p. 213-220, 2003.

DECORDIER, I., CUNDARI, E., KIRSCH-VOLDERS, M. "Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploidy cells: Crosstalk between ploidy control and apoptosis." *Mutat. Res.*, v. 651, p. 30-39, 2008.

DE FLORA, S., RAMEL, C. "Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis." *Mutation Research*, v.202, n.2, p.285-306, 1988.

DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., "Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos", *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 1, p. 33-40, Curitiba, 2004.

DE VICENZO, R., FERLINI, C., DISTEFANO, M., GAGGINI, C., RIVA, A., BOMBARDELLI, E., MORAZZONI, P., VALENTI, P., BELLUTI, F., RANELLETTI, F. O., MANCUSO, S., SCAMBIA, G. "In vitro evaluation of newly developed chalcone analogues in human cancer cells." *Cancer Chem. Pharmacol.*, v. 46, p. 305-312, 2000.

DE VICENZO, R., SCAMBIA, G., BENEDETTI, P. P., RANELLETTI, F.O., BONANNO, G., ERCOLI, A., MONACHE, F.D., FERRARI, F., PIANTELLI, M., MANCUSO, S. "Effect of synthetic and naturally occurring chalcones on ovarian cancer cell growth: structure-activity relationships." *Anticancer Drug Des.*, v. 10, p. 481, 1995.

DEVITA, V.T., LAWRENCE, T.S., ROSENBERG, S.A. *Cancer: principles & practice of oncology*. Philadelphia, USA. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 8 Ed., p. 3200, 2008.

DIMMOCK, J. R.; KANDEPU, N. M.; HETHERINGTON, M.; QUAIL, J. W.; PUGAZHENTHI, U.; SUDOM, A. M.; CHAMANKHAH, M.; ROSE, P.; PASS, E.; ALLEN, T. M.; HALLERAN, S.; SZYDLOWSKI, J.; MUTUS, B.; TANNOUS, M.; MANAVATHU, E. K.; MYERS, T. G.; CLERCQ, E. D.; BALZARINI, J. "Citotoxic Activities of Mannich bases of Chalcones and Related Compounds". *J. Med. Chem.* 41, 1014-1026, 1998.

DONG, Fang *et al.*, "Synthesis of chalcones via Claisen-Schmidt condensation reaction catalyzed by acyclic acidic ionic liquids", *Catalysis Communications* 9, p. 1924-1927, 2008.

DYKE, T.A.V., SAMULSKI, T.D., SONG, Y. *Cancer: a conceptual framework. Cancer: principles & practice of oncology*. Philadelphia, USA. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 8 ed., p. 3-12, 2008.

DURSE, L., MIMNAUGH, E.G., MYERS, C.E., SINHA, B.K. "Potentiation of doxorubicin cytotoxicity by buthionine sulfoximine in multidrug-resistant human breast tumor cells". *Cancer Research*, v. 49, p. 511-515, 1989.

ECHEVERRIA, C. *et al.*, "Structural Antitumoral Activity Relationships of Synthetic Chalcones", *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, p. 221-231, 2009.

EDENHARDER, R., PETERSDORFF, I V., RAUSCHER, R. "Antimutagenic effects of flavonoids, chalconas and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food". *Mutation Research*, v. 287, p. 261-274, 1993.

EDENHARDER, R., RAUSCHER, R., and PLATT, KL. “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.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (Org.). *Genética Toxicológica*. 1 ed. Porto Alegre: Alcance, 2003.

EVENTI, A., LUBRANO, V., SCARPATO, R., TURCHI, G. “Protective effects of plicatin B on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by different mutagens.” *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 124-128, 2009.

FARMER, P.B. “Monitoring for human exposure to carcinogens”. *Chem. Brit.*, v.18, p. 790–794, 1982.

FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S. “The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans.” *Mutation Research*, v. 428, n.1-2, p. 271-283, 1999.

FENECH, M. “Chromosomal Biomarkers of Genomic Instability Relevant to Cancer.” *Drug Discov. Today*, v. 7, n. 22, p. 1128-1137, 2002.

FENECH, M. “*In vitro* micronucleus technique to predict chemosensitivity.” *Methods in Molecular Medicine*, v. 111, p. 3-32, 2005.

FERGUSON, L.R. “Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet.” *Mutat. Res.*, v. 307, p. 395-410, 1994.

FERREIRA, C.G., ROCHA, J.C. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Ed. Atheneu. 1ª Reimpressão da 1ª Edição, p. 470, 2004.

FERREIRA, G.M.V., *Introdução de alimentos funcionais na gastronomia*, 2005, Monografia de Especialização, UnB, Brasília, Brasil.

FONSECA, SELMA MONTASA DA *et al.* *Manual de quimioterapia antineoplásica*. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso, 2000.

FUKASAWA, K. “Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development.” *Cancer Lett.*, v. 230, n. 1, p. 6-19, 2005.

GANU, V.S., ALWORTH, W.L. “Epoxide hydrase: Structure-activity relationships of *in vitro* stimulators of the microsomal activity”. *Biochemistry*, v. 17, p. 2876–2881, 1978.

GARAJ-VRHOVAC, V., ZELJEZIC, D. “Assesment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay.” *J. Appl. Toxicol.*, v. 22, p. 255, 2002.

GASSUL, E.I. *et al.*, “A theoretical and experimental study of the formation mechanism of 4-X-chalcones by the Claisen–Schmidt reaction”, *Journal of Molecular Structure*, v. 503, n. 3, p. 131-144, 2000.

GOLDIE, J.H. “Drug resistance in cancer: A perspective.” *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 20, p. 63–68, 2001.

GOODMAN; GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Editora Mcgraw–Hill, 2006.

GREEN, J.A., VISTICA, D.T., YOUNG, R.C., HAMILTON, T.C., ROGAN, A.M., OZOLS, R.F. “Potentiation of melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines by glutathione depletion”. *Cancer Res.*, v. 44 p. 5427-5431, 1984.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. *Introdução à genética*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 856 p.

GUENGERICH, P.F. “Metabolic activation of carcinogens”. *Pharm. Ther.*, v. 54, p. 17-61, 1992.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press ,2007.

HAMMOND C. L., LEE, T. K., BALLATORI, N. “Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes”. *Journal of Hepatology*, v. 34, p. 946-954, 2001.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; KIRSCH-VOLDERS, M., OLESON JÚNIOR, F. B.; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. “*In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay.” *Mutation Research*, v. 312, p. 293-304, 1994.

HEDDLE, J. A. “A rapid *in vivo* test for chromosomal damage”. *Mutation Research*, v. 18, p. 187-190, 1973.

HEDDLE, J.A., SALAMOSE, M.F. “The micronucleus assay *in vivo*. In: “Proceedings of the international Workshop on Short-Term Tests for chemical carcinogens.” *Springer-Verlag*, p. 243-249, 1981.

HEIM, E. K., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J., “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships”. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HELLEDAY, T., PETERMANN, E., LUNDIN, C., HODGSON, B., SHARMA, R. A. “DNA repair pathways as targets for cancer therapy.” *Nature Rev.*, v. 8, p. 193-204, 2008.

HLAVIN, E. M., SMEATON, M. B., MILLER, P. S. “Initiation of DNA interstrand cross-link repair in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutag.*, v. 51, p. 604-624, 2010.

HOOIJBERG, J.H., DE VRIES, N.A., KASPERS, G.J.L., PIETERS, R., JANSEN, G., PETERS, G.J. “Multidrug resistance proteins and folate supplementation: therapeutic implications for antifolates and other classes of drugs in cancer treatment.” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, v. 58, p. 1–12, 2006.

HUBER, P.C., ALMEIDA, W.P. “*Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos.*” *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

IARC – Cancer: Causes, occurrence and control. Tomatis, L. (Ed.) *Iarc Scientific Publications*, Lyon, v. 100, 1990.

ICPEMC: Committee 1 Final Report: Screening strategy for chemicals that are potential germ-cell mutagens in mammals. *Mutation Research*, v. 114, p. 117-177.

INCA. “Human Carcinogens So Far Identified”. *Câncer Science*, v. 80, n.9, 795–807, 1989.

INCA. Ruddon W. R. *Cancer Biology*. 4th Ed. New York: Oxford University Press, 2007.

INCA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro : Inca, 2011. 118 p.

ISHIKAWA, T., BAO, J.J., YAMANE, Y., AKIMARU, K., FRINDRICH, K., WRIGHT, C.D., KUO, M.T. “Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells.” *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 25, p. 14981-14988, 1996.

JÚNIOR, L. R.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L. T. “Sistema Antioxidante Envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutathione Associado a Métodos Eletroanalíticos na Avaliação do Estresse Oxidativo”. *Quím. Nova*. 24, 112-119, 2001.

KANDEPU, N.M. “Mannich bases of chalcones and cyclohexanones as candidate cytotoxic agents.” 1999. Tese (Doutorado de filosofia em farmácia). Universidade Saskatchewan. Canadá, 1999.

KACHADOURIAN, R., DAY, B. J., PUGAZHENTI, S., FRANKLIN, C. C., GENOUX-BASTIDE, E., MAHAFFEY, G., GAUTHIER, C., PIETRO, A. D., BOUMENDJEL, A. “A synthetic chalcone as a potent inducer of glutathione biosynthesis.” *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, p. 1382-1388, 2012.

KADA, T., MORITA, K., INOUE, T. “Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate.” *Mutation Research*, v.53, n.3, p.351-353, 1978.

KIRSCH-VOLDERS, M., SOFUNI, T., AARDEMA, M., ALBERTINI, S., EASTMOND, D., FENECH, M., ISHIDATE, M. JR., KIRCHNER, S., LORGE, E., MORITA, T., NORPPA, H., SURRALLÉS, J., VANHAUWAERT, A., WAKATA, A. “Report from the *in vitro* micronucleus assay working group”. *Mutat Res.*, v. 540, p.153-63, 2003.

KRAMER, R.A., GREENE, K., AHMAD, A., VISTICA, D.T. “Chemosensitization of l-phenylalanine mustard by the thiol-modulating agent buthionine sulfoximine”. *Cancer Res.*, v. 47, p. 1593–1597, 1987.

KRISHNA, R., MAYER, L.D. "Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs." *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 11, p. 265-283, 2000.

KUO, M.T., BAO, J., FURUICHI, M., YAMANE, Y., GOMI, A., SAVARAJ, N., MASUZAWA, T., ISHIKAWA, T. "Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues." *Biochem. Pharmacol.*, v. 55, n.5, p. 605-615, 1998.

LAHTCHEV, K.L. *et al.*, "Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains". *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 10, p. 2220-2228, 2008.

LAUTIER, D., CANITROT, Y., DEELEY, R.G., COLE, S.P. "Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene." *Biochem. Pharmacol.*, v.52, p. 967-977, 1996.

LAWRENCE, N. J. *et al.*, "Effects of  $\alpha$ -substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, n. , p. 5844-5848, 2006.

LEHNIGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; "Princípios da Bioquímica". 2. ed. São Paulo: SARVIER, 1995.

LENGLET, G., CORDONNIER, D. "DNA-destabilizing agents as an alternative approach for targeting DNA: mechanisms of action and cellular consequences". *J. Nucleic Acids*, 2010.

LEWIN, B. "GENES VII". Tradução de Henrique Bulselmeyer Ferreira e Giancarlo Pasquali. Porto Alegre: Artmed, 2001. 955p.

LOUREIRO, A.P.M., MASCIO, P., MEDEIROS, M.H.G. "Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese." *Química Nova*, v. 25, n. 5, 2002.

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. "Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes." *Mutation Research*, v. 189, p. 103-112, 1987.

MACHADO, H. *et al.*, "Flavonóides e seu potencial terapêutico", *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, UFJF*, v.26, n. único, p. 37, 2009.

MALLIKARJUN, K. G., "Antiviral activity of substituted chalcones and their respective Cu (ii), Ni (ii) and Zn (ii) complexes" *Journal of Chemistry*, v. 2, n. 1, p.58-61,2004.

MANFREDI, J. J., HORWITZ, S. B. "Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action." *Pharmacol. Ther.*, v. 25, p. 83-125, 1984.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. *et al.*, “Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes”, *Nutrición Hospitalaria*, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MATHER, B. D., VISWANATHAN, K., MILLER, K. M., LONG, T. E. “Michael addition reactions in macromolecular design for emerging Technologies”. *Prog. Polym. Sci.*, v. 31, p. 487–531, 2006.

MATHEW, P., DIPAOLA, R. “Taxane Refractory Prostate Cancer”. *The J. of Urology*, v. 178, n. 3, p. 36-41, 2007.

MATTER, B., SCHMID, W. “Trenimon-induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test.” *Mutation Research*, v. 12, p. 417, 1971.

MATTOS, M.C., MARZORATI, L., “Aspectos mecânicos da adição de Michael”. *Revista Química Nova*, v. 22, n. 5, São Paulo, 1999.

MEISTER, A., ANDERSON, M. E. “Glutathione”. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 52, p.711-760, 1983.

MICKLOS, D. A., FREYER, G. A., CROTTY, D. A., *A Ciência do DNA*, tradução Ana Leonor Chies Santiago-Santos (*et al.*), volume único, 2ª ed., Artmed Editora, Porto Alegre-RS, p. 221-257, 2005.

MLADENOV, E., ILIAKIS, G. “Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous and joining pathways”. *Mutat. Res.: Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, v. 711, n. 1-2, p. 61-72, 2011.

MODZELEWSKA, A.; PETTIT, C.; ACHANTA, G.; DAVIDSON, N. E.; HUANG,P.; KHAN, S. R., “Anticancer activities of novel chalcone and bis-clacone derivatives”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 3491-3495.

MONTANARI, C. A., BOLZANI, V.S., “Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais”, *Revista Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOTTA, Luiz Frederico, 2004, *Estudo Teórico das Relações Estrutura - Atividade Biológica de uma série de derivados de Chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) como Agentes Anti-Plasmodium falciparum (Agentes Anti-maláricos)*, Tese de M.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

MOUSINHO, K. C. “Estudo do potencial anticâncer de um derivado de chalcona, 1-(2-Nitrofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona, *in vitro* e *in vivo*”. 2010. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

MUKHERJEE, S. *et al.*, *Synthetic and Biological Activity Evaluation Studies on Novel 1,3-Diarylpropenones*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 2, p. 337-345, 2001.

MULLIN, C.A., HAMMOCK, B.D. “Chalcone oxides-potent selective inhibitors of cytosolic epoxide hydrolase”. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 216, p. 423–439, 1982.

MULLIN, C. A., RASHID, K.A., MUMMA, R.O. "Mutagenic potency of some conjugated nitroaromatic compounds and its relationship to structure." *Mutation Research*, v. 188, p. 267-274, 1987.

NAM, N. H., KIM, Y., YOU, Y. J., HONG, D.H., KIM, H.M., AHN, B.Z. "Cytotoxic 2',5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 38, p. 179-187, 2003.

NARENDER, T.; SHWETA; TANVIR, K.; RAO, M.S.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S.K., "Prenylated chalcones isolated from *Crotalaria* genus inhibits *in vitro* growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.10, p.2453-2455, 2005.

NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; AVINÓ, J. PEREZ, P.; ESTRELA, J. M. "Changes in Glutathione Status and The Antioxidant System in Blood and in Cancer Cells Associate with Tumour Growth *in Vivo*". *Free Radical Biol. Med.* 26, 410-418, 1999.

NICHOLS, W. W., MOORHEAD, P., BREWEN, G. "Ad hoc committee report on chromosome methodologies in mutation testing." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 22, p. 269, 1972.

NIELSEN, S.F., BOESEN, T. *et al.*, "Antibacterial chalcones – bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.12, n. 11, p. 3047-3054, 2004.

NIELSEN, S.F., CHRISTENSEN, S.B. *et al.*, Antileishmanial Chalcones: Statistical Design, Synthesis, and Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis, *Journal Medicinal Chemistry*, v. 41, p. 4819-4832, 1998.

NOWAKOWSKA, Zdzislawa, "A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones", *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, p.125-137, 2007.

OECD. "Guidelines for Testing of Chemicals". *Genetic Toxicology: Micronucleus Test*, document 474, p. 1-6, 1983.

OLIVEIRA, R. B., ALVES, R. J. "Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos." *Quím. Nova*, v. 25, n. 5, p. 976-984, 2002.

OZBEN, T. "Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in Cancer." *FEBS Lett.*, v. 580, p. 2903-2909, 2006.

OZDEMIR, Z.; KANDILCI, H. B.; GUMUSEL, B.; ÇALIS, U.; BILGIN, A. A., "Synthesis and studies on antidepressant and anticonvulsant activities of some 3-(2-furyl)-pyrazoline derivatives" *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.42, p. 373-379, 2006.

OZOLS, R.F., LOUIE, K.G., PLOWMAN, J., BEHRENS, B.C., FINE, R.L., DYKES, D., HAMILTON, T.C. "Enhanced melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer *in vitro* and in tumor-bearing nude mice by buthionine sulfoximine depletion of glutathione". *Biochem Pharmacol.*, v. 36, p.147-153, 1987.

PARDO, L., OSMAN, R., WEINSTEIN, H., RABINOWITZ, J. R. “Mechanisms Of Nucleophilic-Addition To Activated Double-Bonds – 1,2-Michael And 1,4-Michael Addition Of Ammonia”. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 115, p. 8263-8269, 1993.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. “Introdução à Espectroscopia”. 4. ed. São Paulo: CENGAGE Learning, 2010.

PÉREZ, C.N., MENEZES, A.C.S., RAMALHO, S.D., D’ OLIVEIRA, G.D.C., BERNARDES, A., DE MORAES, M.O. “Síntese, Purificação e Atividade Antitumoral da Chalcona (E)-1-(4-nitrofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona”. Sociedade Brasileira de Química, 2009.

PILATOVA, M. *et al.*, “*In vitro* antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues”, *Toxicology In Vitro*, 2010.

POIRIER, L.A., WEISBURGER, J.H. “Enzymatic reduction of carcinogenic aromatic nitro compounds by rat and mouse liver fractions”. *Biochem. Pharmacol.*, v. 23, p. 661–669, 1974.

RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.R., MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, carcinogênese, teratogênese: critérios e métodos de avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. 241p.

RAMALHO, S. D. “Síntese e avaliação do potencial bioativo de derivados de chalconas”. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Moleculares. Universidade Estadual de Goiás. Anápolis, 2011.

RAMEL, D., ALEKPEROV, U. K., AMES, B. N., KADA, T., WATTENBERG, L. W. “Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis.” *Mutation Res.*, v. 168, p. 47–65, 1986.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P.H. “Micronucleus Investigation of Alcoholic Patients with Oral Carcinomas”. *Genet. Mol. Res.*, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

RASHID, K.A., MULLIN, C.A., MUMMA, R.O. “Structure-mutagenicity relationships of chalconas and their oxides in the Salmonella assay.” *Mutation Research*, v. 169, p. 71-79, 1986.

REBELLO, Jussara de Mattos, 2005, *Avaliação da Atividade Antioxidante e Antifúngica de Análogos Sintéticos da Acetofenona e Pró-Oxidante e Antitumoral de Chalconas Sintéticas*, Dissertação de M.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

REDDY, M.V. Bhaskar *et al.*, “Design, synthesis, and biological evaluation of Mannich bases of heterocyclic chalcone analogs as cytotoxic agents”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 7358-7370, 2008.

REGATEIRO F. J., SILVA H.C., LEMOS M.C. *Genética e Cancro Ginecológico e da Mama*. V. II, 2002.

REIS, P. E. D., RODRIGUES, C. C., VASQUES, C. I., CARVALHO, E. C. “Efeitos adversos identificados em local de infusão intravenosa periférica por drogas tropicais”. *Ciencia y Enfermeria*, v. 14, n. 2, p. 55-64, 2008.

REISCHL, E.; DAFRE, A. L.; FRANCO, J. L.; WILHELM FILHO, D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v.146, n.1-2, p.22-53. 2007

RIBEIRO, L. R. “Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*”. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagênese ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 2003, cap. 7, p. 173-200.

SABZEVARI, O.*et al.*, “Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydrochalcones”, *Chemical Biological Interactions*, v. 148, p. 57-67, 2004.

SALOMONE, M. HEDDLE, J., STUART, E., KATZ, M. “Towards an improved micronucleus test Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene”. *Mutation Research*, v. 74, p. 347-356, 1980.

SANDES, A.R.R., DI BLASI, G., “Biodiversidade e diversidade química e genética”, *Biotecnologia: Ciencia & Desenvolvimento*, s.v., n. 13, p. 28-32, 2000.

SANTOS, L. dos, 2008, *Síntese, Caracterização e Avaliação do Potencial Biológico de Derivados Obtidos a Partir de Chalconas*, Tese de D.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

SATPATHY, K.K., NAYAK, P.L. “Kinetics of the perbenzoic acid oxidation of substituted chalconas”. *J. Indian Chem. Soc.*, v. 53, p. 265–268, 1976.

SCHAUENSTEIN, E., NÖHAMMER, G., RAUCH, H.J., KRESBACH, H. “Significant decreases in the intensity of staining for proteins and protein thiols in basal-cell epitheliomas (basaliomas) as compared to normal skin.” *Histochemistry and Cell Biology*, v. 83, n. 5, p. 451-454, 1985.

SCHMID, W. “The micronuclei test”. *Mutation Research*, v. 31, p. 9-15, 1975.

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

SIES, H., AND MOSS, K.M. “A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver”. *Eur. J. Biochem.*, v. 84, p. 377-383, 1978.

SILVA, T. *et al.*, “Agentes antitumorais inibidores da angiogênese: modelos farmacofóricos para inibidores da integrina  $\alpha\beta 3$ ”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 1, p. 1-57, 2007.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M.R. “New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. *J. Natl. Cancer Institute*, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SKOV, K.A., MACPHAIL, S. "Effect of BSO on the radiation response at low (0–4 Gy) doses". *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v. 22, p. 533–536, 1992.

SLEKAR, K., KOSMAN, D., CULOTTA, V. "The Yeast Copper/Zinc Superoxide Dismutase and the Pentose Phosphate Pathway Play Overlapping Roles in Oxidative Stress Protection." *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 28831-28836, 1996.

SOLOMONS, T.W. Graham, FRYHLE, Craig B., Química Orgânica 1, tradução Robson Mendes Matos, volume I, 8ª ed., LTC Editora Ltda, Rio de Janeiro-RJ, p. 54-82 e 294-295, 512-513, 2001.

SOLOMONS, T.W. Graham, FRYHLE, Craig B., Química Orgânica 2, tradução Robson Mendes Matos, volume II, 8ª ed., LTC Editora Ltda, Rio de Janeiro-RJ, p. 54-82, 2005.

TORIGOE, T., ARISAWA, M., ITOH, S., FUJIU, M., MARUYAMA, H.B. "Anti-mutagenic chalcones: antagonizing the mutagenicity of benzo(a)pyrene on *Salmonella Typhimurium*." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 112, n. 3, p. 833-842, 1983.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; CLIFFORD, M. N., "Flavonones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 1073-1080, 2000.

TOWNSEND, D. M., TEW, K. D. "The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance". *Oncogene*, v. 22, p. 7369-7375, 2003.

TOWNSEND, D. M., TEW, K. D., TAPIERO, H. "The importance of glutathione in human disease". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 57, p. 145-155, 2003.

TSUKIYAMA, Ryo-Ichi *et al.*, "Antibacterial Activity of Licochalcone A against Spore-Forming Bacteria", *American Society for Microbiology*, v. 46, n. 5, p. 1226-1230, 2002.

VANHAUWAERT, A., VANPARYS, P., VOLDERS, M.K. "The *in vivo* gut micronucleus test detects clastrogens and aneugens given by gavage." *Mutagenesis*, v. 16, p. 36-50, 2001.

VAN SCHOOTEN, F.J., BESARATI, A.N., DE FLORA, S., D'AGOSTINI, F., IZZOTTI, A., CAMOIRANO, A., BALM, A.J., DALLING, J.W., BAST, A., HAENEN, G.R., VEER, L.V., BAAS, P., SAKAI, H., ZANDWIJK, N.V. "Effects of oral administration of N-Acetyl-L-cysteine: a multi-biomarker Study in smokers." *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, v. 11, p. 167-175, 2002.

VERWEIJ, J., PINEDO, H. B. "Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations". *Anti-Cancer Drugs*, v. 1, p. 5-13, 1990.

VOGEL, S. *et al.*, Natural and non-natural prenylated chalcones: Synthesis, cytotoxicity and anti-oxidative activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 4286-4293, 2008.

WADLEIGH, R. W., YU, S. J. "Glutathione transferase activity of fall armyworm larvae toward  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl allelochemicals and its induction by allelochemicals." *Insect Biochem.*, v. 17, n. 5, p. 759-764, 1987.

WALLAU, A. D., LEORATTI, M.C.V., CAMPOS, M. "Mitomicina C e "Excimer laser"". *Arq. Bras. Oftalmol.*, v.68, n.6, 2005.

WATERS, M. D., BRADY, A. L., STACK, H. F., BROCKMAN, H. E. "Antimutagenicity profiles for some model compounds". *Mutation Research*, v. 238, p. 57-85, 1990.

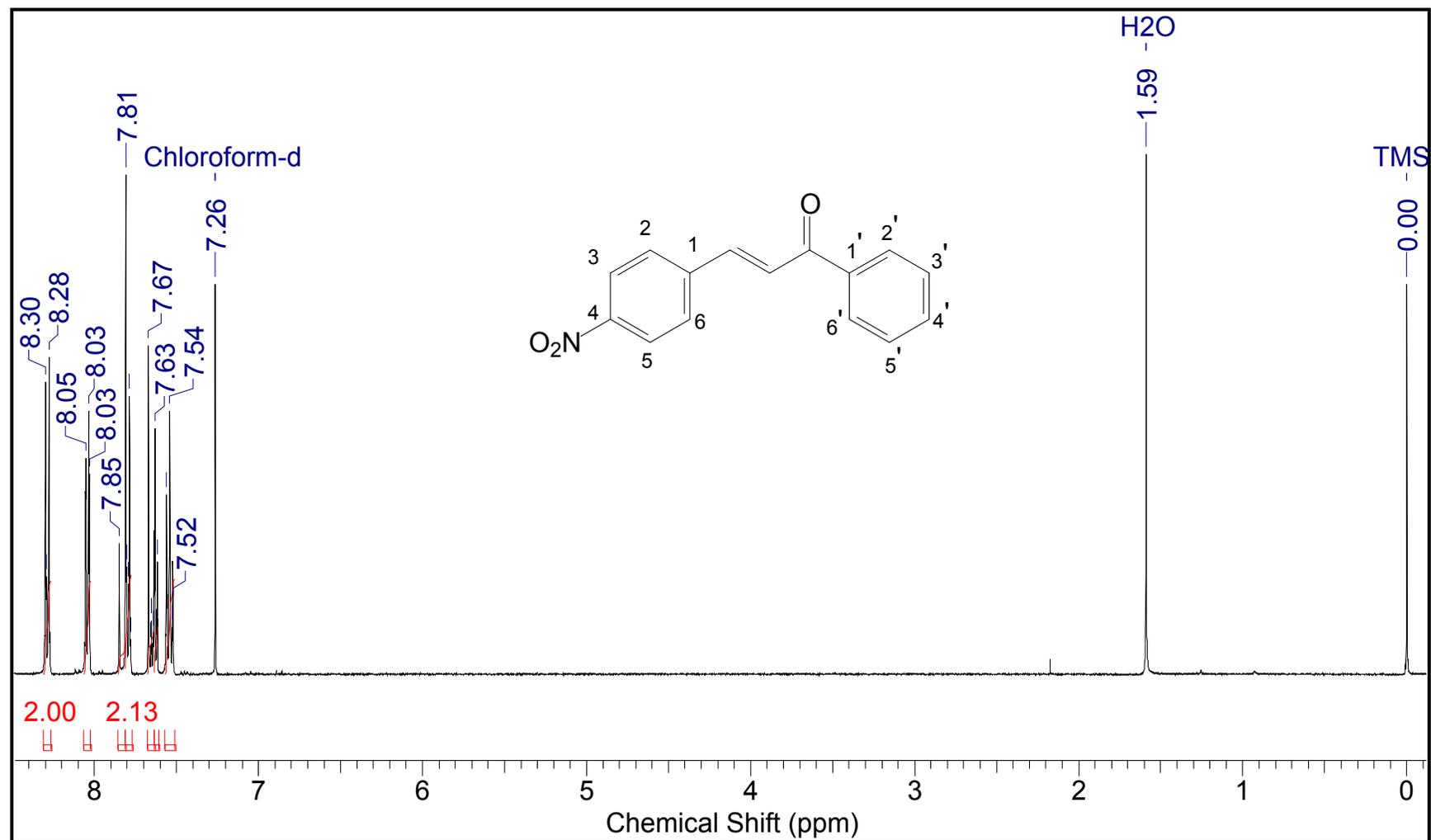
WON, Shen-Jeu *et al.*, Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, p.103-112, 2005.

YANG, X-L., WANG, A. H-J. "Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol. Therap.*, v. 83, p. 181-215, 1999.

ZAMAN, J. R. G., LANKELMA, J., TELLINGEN, O. V., BEIJNEN, J., DEKKER, H., PAULLUSMA, C., ELFERINK, R. P. J. O., BAAS, F., BORST, P. "Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein." *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 92, p. 7690-7694, 1995.

ZI, X., SIMONEAU, A.R. "Flavokawain A, a novel chalcone from Kava Extract, induces apoptosis in bladder cancer cells by involvement of Bax Protein-Dependent and Mitochondria-Dependent apoptotic pathway and suppresses tumor growth in mice." *Cancer Research*, v. 65, p. 3479-3486, 2005.

## 7. APÊNDICES



**Figura 38.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.

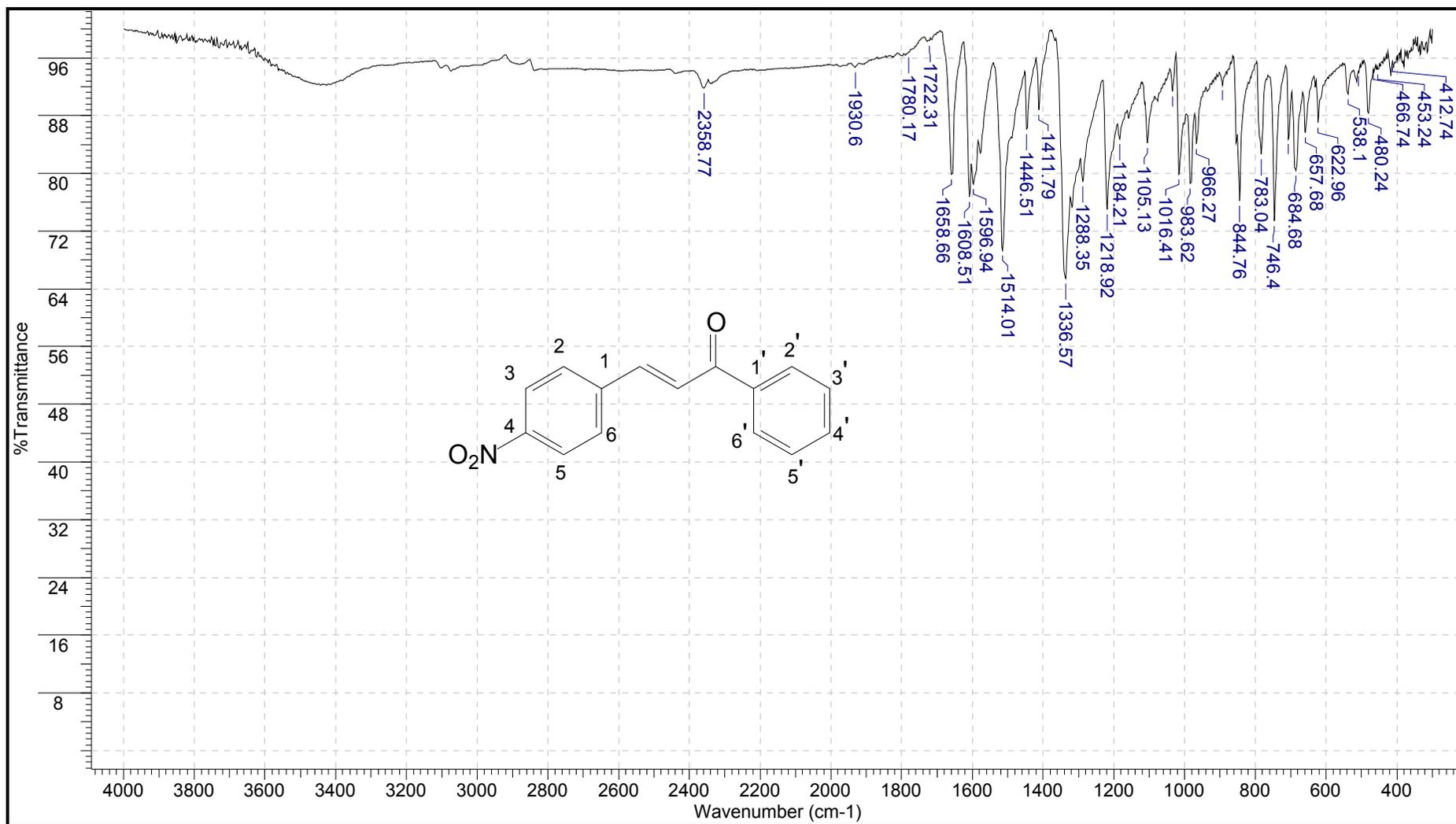


Figura 39. Espectro no IV (KBr) chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.

**Tabela 3.** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) em medula óssea de camundongos após a administração de diferentes doses da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1).

Tratamentos	Tempo (h)	Eritrócitos policromáticos micronucleados/ 2.000 EPC			EPC/ENC
		Dados individuais	No.	$\bar{x} \pm s$	
DMSO (C-)*	24	04, 04, 04, 04, 05	21	4,2 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,05 <sup>c</sup>
DMSO(C-)*	48	04, 03, 03, 03, 04	17	3,4 ± 0,55 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,11 <sup>c</sup>
MMC (C+)**	24	34, 32, 33, 30, 34	163	32,6 ± 1,67 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,03 <sup>d</sup>
MMC (C+)**	48	10, 12, 11, 12, 14	59	11,8 ± 1,48 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,10 <sup>d</sup>
5 mg/Kg CG1	24	16, 11, 15, 13, 13	68	13,6 ± 1,95 <sup>b</sup>	1,12 ± 0,07 <sup>d</sup>
10 mg/Kg CG1	24	12, 14, 12, 15, 15	68	13,6 ± 1,52 <sup>b</sup>	1,14 ± 0,07 <sup>d</sup>
20 mg/Kg CG1	24	13, 15, 12, 13, 14	67	13,4 ± 1,14 <sup>b</sup>	1,13 ± 0,04 <sup>d</sup>
5 mg/Kg CG1	48	16, 17, 15, 14, 15	77	15,4 ± 1,14 <sup>b</sup>	1,08 ± 0,04 <sup>c</sup>
10 mg/Kg CG1	48	17, 16, 18, 17, 16	84	16,8 ± 0,84 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,06 <sup>c</sup>
20 mg/Kg CG1	48	15, 18, 17, 17, 16	83	16,6 ± 1,14 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,07 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> P> 0,05; <sup>b</sup> P< 0,05; <sup>c</sup> P> 0,05; <sup>d</sup> P< 0,05 . Todos os resultados foram comparados ao grupo controle negativo. \* Controle negativo: DMSO; \*\* Controle positivo: 4 mg.Kg<sup>-1</sup> p.c. de MMC. CG1: chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.

**Tabela 4.** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) em medula óssea de camundongos após a administração de diferentes doses da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CG1) co-tratadas com Mitomicina C.

Tratamentos	Tempo (h)	Eritrócitos policromáticos micronucleados/ 2.000 EPC			EPC/ENC
		Dados individuais	No.	$\bar{x} \pm s$	
DMSO (C-)*	24	04, 04, 04, 04, 05	21	4,20 ± 0,45 <sup>b</sup>	1,26 ± 0,05 <sup>d</sup>
DMSO (C-)*	48	04, 03, 03, 03, 04	17	3,40 ± 0,55 <sup>b</sup>	1,19 ± 0,11 <sup>d</sup>
MMC (C+)**	24	34, 32, 33, 30, 34	163	32,6 ± 1,67 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,03 <sup>c</sup>
5 mg/Kg CG1 + MMC	24	11, 09, 10, 13, 10	53	10,6 ± 1,52 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,10 <sup>d</sup>
10 mg/Kg CG1 + MMC	24	11, 13, 10, 11, 12	57	11,4 ± 1,14 <sup>b</sup>	0,95 ± 0,10 <sup>d</sup>
20 mg/Kg CG1 + MMC	24	13, 14, 11, 12, 14	64	12,8 ± 1,30 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,09 <sup>d</sup>
MMC (C+)**	48	10, 12, 11, 12, 14	59	11,8 ± 1,48 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,06 <sup>c</sup>
5 mg/Kg CG1 + MMC	48	13, 12, 13, 11, 14	63	12,6 ± 1,14 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,04 <sup>d</sup>
10 mg/Kg CG1 + MMC	48	12, 14, 14, 13, 14	67	13,4 ± 0,89 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,07 <sup>d</sup>
20 mg/Kg CG1 + MMC	48	24, 25, 27, 25, 27	128	25,6 ± 1,34 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,08 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> P > 0,05; <sup>b</sup> P < 0,05; <sup>c</sup> P > 0,05; <sup>d</sup> P < 0,05. Os resultados de cada grupo foram comparados com o grupo controle positivo em concordância com o respectivo tempo. \* Controle negativo: DMSO; \*\* Controle positivo: 4 mg.Kg<sup>-1</sup> de MMC. MMC: Mitomicina C. CG1: (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.

**Quadro 6.** Estatística descritiva dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Grupos		Statistic	Std. Error
Controle negativo	Mean	4,2000	,20000
		Lower Bound	3,6447
		Upper Bound	4,7553
	95% Confidence Interval for Mean		
	5% Trimmed Mean	4,1667	
	Median	4,0000	
	Variance	,200	
	Std. Deviation	,44721	
	Minimum	4,00	
	Maximum	5,00	
	Range	1,00	
	Interquartile Range	,50	
	Skewness	2,236	,913
	Kurtosis	5,000	2,000
5mg/kg	Mean	13,6000	,87178
		Lower Bound	11,1796
		Upper Bound	16,0204
	95% Confidence Interval for Mean		
	5% Trimmed Mean	13,6111	
	Median	13,0000	
	Variance	3,800	
	Std. Deviation	1,94936	
	Minimum	11,00	
	Maximum	16,00	
	Range	5,00	
	Interquartile Range	3,50	
	Skewness	-,081	,913
	Kurtosis	-,817	2,000
10mg/kg	Mean	13,6000	,67823
		Lower Bound	11,7169
		Upper Bound	15,4831
	95% Confidence Interval for Mean		
	5% Trimmed Mean	13,6111	
	Median	14,0000	
	Variance	2,300	
	Std. Deviation	1,51658	
	Minimum	12,00	
	Maximum	15,00	
	Range	3,00	
	Interquartile Range	3,00	
	Skewness	-,315	,913
	Kurtosis	-3,081	2,000
20mg/kg	Mean	13,4000	,50990
		Lower Bound	11,9843
		Upper Bound	14,8157
	95% Confidence Interval for Mean		
	5% Trimmed Mean	13,3889	
	Median	13,0000	
	Variance	1,300	
	Std. Deviation	1,14018	
	Minimum	12,00	
	Maximum	15,00	
	Range	3,00	
	Interquartile Range	2,00	

	Skewness		,405	,913
	Kurtosis		-,178	2,000
Controle positivo	Mean		32,6000	,74833
		Lower Bound	30,5223	
	95% Confidence Interval for Mean	Upper Bound	34,6777	
	5% Trimmed Mean		32,6667	
	Median		33,0000	
	Variance		2,800	
	Std. Deviation		1,67332	
	Minimum		30,00	
	Maximum		34,00	
	Range		4,00	
	Interquartile Range		3,00	
	Skewness		-1,089	,913
	Kurtosis		,536	2,000

**Quadro 7.** Teste de normalidade dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo e negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Grupos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Controle negativo	,473	5	,001	,552	5	,000
5mg/kg	,221	5	,200*	,953	5	,758
10mg/kg	,254	5	,200*	,803	5	,086
20mg/kg	,237	5	,200*	,961	5	,814
Controle positivo	,201	5	,200*	,881	5	,314

**Quadro 8.** Teste ANOVA dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo e negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2158,640	4	539,660	259,452	,000
Within Groups	41,600	20	2,080		
Total	2200,240	24			

**Quadro 9.** Teste de Tukey dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo e negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Controle negativo	5mg/kg	-9,40000*	,91214	,000	-12,1295	-6,6705
	10mg/kg	-9,40000*	,91214	,000	-12,1295	-6,6705
	20mg/kg	-9,20000*	,91214	,000	-11,9295	-6,4705
	Controle positivo	-28,40000*	,91214	,000	-31,1295	-25,6705
5mg/kg	Controle negativo	9,40000*	,91214	,000	6,6705	12,1295
	10mg/kg	,00000	,91214	1,000	-2,7295	2,7295
	20mg/kg	,20000	,91214	,999	-2,5295	2,9295
	Controle positivo	-19,00000*	,91214	,000	-21,7295	-16,2705
10mg/kg	Controle negativo	9,40000*	,91214	,000	6,6705	12,1295
	5mg/kg	,00000	,91214	1,000	-2,7295	2,7295
	20mg/kg	,20000	,91214	,999	-2,5295	2,9295
	Controle positivo	-19,00000*	,91214	,000	-21,7295	-16,2705
20mg/kg	Controle negativo	9,20000*	,91214	,000	6,4705	11,9295
	5mg/kg	-,20000	,91214	,999	-2,9295	2,5295
	10mg/kg	-,20000	,91214	,999	-2,9295	2,5295
	Controle positivo	-19,20000*	,91214	,000	-21,9295	-16,4705
Controle positivo	Controle negativo	28,40000*	,91214	,000	25,6705	31,1295
	5mg/kg	19,00000*	,91214	,000	16,2705	21,7295
	10mg/kg	19,00000*	,91214	,000	16,2705	21,7295
	20mg/kg	19,20000*	,91214	,000	16,4705	21,9295

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Quadro 10.** Estatística descritiva dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Grupos		Statistic	Std. Error	
Controle negativo	Mean	3,4000	,24495	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,7199	
		Upper Bound	4,0801	
	5% Trimmed Mean	3,3889		
	Median	3,0000		
	Variance	,300		
	Std. Deviation	,54772		
	Minimum	3,00		
	Maximum	4,00		
	Range	1,00		
	Interquartile Range	1,00		
	Skewness	,609	,913	
	Kurtosis	-3,333	2,000	
5mg/kg	Mean	15,4000	,50990	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	13,9843	
		Upper Bound	16,8157	
	5% Trimmed Mean	15,3889		
	Median	15,0000		
	Variance	1,300		
	Std. Deviation	1,14018		
	Minimum	14,00		
	Maximum	17,00		
	Range	3,00		
	Interquartile Range	2,00		
	Skewness	,405	,913	
	Kurtosis	-,178	2,000	
10mg/kg	Mean	16,8000	,37417	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	15,7611	
		Upper Bound	17,8389	
	5% Trimmed Mean	16,7778		
	Median	17,0000		
	Variance	,700		
	Std. Deviation	,83666		
	Minimum	16,00		
	Maximum	18,00		
	Range	2,00		

20mg/kg	Interquartile Range		1,50		
	Skewness		,512	,913	
	Kurtosis		-,612	2,000	
	Mean		16,6000	,50990	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		15,1843	
		Upper Bound		18,0157	
	5% Trimmed Mean		16,6111		
	Median		17,0000		
	Variance		1,300		
	Std. Deviation		1,14018		
	Minimum		15,00		
	Maximum		18,00		
	Range		3,00		
	Interquartile Range		2,00		
	Skewness		-,405	,913	
Kurtosis		-,178	2,000		
Controle positivo	Mean		11,8000	,66332	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		9,9583	
		Upper Bound		13,6417	
	5% Trimmed Mean		11,7778		
	Median		12,0000		
	Variance		2,200		
	Std. Deviation		1,48324		
	Minimum		10,00		
	Maximum		14,00		
	Range		4,00		
	Interquartile Range		2,50		
	Skewness		,552	,913	
	Kurtosis		,868	2,000	

**Quadro 11.** Teste de normalidade dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Grupos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Controle negativo	,367	5	,026	,684	5	,006
5mg/kg	,237	5	,200*	,961	5	,814
10mg/kg	,231	5	,200*	,881	5	,314
20mg/kg	,237	5	,200*	,961	5	,814
Controle positivo	,246	5	,200*	,956	5	,777

**Quadro 12.** Teste ANOVA dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	632,800	4	158,200	136,379	,000
Within Groups	23,200	20	1,160		
Total	656,000	24			

**Quadro 13.** Teste de Tukey dos dados obtidos na avaliação de mutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Controle negativo	5mg/kg	-12,00000*	,68118	,000	-14,0383	-9,9617
	10mg/kg	-13,40000*	,68118	,000	-15,4383	-11,3617
	20mg/kg	-13,20000*	,68118	,000	-15,2383	-11,1617
	Controle positivo	-8,40000*	,68118	,000	-10,4383	-6,3617
5mg/kg	Controle negativo	12,00000*	,68118	,000	9,9617	14,0383
	10mg/kg	-1,40000	,68118	,277	-3,4383	,6383
	20mg/kg	-1,20000	,68118	,422	-3,2383	,8383
	Controle positivo	3,60000*	,68118	,000	1,5617	5,6383
10mg/kg	Controle negativo	13,40000*	,68118	,000	11,3617	15,4383
	5mg/kg	1,40000	,68118	,277	-,6383	3,4383
	20mg/kg	,20000	,68118	,998	-1,8383	2,2383
	Controle positivo	5,00000*	,68118	,000	2,9617	7,0383
20mg/kg	Controle negativo	13,20000*	,68118	,000	11,1617	15,2383
	5mg/kg	1,20000	,68118	,422	-,8383	3,2383
	10mg/kg	-,20000	,68118	,998	-2,2383	1,8383
	Controle positivo	4,80000*	,68118	,000	2,7617	6,8383
Controle positivo	Controle negativo	8,40000*	,68118	,000	6,3617	10,4383
	5mg/kg	-3,60000*	,68118	,000	-5,6383	-1,5617
	10mg/kg	-5,00000*	,68118	,000	-7,0383	-2,9617
	20mg/kg	-4,80000*	,68118	,000	-6,8383	-2,7617

**Quadro 14.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	5,951 <sup>a</sup>	1	,015	,015	,008	
Continuity Correction <sup>b</sup>	5,838	1	,016			
Likelihood Ratio	5,952	1	,015	,015	,008	
Fisher's Exact Test				,015	,008	
Linear-by-Linear Association	5,950 <sup>c</sup>	1	,015	,015	,008	,001
N of Valid Cases	7505					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1696,64.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is 2,439.

**Quadro 15.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 10 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	4,448 <sup>a</sup>	1	,035	,036	,018	
Continuity Correction <sup>b</sup>	4,351	1	,037			
Likelihood Ratio	4,449	1	,035	,036	,018	
Fisher's Exact Test				,036	,018	
Linear-by-Linear Association	4,448 <sup>c</sup>	1	,035	,036	,018	,002
N of Valid Cases	7467					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1689,38.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is 2,109.

**Quadro 16.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	4,805 <sup>a</sup>	1	,028	,029	,015	
Continuity Correction <sup>b</sup>	4,704	1	,030			
Likelihood Ratio	4,806	1	,028	,029	,015	
Fisher's Exact Test				,029	,015	
Linear-by-Linear Association	4,804 <sup>c</sup>	1	,028	,029	,015	,002
N of Valid Cases	7483					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1691,22.

b. Computed only for a 2x2 table.

c. The standardized statistic is 2,192.

**Quadro 17.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 5mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	3,755 <sup>a</sup>	1	,053	,053	,028	
Continuity Correction <sup>b</sup>	3,667	1	,056			
Likelihood Ratio	3,756	1	,053	,053	,028	
Fisher's Exact Test				,053	,028	

Linear-by-Linear Association	3,755 <sup>c</sup>	1	,053	,053	,028	,003
N of Valid Cases	7564					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1736,05.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is 1,938.

**Quadro 18.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 10 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	3,098 <sup>a</sup>	1	,078	,080	,041	
Continuity Correction <sup>b</sup>	3,017	1	,082			
Likelihood Ratio	3,098	1	,078	,080	,041	
Fisher's Exact Test				,080	,041	
Linear-by-Linear Association	3,097 <sup>c</sup>	1	,078	,080	,041	,004
N of Valid Cases	7549					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1732,15.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is 1,760.

**Quadro 19.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de citotoxicidade no tratamento com a dose de 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	1,896 <sup>a</sup>	1	,169	,172	,088	
Continuity Correction <sup>b</sup>	1,833	1	,176			
Likelihood Ratio	1,896	1	,169	,172	,088	
Fisher's Exact Test				,172	,088	
Linear-by-Linear Association	1,896 <sup>c</sup>	1	,169	,172	,088	,007
N of Valid Cases	7517					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1723,77.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is 1,377.

**Quadro 20.** Estatística descritiva dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Grupos		Statistic	Std. Error
Controle negativo	Mean	4,2000	,20000
	95% Confidence Interval for Lower Bound	3,6447	
	Mean Upper Bound	4,7553	
	5% Trimmed Mean	4,1667	
	Median	4,0000	
	Variance	,200	
	Std. Deviation	,44721	
	Minimum	4,00	
	Maximum	5,00	
	Range	1,00	
	Interquartile Range	,50	
	Skewness	2,236	,913
	Kurtosis	5,000	2,000
5mg/kg	Mean	10,6000	,67823
	95% Confidence Interval for Lower Bound	8,7169	
	Mean Upper Bound	12,4831	
	5% Trimmed Mean	10,5556	
	Median	10,0000	

	Variance	2,300		
	Std. Deviation	1,51658		
	Minimum	9,00		
	Maximum	13,00		
	Range	4,00		
	Interquartile Range	2,50		
	Skewness	1,118	,913	
	Kurtosis	1,456	2,000	
10mg/kg	Mean	11,4000	,50990	
	95% Confidence Interval for Lower Bound	9,9843		
	Mean	Upper Bound	12,8157	
	5% Trimmed Mean	11,3889		
	Median	11,0000		
	Variance	1,300		
	Std. Deviation	1,14018		
	Minimum	10,00		
	Maximum	13,00		
	Range	3,00		
	Interquartile Range	2,00		
	Skewness	,405	,913	
Kurtosis	-,178	2,000		
20mg/kg	Mean	12,8000	,58310	
	95% Confidence Interval for Lower Bound	11,1811		
	Mean	Upper Bound	14,4189	
	5% Trimmed Mean	12,8333		
	Median	13,0000		
	Variance	1,700		
	Std. Deviation	1,30384		
	Minimum	11,00		
	Maximum	14,00		
	Range	3,00		
	Interquartile Range	2,50		
	Skewness	-,541	,913	
Kurtosis	-1,488	2,000		
Controle positivo	Mean	32,6000	,74833	
	95% Confidence Interval for Lower Bound	30,5223		
	Mean	Upper Bound	34,6777	
	5% Trimmed Mean	32,6667		
	Median	33,0000		
	Variance	2,800		
	Std. Deviation	1,67332		
	Minimum	30,00		

Maximum	34,00	
Range	4,00	
Interquartile Range	3,00	
Skewness	-1,089	,913
Kurtosis	,536	2,000

**Quadro 21.** Teste de normalidade dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Grupos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Controle negativo	,473	5	,001	,552	5	,000
5mg/kg	,254	5	,200*	,914	5	,492
10mg/kg	,237	5	,200*	,961	5	,814
20mg/kg	,221	5	,200*	,902	5	,421
Controle positivo	,201	5	,200*	,881	5	,314

**Quadro 22.** Teste ANOVA dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2306,240	4	576,560	347,325	,000
Within Groups	33,200	20	1,660		
Total	2339,440	24			

**Quadro 23.** Teste de Tukey HSD dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Controle negativo	5mg/kg	-6,40000*	,81486	,000	-8,8384	-3,9616
	10mg/kg	-7,20000*	,81486	,000	-9,6384	-4,7616
	20mg/kg	-8,60000*	,81486	,000	-11,0384	-6,1616
	Controle positivo	-28,40000*	,81486	,000	-30,8384	-25,9616
5mg/kg	Controle negativo	6,40000*	,81486	,000	3,9616	8,8384
	10mg/kg	-,80000	,81486	,860	-3,2384	1,6384
	20mg/kg	-2,20000	,81486	,090	-4,6384	,2384
	Controle positivo	-22,00000*	,81486	,000	-24,4384	-19,5616
10mg/kg	Controle negativo	7,20000*	,81486	,000	4,7616	9,6384
	5mg/kg	,80000	,81486	,860	-1,6384	3,2384
	20mg/kg	-1,40000	,81486	,446	-3,8384	1,0384
	Controle positivo	-21,20000*	,81486	,000	-23,6384	-18,7616
20mg/kg	Controle negativo	8,60000*	,81486	,000	6,1616	11,0384
	5mg/kg	2,20000	,81486	,090	-,2384	4,6384
	10mg/kg	1,40000	,81486	,446	-1,0384	3,8384
	Controle positivo	-19,80000*	,81486	,000	-22,2384	-17,3616
Controle positivo	Controle negativo	28,40000*	,81486	,000	25,9616	30,8384
	5mg/kg	22,00000*	,81486	,000	19,5616	24,4384
	10mg/kg	21,20000*	,81486	,000	18,7616	23,6384
	20mg/kg	19,80000*	,81486	,000	17,3616	22,2384

**Quadro 24.** Estatística descritiva dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Grupos		Statistic	Std. Error	
Controle negativo	Mean	3,4000	,24495	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,7199	
		Upper Bound	4,0801	
	5% Trimmed Mean	3,3889		
	Median	3,0000		
	Variance	,300		
	Std. Deviation	,54772		
	Minimum	3,00		
	Maximum	4,00		
	Range	1,00		
	Interquartile Range	1,00		
	Skewness	,609	,913	
	Kurtosis	-3,333	2,000	
5mg/kg	Mean	12,6000	,50990	

	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	11,1843	
		Upper Bound	14,0157	
	5% Trimmed Mean		12,6111	
	Median		13,0000	
	Variance		1,300	
	Std. Deviation		1,14018	
	Minimum		11,00	
	Maximum		14,00	
	Range		3,00	
	Interquartile Range		2,00	
	Skewness		-,405	,913
	Kurtosis		-,178	2,000
10mg/kg	Mean		13,4000	,40000
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	12,2894	
		Upper Bound	14,5106	
	5% Trimmed Mean		13,4444	
	Median		14,0000	
	Variance		,800	
	Std. Deviation		,89443	
	Minimum		12,00	
	Maximum		14,00	
	Range		2,00	
	Interquartile Range		1,50	
	Skewness		-1,258	,913
Kurtosis		,313	2,000	
20mg/kg	Mean		25,6000	,60000
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	23,9341	
		Upper Bound	27,2659	
	5% Trimmed Mean		25,6111	
	Median		25,0000	
	Variance		1,800	
	Std. Deviation		1,34164	
	Minimum		24,00	
	Maximum		27,00	
	Range		3,00	
	Interquartile Range		2,50	
	Skewness		,166	,913
Kurtosis		-2,407	2,000	
Controle positivo	Mean		11,8000	,66332
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9,9583	
		Upper Bound	13,6417	
	5% Trimmed Mean		11,7778	

Median	12,0000	
Variance	2,200	
Std. Deviation	1,48324	
Minimum	10,00	
Maximum	14,00	
Range	4,00	
Interquartile Range	2,50	
Skewness	,552	,913
Kurtosis	,868	2,000

**Quadro 25.** Teste de normalidade dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Grupos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Controle negativo	,367	5	,026	,684	5	,006
5mg/kg	,237	5	,200*	,961	5	,814
10mg/kg	,349	5	,046	,771	5	,046
20mg/kg	,273	5	,200*	,852	5	,201
Controle positivo	,246	5	,200*	,956	5	,777

**Quadro 26.** Teste ANOVA dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1260,160	4	315,040	246,125	,000
Within Groups	25,600	20	1,280		
Total	1285,760	24			

**Quadro 27.** Teste de Tukey HSD dos dados obtidos na avaliação de antimutagenicidade nos tratamentos com o controle positivo, negativo e as doses de 5, 10 e 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Controle negativo	5mg/kg	-9,20000*	,71554	,000	-11,3412	-7,0588
	10mg/kg	-10,00000*	,71554	,000	-12,1412	-7,8588
	20mg/kg	-22,20000*	,71554	,000	-24,3412	-20,0588
	Controle positivo	-8,40000*	,71554	,000	-10,5412	-6,2588
5mg/kg	Controle negativo	9,20000*	,71554	,000	7,0588	11,3412
	10mg/kg	-,80000	,71554	,795	-2,9412	1,3412
	20mg/kg	-13,00000*	,71554	,000	-15,1412	-10,8588
	Controle positivo	,80000	,71554	,795	-1,3412	2,9412
10mg/kg	Controle negativo	10,00000*	,71554	,000	7,8588	12,1412
	5mg/kg	,80000	,71554	,795	-1,3412	2,9412
	20mg/kg	-12,20000*	,71554	,000	-14,3412	-10,0588
	Controle positivo	1,60000	,71554	,207	-,5412	3,7412
20mg/kg	Controle negativo	22,20000*	,71554	,000	20,0588	24,3412
	5mg/kg	13,00000*	,71554	,000	10,8588	15,1412
	10mg/kg	12,20000*	,71554	,000	10,0588	14,3412
	Controle positivo	13,80000*	,71554	,000	11,6588	15,9412
Controle positivo	Controle negativo	8,40000*	,71554	,000	6,2588	10,5412
	5mg/kg	-,80000	,71554	,795	-2,9412	1,3412
	10mg/kg	-1,60000	,71554	,207	-3,7412	,5412
	20mg/kg	-13,80000*	,71554	,000	-15,9412	-11,6588

**Quadro 28.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	96,324 <sup>a</sup>	1	,000	,000	,000	
Continuity Correction <sup>b</sup>	95,924	1	,000			
Likelihood Ratio	96,221	1	,000	,000	,000	
Fisher's Exact Test				,000	,000	
Linear-by-Linear Association	96,314 <sup>c</sup>	1	,000	,000	,000	,000
N of Valid Cases	10162					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1799,35.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is -9,814.

**Quadro 29.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 10 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	171,230 <sup>a</sup>	1	,000	,000	,000	
Continuity Correction <sup>b</sup>	170,689	1	,000			
Likelihood Ratio	171,031	1	,000	,000	,000	
Fisher's Exact Test				,000	,000	
Linear-by-Linear Association	171,213 <sup>c</sup>	1	,000	,000	,000	,000
N of Valid Cases	9848					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1730,91.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is -13,085.

**Quadro 30.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 20 mg/Kg de CG1 em 24 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	98,666 <sup>a</sup>	1	,000	,000	,000	
Continuity Correction <sup>b</sup>	98,260	1	,000			
Likelihood Ratio	98,541	1	,000	,000	,000	
Fisher's Exact Test				,000	,000	
Linear-by-Linear Association	98,656 <sup>c</sup>	1	,000	,000	,000	,000
N of Valid Cases	10086					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1770,56.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is -9,933.

**Quadro 31.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 5 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	65,180 <sup>a</sup>	1	,000	,000	,000	
Continuity Correction <sup>b</sup>	64,858	1	,000			
Likelihood Ratio	65,079	1	,000	,000	,000	
Fisher's Exact Test				,000	,000	
Linear-by-Linear Association	65,174 <sup>c</sup>	1	,000	,000	,000	,000
N of Valid Cases	10831					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1798,22.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is 8,073.

**Quadro 32.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 10 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	59,384 <sup>a</sup>	1	,000	,000	,000	
Continuity Correction <sup>b</sup>	59,078	1	,000			
Likelihood Ratio	59,279	1	,000	,000	,000	
Fisher's Exact Test				,000	,000	
Linear-by-Linear Association	59,379 <sup>c</sup>	1	,000	,000	,000	,000
N of Valid Cases	10960					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1806,31.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is 7,706.

**Quadro 33.** Teste do Qui Quadrado dos dados obtidos na avaliação de anticitotoxicidade no tratamento com a dose de 20 mg/Kg de CG1 em 48 horas em teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	99,701 <sup>a</sup>	1	,000	,000	,000	
Continuity Correction <sup>b</sup>	99,304	1	,000			
Likelihood Ratio	99,428	1	,000	,000	,000	
Fisher's Exact Test				,000	,000	
Linear-by-Linear Association	99,692 <sup>c</sup>	1	,000	,000	,000	,000
N of Valid Cases	11167					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1748,90.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is 9,985.

## 8. ANEXOS

	<b>SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL</b> <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS</b> <b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO</b>	
	<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>	<b>UFG</b>
		Goiânia, 08/11/2010.
	<b>ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA, PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O N°: 230/10</b>	
	<b>Título do projeto:</b> AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES GENOTÓXICAS E ANTIGENOTÓXICAS DAS CHALCONAS (E)-1-(4-METOXIFENIL)-3-FENILPROP-2-EN-1-ONA E (E)-1-(4-NITROFENIL)-3-FENILPROP-2-EM-1-ONA EM CAMUNDONGOS	
	<b>Pesquisador responsável:</b> Lee Chen Chen <a href="http://lattes.cnpq.br/4621907105842007">http://lattes.cnpq.br/4621907105842007</a>	
	<b>Pesquisadores participantes:</b> Caridad Noda Pérez <a href="http://lattes.cnpq.br/8518548259609686">http://lattes.cnpq.br/8518548259609686</a> Antônio Carlos Severo Menezes <a href="http://lattes.cnpq.br/1920123962171808">http://lattes.cnpq.br/1920123962171808</a> Carolina Ribeiro e Silva <a href="http://lattes.cnpq.br/5491812153712081">http://lattes.cnpq.br/5491812153712081</a> Pabline Marinho Vieira <a href="http://lattes.cnpq.br/3513374378710602">http://lattes.cnpq.br/3513374378710602</a> Lorena Ramos Freitas de Sousa <a href="http://lattes.cnpq.br/3468067160878475">http://lattes.cnpq.br/3468067160878475</a> Suellem Demuner Ramalho <a href="http://lattes.cnpq.br/2040752209646047">http://lattes.cnpq.br/2040752209646047</a>	
	<b>Instituição onde será realizado o estudo:</b> Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.	
	<b>Data de apresentação ao CEP/UFG:</b> 17/08/2010.	
	<b>Atendimento da Pendência:</b> 1) Detalhamento do destino dos animais (ou carcaças dos animais) após experimentação e apresentação do termo de anuência do chefe/diretor da unidade para onde as carcaças serão destinadas e incineradas.	
	<b>Parecer do CEP</b> Após a análise do projeto, AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES GENOTÓXICAS E ANTIGENOTÓXICAS DAS CHALCONAS (E)-1-(4-METOXIFENIL)-3-FENILPROP-2-EN-1-ONA E (E)-1-(4-NITROFENIL)-3-FENILPROP-2-EM-1-ONA EM CAMUNDONGOS, verificou-se que o mesmo encontra-se APROVADO, s.m.j. deste comitê.	
	<b>VI – Data da reunião:</b> 08 de novembro de 2010.	
	 Prof. João Carlos do Rocha Medrado Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFG	

Prédio da Reitoria - Térreo - Campus II - CEP: 74001-970 - Goiânia-GO - Fones: 0 XX62 3521-1076 - Fax: 3521-1163  
Homepage: [www.prppg.ufg.br](http://www.prppg.ufg.br) - E-mail: [prppg@prppg.ufg.br](mailto:prppg@prppg.ufg.br)

**Figura 40.** Aprovação do projeto protocolado sob o n°: 230/10 pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás.

