



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE

INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA,
ANTIANGIOGÊNICA, MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DE UMA
BISCHALCONA AB7 SINTÉTICA

Susy Ricardo Lemes Pontes

GOIÂNIA
GOIÁS-BRASIL
2018

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

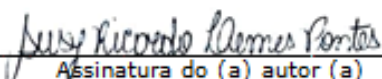
Nome completo do autor: Susy Ricardo Lemes Pontes


Título do trabalho: Investigação das atividades angiogênica, antiangiogênica, mutagênica e antimutagênica de uma bischalcona AB7 sintética.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)


Assinatura do (a) Orientador (a)

Data: 14 / 09 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

SUSY RICARDO LEMES PONTES

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIANGIOGÊNICA,
MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DE UMA BISCHALCONA AB7 SINTÉTICA**

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

Orientador:

Prof. Nelson Jorge da Silva Júnior, PhD

Co-orientadora:

Prof.(a) Maria Lígia Rodrigues Macedo, Dr

Goiânia

Goiás-Brasil

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ricardo Lemes Pontes, Susy

Investigação das atividades angiogênica, antiangiogênica, mutagênica e antimutagênica de uma bischalcona AB7 sintética [manuscrito] / Susy Ricardo Lemes Pontes. - 2018.

xvi, 149 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior; co-orientadora Maria Lígia Rodrigues Macedo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, , Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2018. Bibliografia. Anexos.

1. Antiangiogênico. 2. Antimutagênico. 3. CAB7 β . 4. Óptico. 5. Quimioprevenção. I. Jorge da Silva Júnior, Nelson, orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
 BIODIVERSIDADE
 Rua 235, S/N - Setor Universitário - Goiânia/GO CEP 74605-050
 Fone (62) 3209.6362
 email: pgbb.goias@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE: SUSY RICARDO LEMES PONTES - Aos vinte dias do mês de agosto do ano de 2018 (20/08/2018), às 14:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. NELSON JORGE DA SILVA, MARIANA PIRES DE CAMPOS TELLES, VERA SADDI e PAULO ROBERTO DE MELO REIS, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada na Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Área V, 3º andar., procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIANGIOGÊNICA, MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DE UMA BISCHALCONA AB7 SINTÉTICA"**, em nível de **DOUTORADO**, área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, de autoria de **SUSY RICARDO LEMES PONTES**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo orientador do discente, Prof. Dr. NELSON JORGE DA SILVA JUNIOR, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1181/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Junior
 Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles
 Profa. Dra. Vera Saddi
 Profa. Dra. Paulo Roberto de Melo Reis

Aprovada / Reprovada

Aprovada - CSJ
Aprovada
Aprovada
Jorge - Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Aprovada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE**, na área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17h 40 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, Pollyana Rezende Aquino, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.
 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Junior
 Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles
 Profa. Dra. Vera Saddi
 Profa. Dra. Paulo Roberto de Melo Reis
 Secretário da Pós-Graduação: _____

Nelson Jorge da Silva Junior
Mariana Pires de Campos Telles
Vera Saddi
Pollyana Rezende Aquino

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Percival e Eliete, e ao meu esposo, Carlos César, que sempre apoiaram e incentivaram minhas escolhas de vida profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, meu refúgio e fortaleza, o qual em meio às adversidades me ajudou e até aqui Ele tem me sustentado.

Ao meu orientador **Nelson Jorge da Silva Júnior**, o qual muito além de aceitar me orientar, sempre esteve acessível para sanar minhas eventuais dúvidas, contribuindo de forma significativa sobre meus conhecimentos.

À minha co-orientadora **Maria Lígia Rodrigues Macedo**, que gentilmente aceitou me co-orientar;

Aos professores **Paulo Roberto de Melo Reis, Cléver Gomes Cardoso, Carolina Ribeiro e Silva, Lee Chen Chen, Caridad Noda Pérez, Pablo José Gonçalves e sua equipe** que contribuíram efetivamente na execução deste trabalho, cedendo seus laboratórios para o desenvolvimento dos experimentos e juntamente comigo financiaram os custos, quando necessário, para a execução da pesquisa.

À professora **Elisângela de Paula Silveira** que gentilmente auxiliou na obtenção das células tumorais do sarcoma S180.

À professora **Caridad Noda Pérez** que cedeu seu laboratório para a síntese do composto (CAB7 β).

À **Rosa Silva Lima**, pelo auxílio na síntese do composto utilizado neste estudo e conhecimentos químicos.

À **Maria Alice Montes de Sousa**, por toda contribuição prestada nos experimentos de angiogênese e mutagênese.

Ao **Jefferson Hollanda Vêras**, por ter cedido parte de seu tempo e conhecimentos para me auxiliar no teste de Ames.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade**, pela oportunidade oferecida.

“Não serão confundidos os que esperam em ti Senhor.”

Salmos 25:3

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
LISTA DE FIGURAS E TABELA	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1. O uso da Biodiversidade vegetal como fonte de grupos farmacofóricos utilizados no desenho de moléculas sintéticas	20
2.2. Generalidades sobre as chalconas	23
2.3. O mecanismo de angiogênese	28
2.3.1. Terapias antiangiogênicas	33
2.4. Ensaio de angiogênese em membrana corioalantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha	36
2.5. Mutagenicidade, carcinogênese e antimutagenicidade	39
2.6. teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos	44
2.7. Teste de mutagenicidade de Ames	46
2.8. Técnicas Espectroscópicas	49
2.8.1. Espectroscopia na região do Ultravioleta-Vísivel (UV-Vis).....	50
3. OBJETIVOS	52
3.1. OBJETIVO GERAL	52
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4. MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1. Síntese da bischalcona do tipo $\alpha\beta$ 7-ionona	53
4.1.2. Procedimento experimental	53
4.2. Células de sarcoma S180	54
4.3. Ensaio de angiogênese	54

4.3.1. Ovos embrionados.....	54
4.3.2. Substâncias utilizadas no teste da MCA.....	54
4.3.3. Procedimento experimental	57
4.3.4. Análise histológica da MCA	57
4.4. Avaliação das atividades mutagênica e antimutagênica da CAB7 β pelo teste do micronúcleo	57
4.4.1. Controles utilizados	57
4.4.2. Animais	58
4.4.3. Procedimento experimental	60
4.5. Avaliação das atividades mutagênica e antimutagênica da CAB7 β pelo teste de Ames	60
4.5.1. Cepas bacterianas	60
4.5.2. Reagentes, soluções e meios de cultura utilizados	60
4.5.3. Procedimento experimental	61
4.6. Análise de dados	62
4.7. Caracterização fotofísica da CAB7 β	65
4.7.1. Procedimento experimental	65
4.7.2. Análise dos efeitos de DMSO sobre o espectro de absorção da CAB7 β	66
4.7.2.1. Métodos computacionais	66
5. REFERÊNCIAS	67
6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	95
6.1. Manuscrito 1: Optical properties of a chalcone derivate and its antiangiogenic activity in an <i>in vivo</i> system using the sarcoma 180 cell line	95
6.2. Manuscrito 2: Presence of antigenotoxic and anticytotoxic effects of the chalcone 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6- trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one using <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> assays	131
7. CONCLUSÕES GERAIS	158
ANEXOS	161

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGS	Adenocarcinoma gástrico
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
CAB7 β	Chalcona 1E, 4E-1- (4-clorofenil) -5- (2,6,6-trimetilciclohexen-1-il) penta-1,4-dien-3-ona
CABE1	Enzima β -secretase
COX	Ciclo-oxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido,
DXR	Doxorrubicina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ENC	Eritrócito normocromático
EPC	Eritrócito policromático
EPCMN	Eritrócito policromático micronucleado
EphB2	Receptores de efrina do tipo B
GSH	Glutathiona
HCC	Hepatocarcinoma
HE	Hematoxilina e Eosina
HIF-1a	Fator induzido por hipoxia-1
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IGF-1	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1
ip	Intraperitoneal
LECT	Células leucocitárias
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MCA	Membrana Corioalantóide
MMP	Metaloproteinase
MN	Micronúcleo
NF-kB	Fator nuclear kB
NRP	Neuropilinas
pc	Peso corpóreo
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIGF	Fator de crescimento placentário
S180	Sarcoma 180
TNF	Fator de necrose tumoral
4NQO	4-nitroquinolina 1-óxido
UVA	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Esquema estrutural do núcleo fundamental das chalconas	24
Figura 2. Representação do processo angiogênico	29
Figura 3. Ligação entre as moléculas de vegf e seus receptores	30
Figura 4. Esquemática da angiogênese tumoral	31
Figura 5. (A) visão do complexo vascular de uma mca no 3° dia do desenvolvimento embrionário de uma ave; (B) MCA em crescimento e anastomose observados no 7° pós-fertilização	37
Figura 6. Ilustração de uma mca obtida no 16° dia de maturação.	38
Figura 7. Fotomicrografia de uma MCA corada com hematoxilina-eosina	39
Figura 8. Formação de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea.	40
Figura 9. Esquemática do teste de mutagenicidade de ames em cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	48
Figura 10. Resumo esquemático da espectroscopia UV-Vis	51
Figura 11. Esquema da síntese da 1E,4E-1-(4-clorofenil)-5-(2,6,6- trimetilciclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-ona	53
Figura 12. Abertura do ovo embrionado para exposição da MCA	56
Figura 13. Etapas do teste de ames para investigação de atividade antimutagênica da CAB7 β	63
Tabela 1. Derivados sintéticos de chalconas como agentes antiproliferativos	27
Tabela 2. Substâncias administradas nos grupos de tratamento	59

RESUMO

Pontes, Susy Ricardo Lemes, Me. Universidade Federal de Goiás, Setembro de 2017. **Avaliação das atividades angiogênica, antiangiogênica, mutagênica e antimutagênica de uma bischalcona $\alpha\beta 7$ sintética.** Orientador: Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior. Co-orientadora: Dra. Lígia Maria Rodrigues Macedo.

A biodiversidade vegetal é considerada a principal fonte de metabólitos secundários úteis para a síntese química. Dentre as diferentes classes de metabólitos vegetais com propriedades terapêuticas estão as chalconas. Este grupo representa uma importante classe de compostos orgânicos com inúmeras atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, anti-HIV, antibacteriana, antifúngica e anticâncer. Este estudo objetivou investigar o potencial angiogênico, antiangiogênico, mutagênico, antimutagênico da bischalcona $\alpha\beta 7$ sintética 1E, 4E-1- (4-clorofenil) -5- (2,6,6-trimetilciclohexen-1-il) penta-1,4-dien-3-ona (CAB7 β), além de suas propriedades ópticas. Para tanto, foi utilizado o teste de angiogênese com a membrana corioalantóide (CAM) de ovos embrionados de galinha (*Gallus domesticus*) com a linhagem tumoral do sarcoma S180, os testes de mutagenicidade de Ames e do micronúcleo em medula óssea de camundongos e as técnicas espectroscópicas de absorção de dois fótons (2PA), ultravioleta visível (UV-vis) e Z-Scan, respectivamente. No teste angiogênico, a CAB7 β promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) do total de vasos, junções, comprimento e calibre dos vasos sanguíneos estimulados pelas células S180, além de reduzir a presença dos elementos inflamatórios nos vasos das CAMs. Outra observação foi que as MCAs tratadas apenas com a CAB7 β apresentaram reduções significativas ($p < 0.05$) no processo angiogênico em comparação ao grupo controle negativo utilizado neste estudo. No teste de Ames a CAB7 β apresentou efeito protetor ao DNA diante da ação mutagênica da 4-nitroquinolina-1-óxido e azida sódica, e também contra a ação da doxorubicina nos modelos de co, pré e pós-tratamento pelo teste do micronúcleo. A CAB7 β nas doses de 12,5 e 50 $\mu\text{g/placa}$, apresentou um moderado perfil citotóxico na cepa TA98 de *S. typhimurium*. No teste do micronúcleo, sua maior dose (50mg/Kg p.c) também exibiu atividade citotóxica. No entanto, um perfil anticitotóxico deste composto foi observado em todas as doses testadas nas cepas

TA100 e TA-98 de *S. typhimurium* e durante o co, pré e pós-tratamento no teste do micronúcleo. Os resultados experimentais e teóricos das propriedades ópticas da CAB7 β demonstraram que o espectro de absorção deste composto possui uma intensa absorção na região do UVA, a qual está associada a uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ entre os orbitais HOMO – LUMO, com uma transferência intramolecular de carga do anel trimetilciclohexen-1-il para o anel clorofenil. Assim, concluímos que os resultados deste estudo demonstraram, portanto, a versatilidade da CAB7 β . Esta molécula pode ser um alvo promissor no desenvolvimento de novas terapias contra o câncer, em especial contra o sarcoma, devido ao potencial antiangiogênico associado à redução de elementos inflamatórios e a seus significativos efeitos antimutagênico e anticitotóxicos. Além disso, de apresentar potencialidades para o desenvolvimento de filtros fotoprotetores e na terapia fotodinâmica dada suas propriedades ópticas.

Palavras-chave: Antiangiogênico, Antimutagênico, CAB7 β , Óptico, Quimioprevenção.

ABSTRACT

Pontes, Susy Ricardo Lemes, Me. Universidade Federal de Goiás, September 2017.
Assessment of the angiogenic, antiangiogenic, mutagenic and antimutagenic activities of bischalcona $\alpha\beta 7$ synthetic. Advisor: Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior.
Co-advisor: Dr. Lígia Maria Rodrigues Macedo.

Plant biodiversity is considered the main source of secondary metabolites useful for chemical synthesis. Among the different classes of plant metabolites with therapeutic properties are chalcones. This group represents an important class of organic compounds with numerous biological activities, such as anti-inflammatory, anti-HIV, antibacterial, antifungal and anticancer. This study aimed to investigate the angiogenic, antiangiogenic, mutagenic and antimutagenic potential of bischalcone synthetic $\alpha\beta 7$ E, 4E-1- (4-chlorophenyl) -5- (2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl) penta-1,4-dien -3-one (CAB7 β), besides its optical properties. The angiogenesis test with the chorioallantoic membrane (CAM) of embryonated chicken eggs (*Gallus domesticus*) with the S180 sarcoma tumor line, the Ames and micronucleus mutagenicity tests in mouse bone marrow, and the techniques spectroscopic two-photon absorption (2PA), visible ultraviolet (UV-vis) and Z-Scan, respectively. In the angiogenic test, CAB7 β promoted a significant reduction ($p < 0.05$) in the total vessels, junctions, length and caliber of the blood vessels stimulated by the S180 cells, besides reducing the presence of the inflammatory elements in the vessels of the CAMs. Another notable observation was that MCAs treated with CAB7 β only showed significant reductions ($p < 0.05$) in the angiogenic process compared to the negative control group used in this study. In the Ames test, CAB7 β showed a protective effect on DNA against the mutagenic action of 4-nitroquinoline-1-oxide and sodium azide, and also against the action of doxorubicin in co, pre and post-treatment models using the micronucleus test. CAB7 β at the doses of 12.5 and 50 μg / plate presented a moderate cytotoxic profile in TA98 strain of *S. typhimurium*. In the micronucleus test, its higher dose (50mg / kg p.c.) also exhibited cytotoxic activity. However, an anti-cytotoxic pertituent of this compound was observed at all doses tested in TA100 and TA-98 strains of *S. typhimurium* and during co, pre and post-treatment in the micronucleus test. The experimental and theoretical results of the optical properties

of CAB7 β demonstrated that the absorption spectrum of this compound has an intense absorption in the region of the UVA, which is associated to a transition of the type $\pi \rightarrow \pi^*$ between the HOMO - LUMO orbitals, with a transfer intramolecular charge ratio of the trimethylcyclohexen-1-yl ring to the chlorophenyl ring. Thus, we conclude that the results of this study demonstrated, therefore, the versatility of CAB7 β . This molecule may be a promising target in the development of new therapies against cancer, especially against sarcoma, due to the antiangiogenic potential associated with the reduction of inflammatory elements and their significant anti-mutagenic and anti-cytotoxic effects. In addition, to present potential for the development of photoprotective filters and in photodynamic therapy given their optical properties.

Key-words: Antiangiogenic, Antimutagenic, CAB7 β , Optical, Chemoprevention.

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia, em sua abrangência, possui relação com a exploração tecnológica da biodiversidade contribuindo assim para a saúde do homem. Dessa forma, em projetos de identificação, exploração e avaliação da biodiversidade vegetal, por exemplo, é fundamental que metodologias científicas e procedimentos biotecnológicos especiais sejam aplicados, especialmente aqueles relacionados com a biologia celular e molecular, fitoquímica, fitofarmacologia e taxonomia (Garcia, 1995; Carvalho & Ferreira, 2013).

A biodiversidade vegetal possui uma significativa contribuição na medicina moderna, uma vez que, que pode favorecer a detecção de moléculas com variadas atividades biológicas. Os vegetais também fornecem compostos que podem ser quimicamente modulados, a fim de torná-los mais eficientes ou menos tóxicos. Além disso, os compostos naturais são amplamente utilizados como protótipos na produção de fármacos sintéticos com inúmeras atividades terapêuticas (Turolla & Nascimento, 2006; Atanasov et al., 2015).

As estratégias utilizadas no delineamento de novos fármacos possuem uma variedade de aplicações através do monitoramento de indicadores celulares ou bioquímicos que incluem desde as etapas de identificação de mudanças fisiológicas ou metabólicas provocadas pelo estado de doença, até a análise dos efeitos dos fármacos sobre o organismo (Guido et al., 2010).

A identificação de moléculas utilizadas na produção de novos fármacos ocorre geralmente pela identificação e explicação de um alvo para o composto, baseado no conhecimento dos efeitos biológicos, alterações químicas da molécula e triagem de inúmeros produtos naturais ou sintéticos com atividade biológica (Hughes et al., 2011).

Importantes estudos envolvendo ensaios com estes compostos apontam que suas atividades biológicas são variadas. Alguns exemplos importantes são: atividade antimicrobiana, antioxidante, analgésica, antiúlcera, inseticida, anticâncer anti-inflamatória, cicatricial, além de atuarem no tratamento de doenças do trato digestivo ou intestinal (Viegas-Junior, 2003; Toscan, 2010; Lima 2014).

A análise das substâncias vegetais ativas pode em determinadas situações, ser complexa e demandar tempo (Sasidharan et al., 2011). Neste sentido, a síntese

de novas moléculas e o estudo de seus potenciais farmacológicos surge como alternativa e, atualmente, tem contribuído significativamente no desenvolvimento de novas terapias. As moléculas sintéticas baseadas em grupos farmacofóricos de substâncias naturais permitem a comprovação de uma dada substância, análise de atividades biológicas e obtenção de análogos sintéticos com potencial efeito farmacológico (Montanari & Bolzani, 2001; Costa, 2009).

Através da síntese química, os compostos naturais podem ser melhorados e tal melhoramento permite que os compostos sintéticos consigam apresentar um maior efeito desejado em doses reduzidas quando comparados aos compostos naturais, além de não sofrerem, por vezes uma rápida metabolização (Montanari & Bolzani, 2001, Viegas-Jr et al., 2006). Estudos em biotecnologia envolvendo a prospecção farmacológica de compostos sintéticos do tipo alcaloides e chalconas, por exemplo, têm revelado o potencial destes compostos para o tratamento de doenças como, gliomas malignos, câncer de mama e osteossarcoma (Oliveira, 2013; Silva et al., 2016; Bortolotto et al., 2017).

As chalconas (cetonas α,β -insaturadas que possuem um núcleo 1,3-diarilprop-2-en-1-ona²¹ e um esqueleto C6-C3-C6) são precursoras da biossíntese de flavonoides e são amplamente encontradas nos vegetais, em especial nas pétalas das flores onde contribuem na polinização vegetal, visto que sua cor amarela e aroma são atrativos para insetos e pássaros (Dimmock et al., 1999; Zuanazzi, 2002).

Compostos baseados em chalconas apresentam uma estrutura molecular π conjugada, onde os elétrons são delocalizados por toda a extensão da molécula. Isto lhes proporciona interessantes propriedades ópticas, como intensa absorção na região UV, que as tornam potenciais candidatos para aplicações na medicina como agente fotoprotetores e na fotônica (Ramkumar et al., 2013; Kiran et al., 2014; Abegão et al., 2016).

Estudos apontam que as chalconas apresentam importantes atividades biológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antimutagênica e anti-HIV (Frölich et al., 2005; Ku et al., 2010; Mohamad et al., 2010; Abdula, 2013). Um estudo anterior com a chalcona sintética 1E, 4E-1- (4-clorofenil) -5- (2,6,6-trimetilciclohexen-1-il) penta-1,4-dien-3-ona (CAB7 β) demonstrou que este composto possui atividade anticâncer, *in vitro*, para as seguintes linhagens de células tumorais:

SF-295 (sistema nervoso central), HCT-116 (câncer de cólon) e OVCAR-8 (carcinoma de ovário) (Lima et al., 2016).

A ação das chalconas e seus derivados também têm proporcionado novas perspectivas para estudos posteriores visando à descoberta de potenciais agentes contra diferentes condições patológicas associadas à doenças imunes, por exemplo (Kim, 2013; Bukharl et al., 2014; Rizvi et al., 2014).

Com isso, o presente estudo foi projetado para investigar as propriedades ópticas e o potencial angiogênico, antiangiogênico, mutagênico e antimutagênico da chalcona sintética CAB7 β .

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O uso da Biodiversidade vegetal como fonte de grupos farmacofóricos utilizados no desenho de moléculas sintéticas

A cultura humana tem sido influenciada pela biodiversidade, em especial, pelas espécies de plantas identificadas como detentoras de propriedades medicinais. Esta influência foi estabelecida por um longo processo de seleção realizada por populações antigas em todo o mundo. Atualmente, o conhecimento sobre as propriedades medicinais das plantas tem sido o foco de pesquisas científicas e das sociedades em todo o mundo devido aos grandes avanços que a ciência vegetal proporcionou (Valli et al., 2012; Atanasov et al., 2015).

Muitos compostos farmacológicos são obtidos a partir de fontes naturais, sintéticas ou semi-sintéticas. O ambiente natural representa a fonte mais significativa na detecção de novos compostos terapêuticos visto que, na medicina alternativa, os vegetais constituem o alvo dominante devido à biodiversidade de seus componentes e à sua diversidade química e estrutural a qual permite a detecção de grupos farmacofóricos (grupos moleculares funcionais que conferem ação farmacológica a um determinado medicamento) (Mathur & Hoskins, 2017).

A biodiversidade vegetal do Brasil, por exemplo, considerada a mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies catalogadas, representando quase 19% da flora mundial, é amplamente estudada devido ao grande potencial para o desenvolvimento de protótipos de fármacos. Importantes exemplos de plantas medicinais brasileiras incluem a *Spiranthera odoratissima* (manacá), *Achyrocline satureioides* (marcela) e *Carapa guianensis* (andiroba), as quais possuem metabólitos que lhes conferem atividade anti-inflamatória, antibacteriana e cicatricial (Matos et al., 2003; Penido et al., 2006; Mota et al., 2011; Mello et al., 2013; Steege et al., 2015).

Ainda no Brasil, os vegetais *Lychnophora ericoidis* (arnica), *Croton antisiphiliticus* (pé-de-perdiz), *Alibertia* sp. (marmelo) e *Dypterix alata* (barú) são utilizados popularmente como anti-inflamatórios, antirreumáticos e calmantes (Vila-Verde et al., 2003). Algumas espécies com atividade cicatrizante detectadas em estudos científicos são: *Jatropha multifida* (flor-de-coral), *Caryocar coriaceum*

(pequi), *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Mauritia flexuosa* (buriti) (Buch et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Batista et al., 2012).

Um aspecto relevante sobre os vegetais com propriedades medicinais é que das 280 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo é de drogas sintéticas baseadas nos metabólitos secundários de plantas (Dias et al., 2012). Segundo Veeresham (2012) cerca de 50% das drogas aprovadas nos últimos 30 anos são direta ou indiretamente provenientes de produtos naturais. Embora existam desafios no campo metodológico relativo à descoberta de novas drogas, os produtos naturais continuam a produzir importantes alvos clínicos adicionais. Estes compostos continuam a ser uma base fundamental de novos medicamentos, particularmente em terapias anti-câncer, onde importantes exemplos incluem a vincristina, vinblastina e paclitaxel (Demain & Vaishnav, 2011).

As espécies vegetais produzem uma grande variedade de metabólitos secundários que desempenham um papel essencial em sua sobrevivência, bem como na manutenção do equilíbrio ambiental. Esses compostos naturais também desempenham funções importantes na interação planta / planta e planta / inseto, resistência contra pragas e doenças, atração de polinizadores e interação com microrganismos simbióticos (Ota & Ulrich, 2017). Portanto, a biodiversidade vegetal é considerada como verdadeiro tesouro para a descoberta de novas drogas e como modelo no desenho de drogas semi-sintéticas ou totalmente sintéticas (Mathur & Hoskins, 2017).

Os metabólitos secundários dos vegetais se encontram dispostos em quantidades muito baixas na planta, o que, muitas vezes, inviabiliza sua obtenção. Para adquirir 1 kg do paclitaxel (composto ativo de Taxol®), por exemplo, são necessárias mais de três mil árvores de *Taxus baccata* (teixo) (Milen, 2011). Além disso, apesar dos evidentes progressos alcançados pelas pesquisas relativas à domesticação das plantas medicinais, a exploração da biodiversidade com intuito de detectar novos compostos apresenta dificuldades em seu desenvolvimento devido, especialmente, às leis ambientais relativas a exploração mundial de espécies vegetais, a qual tem provocado um elevado impacto sobre as características ecológicas (padrão de distribuição geográfica, biologia da reprodução, taxa de crescimento, sucessão florestal) e genéticas (conhecimento da variabilidade

genética dentro de populações, tamanho efetivo populacional, sistema reprodutivo e fluxo gênico) dos vegetais nas regiões endêmicas (Joly et al., 2011).

Neste sentido, a síntese química junto à biotecnologia tem buscado recursos que visam preservar a biodiversidade e desenvolver novos medicamentos como alternativa à produção dos metabólitos secundários correspondentes (Milen, 2011; Atanasov et al., 2015). Mesmo quando os produtos naturais bioativos não são identificados com a potência ideal ou propriedades farmacológicas esperadas para o desenvolvimento de novos medicamentos, suas estruturas químicas podem ser utilizadas como modelos valiosos para o projeto de novos análogos com propriedades biológicas otimizadas. Atualmente, existem inúmeros medicamentos e produtos farmacêuticos de síntese total que foram inspirados por moléculas naturais isoladas da biodiversidade, especialmente de espécies vegetais (Valli et al., 2012).

A produção de análogos sintéticos a partir de metabólitos secundários de vegetais já conhecidos por suas propriedades farmacológicas tem sido desenvolvida, principalmente, em virtude da complexidade de obtenção do composto ativo e dos custos elevados no desenvolvimento do produto (Valli et al., 2012; Lahlou, 2013; Atanasov et al., 2015).

Alguns exemplos incluem a síntese de (originalmente obtidos da *Betula alba*) aplicados no tratamento de gliomas, da Kavaína (obtida da *Piper methysticum*) utilizada como agente analgésico e do Lapachol (isolados da *Tabebuia impetiginosa*) utilizado no tratamento do câncer (Kormann et al., 2012; Ackermann et al., 2017; Hussain & Green, 2017).

Entre 2001 e 2010 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou 16 novos medicamentos derivados de plantas, dentre os quais, a maioria foi obtida através da modificação química. Um exemplo é o brometo de tiotrópio, um derivado de atropina (Spiriva®) usado no tratamento de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Alvarado-Gonzalez & Arce, 2015).

O Taxol®, também aprovado pela FDA, é considerada uma das drogas antineoplásicas mais importantes no mercado farmacêutico. Sua molécula, paclitaxel, é considerada complexa e devido à dificuldade de sua extração e formulação, bem como a crescente demanda pelo composto, novos análogos do Taxol® com propriedades melhoradas foram desenvolvidos por síntese total (Expósito et al., 2009).

Um exemplo é o Docetaxel (Taxotere®), um análogo semi-sintético do paclitaxel, com maior atividade em relação ao produto natural e possui melhores propriedades farmacocinéticas, como solubilidade. Este medicamento foi aprovado pela FDA em 2006 para o tratamento do câncer de cabeça, pescoço, mama, gástrico e próstata (Jimenez et al., 2011; Fridlender et al., 2015).

Outro interessante exemplo é a cafeína a qual contribuiu para a descoberta do citrato de sildenafil (Viagra®). Este fármaco, lançado no Brasil no final da década de 90, teve sua estrutura química planejada a partir do zaprinaste (derivado triazolopirimidinônico), um inibidor de fosfodiesterase (PDE) mais seletivo que a trimetilxantina que o inspirou (Barreiro & Bolzani, 2009).

Os pesquisadores têm buscado, portanto, a melhoria contínua das drogas, visando alcançar uma maior disponibilidade dos medicamentos comercializados. Neste sentido, a biodiversidade é vista como a principal fonte de metabólitos secundários úteis para a síntese química. No entanto, a identificação e a análise funcional dos compostos naturais implicam atualmente no uso de diferentes estratégias metodológicas capazes de determinar rapidamente os dados físico-químicos em concentrações muito baixas de compostos bioativos aliados com o rastreamento de alto rendimento para favorecer a aplicação de ensaios biológicos (Lahlou, 2013; Mathur & Hoskins, 2017).

Além disso, a necessidade de novas drogas para o tratamento de doenças atualmente sem uma cura efetiva, como o Alzheimer e Parkinson, é clara, assim como a necessidade de detecção de medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias resistentes e o câncer, para os quais os produtos farmacêuticos atualmente disponíveis não são totalmente eficazes (Valli et al., 2012).

Nesta perspectiva, a biodiversidade continuará, portanto, a representar o principal alvo para a descoberta de fármacos, uma vez que sua disponibilidade de modelos estruturais completamente novos, que são essenciais para o desenho de drogas novas, é imensurável (Ramesha et al., 2011).

2.2. Generalidades sobre as Chalconas

Dentre os principais grupos de metabólitos secundários vegetais estão os terpenos (piretroides, carotenólídeos, saponinas), compostos fenólicos (lignina, fitoalexinas, taninos) e compostos nitrogenados (Corrêa et al., 2008). Alguns metabólitos secundários apresentaram papel significativo na indústria farmacêutica visto que uma grande parcela dos atuais fármacos comercializados foi desenvolvida por meio sintético com sua estrutura química baseada em diferentes metabólitos. Estes compostos apresentam, em geral, grandes potencialidades para a detecção de diferentes variedades de moléculas bioativas em virtude de sua diversidade química, podendo apresentar diversas atividades em alvos celulares (Gu et al., 2013).

Pesquisas envolvendo ensaios para a detecção de potencialidades biológicas dos metabólitos secundários apontam que suas atividades são variadas, incluindo, por exemplo, ação antimicrobiana, antioxidante, antimutagênica, analgésica, antiúlcera, antitumoral, anti-inflamatória e cicatricial (Viegas-Junior, 2008; Bhattacharya, 2011; Batista et al., 2012; Sousa et al., 2014; Carneiro et al., 2016).

Uma importante classe de metabólitos secundários de vegetais que tem ganhado destaque em estudos científicos relativos ao desenvolvimento de fármacos são as chalconas e seus derivados. As chalconas são definidas quimicamente como cetonas α,β -insaturadas, que possuem o núcleo 1,3- difenil-2-propen-1-ona. Apresentam dois anéis aromáticos conjugados por uma porção olefina e um grupo carbonilo. Um dos anéis (anel A) está ligado diretamente no grupamento cetona e outro (anel B) à dupla ligação (Figura 1) (Zuanazzi, 2002; Nowakowska, 2007). Esta classe de metabólitos é precursora da biossíntese de flavonoides e isoflavonóides dos vegetais (Dyrager et al., 2011; Ngaki et al., 2012).

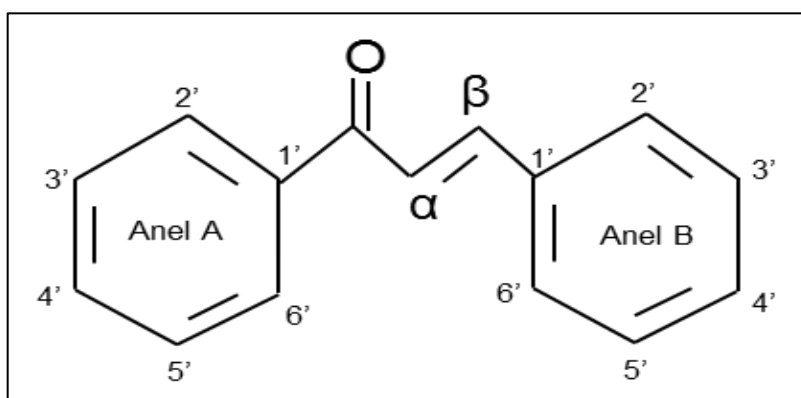


Figura 1. Esquema estrutural do núcleo fundamental das chalconas. Adaptado de Ribeiro (2015).

Ao longo dos últimos anos, uma crescente atenção foi dedicada a estes compostos devido às suas atividades biológicas. As chalconas representam uma das classes mais comuns de compostos encontrados em nossa dieta diária. Elas são especialmente abundantes em frutos (laranja, maçã, tomate), verduras e legumes (alface, brotos de feijão, batatas) e em folhas e pétalas, atuando na polinização vegetal, visto que sua cor amarela é atrativa para insetos e pássaros os quais polinizam outros vegetais (Dao et al., 2011; Orlikova et al., 2011).

Embora as chalconas ocorram naturalmente, elas podem ser sintetizadas em maiores quantidades através de um mecanismo eficiente e simples. Resumidamente, pela síntese através da condensação de Claisen-Schmidt (tipo de reação química orgânica que ocorre com a condensação entre cetonas e aldeído na presença de catalisadores básicos ou ácidos) que permite a aquisição de inúmeros compostos, uma vez que existem diversos benzaldeídos e acetofenonas comerciais que, quando combinados, podem fornecer a variedade estrutural pretendida. Além disso, o efeito farmacológico desejado pode ser potencializado através de substituintes nas moléculas de chalconas (Alcaraz et al., 2004; Rao et al., 2004; Nowakowska, 2007; Chiaradia et al., 2008; Findik et al., 2009; Mai et al., 2014).

Sabe-se que o desenvolvimento de novas moléculas e o estudo de seus potenciais farmacológicos é imprescindível no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de inúmeras doenças. Neste sentido, a síntese de moléculas baseadas em grupos farmacofóricos de substâncias naturais, como as chalconas, apresenta grande relevância, visto que a diversidade de efeitos farmacológicos das chalconas se deve, em grande parte, às inúmeras possibilidades de substituições em seus anéis aromáticos (Montanari & Bolzani, 2001; Costa, 2009).

Algumas chalconas isoladas das espécies vegetais *Dorstenia turbinata* e *Dorstenia barteri*, por exemplo, são capazes de inibir em células de glioblastoma (U87), a secreção da metaloproteinase (MMP) do tipo 2 a qual é um pré-requisito no processo de degradação da matriz celular extracelular e progressão tumoral (Ngameni et al., 2006, 2007).

Estudos realizados com derivados de chalconas sintéticas demonstraram que estes compostos também apresentam inúmeras propriedades biológicas, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, citotóxica, antinociceptiva e anti-inflamatórias através da inibição da fosfolipase A₂, ciclo-oxigenase (COX), lipoxigenases,

produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiotaxia de neutrófilos, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Maria et al., 2008; Kim et al., 2013; Razmi et al., 2013; Vasconcelos et al., 2013; Božić et al., 2014; Bukhari et al., 2014; Jantan et al., 2014; Gupta & Jain, 2015).

Alguns diarilpirazóis sintetizados a partir de chalconas contendo a porção fenilsulfona ou carbonitrilo, demonstraram atividade anti-inflamatória e efeito anti-ulcerogênico mais efetivos quando comparados ao Indocid® (medicamento de referência no tratamento de inflamações gastrointestinais) (Nassar et al., 2011).

Os análogos sintéticos da 2,6-bis-benzilidina-ciclo-hexanona extraída da curcumina (substância encontrada no pó extraído da raiz da *Curcuma longa*), apresentaram efeitos inibitórios sobre células de câncer de adenocarcinoma gástrico (AGS) e carcinoma de células escamosas esofágicas (KYSE30). Além disso, um dos análogos [2,6-Bis- (3-metoxi-4-propoxi-benzilideno) – ciclohexanona] apresentou uma citotoxicidade 17 vezes maior sobre as células tumorais quando comparado a curcumina (Alibeike et al., 2017).

Outra chalcona, 2'-hidroxi-3,4,4', 5,6'-pentametoxiquocon (2), apresentou citotoxicidade por interrupção do processo mitótico em células do adenocarcinoma de mama (MCF-7) e do câncer de pulmão (NCI-H460). Este composto interferiu na qualidade do fuso mitótico, onde o mesmo se encontrou colapsado e com cromossomos distribuídos aleatoriamente. Além disso, o composto induziu um atraso prolongado (até 14 h) na mitose, culminando na morte celular maciça pela formação de protrusões na membrana plasmática (blebbing) (Fonseca et al., 2016).

Outros relatos sobre a atividade citotóxica das chalconas correlacionam esse efeito com o potencial anticâncer destes compostos, uma vez que podem reagir com grupos tióis intracelulares. A adição de porções nucleofílicas em cetonas α - β -insaturadas, como a glutathiona (GSH), através de uma adição está relacionada com o potencial inibitório das chalconas sobre o crescimento tumoral. Essa característica da reação também demonstra que dupla ligação presente nas chalconas possui um papel fundamental para o efeito antitumoral (Guzy et al., 2010; Maydt et al., 2013).

Derivados de chalconas sulfonamidas demonstraram atividade antimalárica e antiparasitária, *in vitro*, contra o *Plasmodium falciparum* (Domínguez et al., 2005). Alguns derivados de chalconas sulfonamidas podem inibir a atividade de enzimas α -glucosidases, as quais são fundamentais no metabolismo dos carboidratos e

representam um importante alvo no tratamento da diabetes tipo 2, além de inibir a enzima β -secretase (BACE1) a qual possui relação no desenvolvimento de Alzheimer (Bharatham et al., 2008; Lee et al., 2009).

Baseado nas potencialidades das chalconas obtidas a partir da biodiversidade vegetal, pesquisas envolvendo a síntese química destes compostos têm sido desenvolvidas a fim de aprimorar a obtenção e os efeitos farmacológicos destes compostos. Uma grande variedade de chalconas sintéticas foi desenvolvida para identificar, por exemplo, qual a estrutura mais eficiente para inibir a proliferação de células cancerosas (Lee et al., 2009; Liu & Go, 2007; Ducki et al., 2009; Quintin et al., 2009; Yang et al., 2009; Kong et al., 2010; Lima et al., 2016) (Tabela 1). A ação das chalconas e seus derivados têm proporcionado, portanto, novas perspectivas para diversos estudos de farmacologia, bioquímica e biotecnologia vegetal em união à química medicinal visando à descoberta de potenciais agentes que atuem contra diferentes condições patológicas (Guido et al., 2010; Milen, 2011; Lee et al., 2015).

Tabela 1. Derivados sintéticos de chalconas como agentes antiproliferativos

Derivado	Vegetal de origem (se disponível)	Processos celulares direcionados	Referência
15 dihydro artemisinina	Artemisinina (<i>Artemisia annua</i>)	Viabilidade celular	Yang et al. (2009)
Derivados polioxigenados no anel A	Tangeretin (<i>Citrus</i>)	Proliferação celular	Quintin et al. (2009)
Análogos de CA-4: cis-6, trans-6 do ácido borônico	Combretastatina A4 (<i>Combretum caffrum</i>)	Proliferação celular Inibição da formação de tubulinas	Kong et al. (2005)
4 análogos de chalconas de ácido borônico	Combretastatina A4 (<i>Combretum caffrum</i>)	Proliferação celular Inibição da formação de tubulinas durante a angiogênese	Kong et al. (2010)
97 chalconas do tipo combretastatina	Combretastatina A4 (<i>Combretum caffrum</i>)	Viabilidade celular Ciclo celular Inibição da formação de tubulinas	Ducki et al. (2009)

2,6-Bis- (3-metoxi-4-propoxi-benzilideno) – ciclohexanona	2,6-Bis-benzilidina-ciclo-hexanona (<i>Curcuma longa</i>)	Apoptose Ciclo celular	Alibeike et al. (2017)
65 derivados com funcionalidades de base	-	Proliferação celular	Liu & Go (2007)
19 derivados metoxilados	-	Proliferação celular Viabilidade celular durante a inflamação	Bandgar et al. (2010)
17 derivados de piperidinas chalconas	-	Ciclo celular Proliferação celular	Liu & Go (2006)
4 '- (p-tolueno sulfonilamida) -4-hidroxichalcona	-	Proliferação celular	Lee et al. (2009)
1E, 4E-1- (4-clorofenil) -5- (2,6,6-trimetilciclohexen-1-il) penta-1,4-dien-3-ona	-	Proliferação celular	Lima et al. (2016)

2.3. O mecanismo de angiogênese

A angiogênese é definida pelo crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de uma vasculatura pré-existente. A formação e crescimento dos vasos nos indivíduos apresenta um constante mecanismo regulatório e sua ativação ocorre sob condições específicas, tais como na cicatrização de feridas, ovulação, nidação, crescimento, dentre outros. No entanto, este mecanismo também possui importante relação com eventos patológicos, tais como o desenvolvimento de doenças reumáticas, psoríase, retinopatia diabética, aterosclerose, síndrome do ovário policístico, doença cardíaca isquêmica, além de neoplasias malignas (Nordlie et al., 2006; Peitsids & Agrawal, 2012; Sankar et al., 2017; Vanlandingham et al., 2017).

A estimulação das células do endotélio vascular pelas citocinas angiogênicas permite a liberação de proteases as quais promovem a degradação da lâmina basal

das células endoteliais. Assim, estas células acabam migrando até a região do estroma perivascular e se dividem para iniciar o brotamento capilar. A migração se destina no sentido do local estimulado por fatores angiogênicos, onde o broto endotelial se estende, assumindo uma conformação tubular, e forma novos vasos (Figura 2). Na regulação da angiogênese existe um amplo sistema de regulação o qual é constituído por fatores pró e antiangiogênicos (Karamysheva, 2008; Ucuizian et al., 2010).

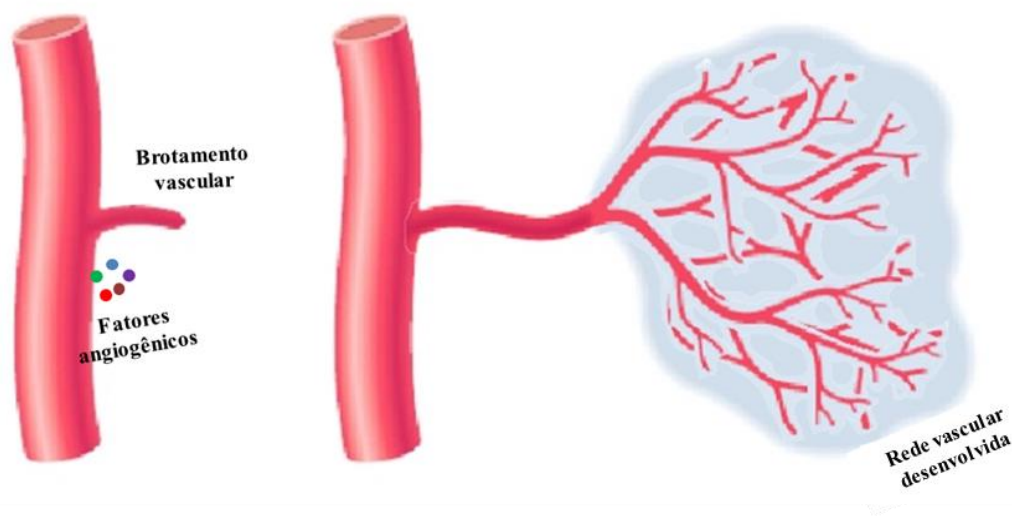


Figura 2. Representação do processo angiogênico (Clapp et al., 2009).

Diversos peptídeos são reconhecidos por apresentarem atividade regulatória no mecanismo de angiogênese, dentre eles estão os fatores ácido e básico de crescimento de fibroblastos (aFGF e bFGF), angiogeninas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), dentre outros (Valiatti et al., 2011).

Segundo Karamysheva (2008) o principal evento relacionado com a regulação da angiogênese fisiológica e patológica é a cascata de sinalização que envolve o VEGF, em virtude das propriedades biológicas desse fator. Este é fundamental para a sobrevivência das células endoteliais *in vitro* e *in vivo* visto que, na ausência de nutrientes, ele inibe o processo apoptótico nestas células. O VEGF também possui um potencial indutor na permeabilidade vascular cerca de 50.000 vezes maior que a histamina (Cotran et al., 1999).

Atualmente existem sete membros na família VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e o fator de crescimento placentário (PlGF) (Figura 3). Todos eles apresentam um domínio comum de homologia VEGF. Destes fatores, o VEGF-A possui maior influência no processo angiogênico (Pourgholami & Morris, 2008). O VEGF-A é uma glicoproteína altamente expressa em tecidos normais do pulmão, rins, coração e glândula adrenal. As menores concentrações deste fator são detectadas no fígado, baço e mucosa gástrica (Hoeben et al., 2004). Todos estes fatores podem ativar um ou mais receptores conhecidos (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) (Cross et al., 2003; Pourgholami & Morris, 2008).

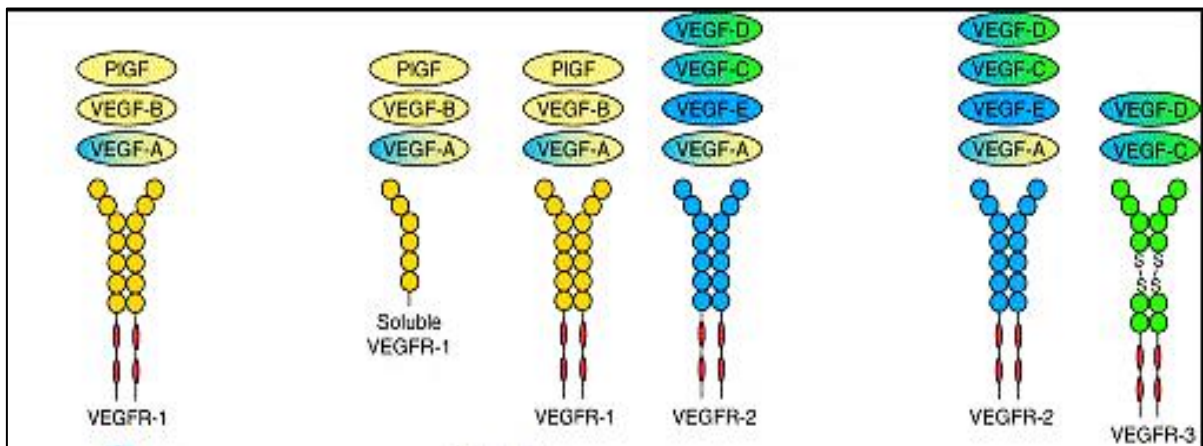


Figura 3. Ligação entre as moléculas de VEGF e seus receptores (Cross et al., 2003).

A angiogênese também é considerada um mediador-chave no desenvolvimento de tumores. Um estudo realizado por Muthukkaruppan et al. (1982) revelou diferentes comportamentos de células cancerígenas presentes em diferentes regiões da íris ocular. As células cancerosas na porção da íris sem circulação sanguínea cresceram cerca de 1-2 mm³ de diâmetro e depois pararam, no entanto, na região em que havia circulação, estas células cresceram além de 2 mm³. A ausência de vasos sanguíneos resulta em hipóxia e permite que os tumores se tornem necróticos ou mesmo apoptóticos (Ribatti & Nico, 2016).

Há um consenso geral de que VEGF e seu receptor, VEGFR-2, são os reguladores mais proeminentes da angiogênese. A sinalização do VEGF estimula as vias celulares que levam à formação e ramificação de novos vasos sanguíneos

tumorais, promove rápido crescimento do tumor e favorece o potencial metastático (Zhao & Adjei, 2015).

O principal estímulo para a expressão do VEGF é a presença de hipóxia, onde nesta condição o VEGF é ativado através do Fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1). O HIF-1 é regulado principalmente por uma mudança na concentração de oxigênio, pela ativação de oncogenes e por mutação em genes supressores de tumor. Em condições hipóxicas, HIF-1 induz a expressão da isoenzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) a qual medeia a maioria dos efeitos proangiogênicos através da produção de prostaglandinas, como a E2 responsável pela vasodilatação (Yao et al., 2011; Jin et al, 2014).

Na iniciação da angiogênese tumoral, as células produzem e liberam fatores de crescimento angiogênicos, como a angiogenina 1, VEGF, aFGF, bFGF e PDGF (Figura 4). Quando esses fatores se ligam aos seus receptores específicos correspondentes localizados nas células endoteliais de vasos sanguíneos pré-existent, várias vias de transdução de sinal são ativadas para promover a ativação de células endoteliais (Niu & Chen, 2010). Posteriormente, os vasos originais sofrem alterações morfológicas significativas, incluindo o aumento do diâmetro, a degradação da membrana basal, aumento do número de vasos, diminuição e desprendimento das células mesenquimais associadas às paredes de vasos sanguíneos (pericitos) (Dudley, 2012).

Um importante aspecto na angiogênese tumoral ocorre quando o PDGF inicia a proliferação dos pericitos e migração dos novos brotos capilares. Na extremidade do broto endotelial, as células secretam de modo intenso as MMPs para facilitar a degradação da matriz extracelular e invasão celular (Figura 4) (Coussens et al., 2000; Deryugina & Quigley, 2015). As moléculas de adesão à superfície celular, como as integrinas, também desempenham um papel importante na migração das células endoteliais e em contato com a matriz do tumor extracelular, facilitando a sobrevivência celular (Foubert & Varner, 2012). Após essas etapas, os vasos recém-formados são estabilizados através do recrutamento de células musculares lisas e pericitos (Cao, 2009).

As células endoteliais vasculares se dividem em média a cada 1000 dias e a angiogênese é estimulada quando os tecidos tumorais requerem nutrientes e oxigênio. Este processo é regulado por moléculas que ativam e inibem a

angiogênese, no entanto, o aumento da regulação da atividade de fatores angiogênicos não é suficiente para que a angiogênese tumoral ocorra. Os reguladores do crescimento de vasos também são regulados (Nishida et al., 2006).

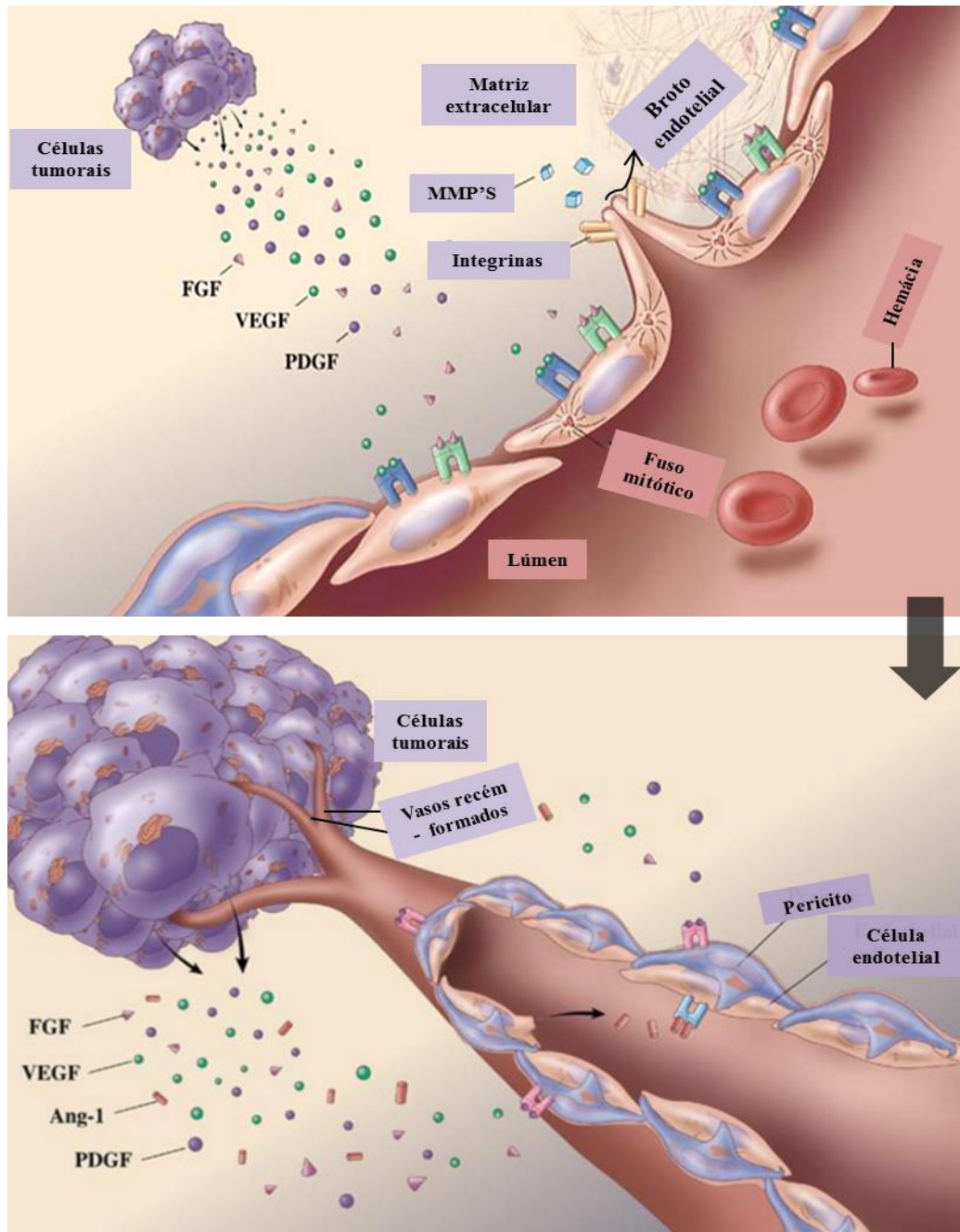


Figura 4. Esquemática da angiogênese tumoral (Adaptado de Su et al., 2007).

A alta expressão de VEGF e outros fatores angiogênicos tem sido observada em diversos tipos de tumores. O VEGF é um importante mediador da angiogênese

tumoral, e sua regulação ocorre pela expressão de oncogenes e por outros fatores de crescimento (Fator de Crescimento Epidérmico - EGF, α TGF e β TGF, FGF, Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1 – IGF1, PDGF, dentre outros) e hipóxia. (Carmeliet, 2003; Virrey et al., 2008). Em angiossarcomas, tumores malignos de origem endotelial, há uma significativa associação entre sua ocorrência e a alta expressão de VEGF. Nesses tumores, as endoglinas (glicoproteínas cruciais no desenvolvimento da angiogênese) são reguladas pela inibição da expressão de VEGF (Wilky et al., 2017). A alta expressão dos receptores VEGFR também está relatada em diferentes tumores, como o sarcoma de kaposi, câncer de ovário e melanoma (Gutierrez et al., 2013; Lim et al., 2014; Lund et al., 2016).

Dados de experimentos *in vitro* indicam que o VEGF-A atua no desenvolvimento e metástase de cânceres de mama. Este fator está relacionado com o crescimento dos vasos sanguíneos das células deste tipo de câncer, uma vez que promove um aumento na neovascularização, vasodilatação e maturação dos vasos, atuando através de efeitos autócrinos seletivos para estimular a proliferação, sobrevivência, adesão e quimiotaxia das células tumorais (Lee et al., 2007; Hervé et al., 2008) .

A produção de VEGF por células tumorais do câncer de mama e a ativação de receptores de VEGF na superfície de células cancerosas indicam a existência de um ciclo de sinalização autócrino distinto o qual permite que estas células promovam seu próprio crescimento, sobrevivência e migração por fosforilação e ativação de VEGFR -1/2 ou de neuropilinas (NRP1 ou NRP2) induzida por VEGF (Parker et al., 2012a,b).

2.3.1. Antiangiogênese

Em virtude da significativa relevância do mecanismo angiogênico sobre eventos fisiológicos e patológicos, diversos estudos relativos à descoberta de fatores antiangiogênicos têm sido conduzidos (Goel & Mercurio, 2013). Terapias direcionadas apenas na inibição de VEGF ou em associação com a quimioterapia, tem sido utilizada no tratamento de diferentes tumores (Ellis & Hicklin, 2008). Pesquisas envolvendo mecanismos de inibição de fatores angiogênicos como o

VEGF demonstraram que a inibição deste fator promove a apoptose destas células do câncer de mama (Falah et al., 2017).

A inibição de VEGFA em carcinomas escamosos também promoveu a regressão tumoral (Beck et al., 2011). A quimiotaxina-2 derivada de células leucocitárias (LECT2) humanas, uma vez expressa, pode suprimir a proliferação de células de hepatocarcinoma (HCC) induzidas por VEGF, a migração e a formação de vasos *in vitro* e *in vivo*. Sua atividade está relacionada especificamente com a redução da fosforilação de tirosina do VEGFR2, o que pode inibir a angiogênese tumoral (Chen et al., 2016). O anticorpo monoclonal Vanucizumab, também apresenta atividade antitumoral em células de câncer de cólon (Colo205) através de um mecanismo antiangiogênico sobre a expressão da Angiogenina-2 e VEGF-A (Baker et al., 2016).

A atividade antiangiogênica de inúmeros compostos vegetais também tem sido relatada em alguns estudos. As antraquinonas do *Rheum rhabarbarum* (ruibarbo), por exemplo, inibiram a angiogênese através de uma redução na expressão de fatores pró-angiogênicos, tais como citocinas pró-inflamatórias, NF- κ B e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Hu et al., 2014).

O extrato metanólico da casca do caule de *Balanite aegyptiaca* demonstrou propriedades antiangiogênicas em modelo experimental utilizando a artéria aorta de rato, através da inibição de VEGF, bem como pela interrupção da migração de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e a formação de novos vasos sanguíneos (Hassan et al., 2016).

O extrato bruto da *Salvia triloba* apresentou atividade antiangiogênica no teste aórtico em ratos, além de inibir a proliferação de HUVEC e o crescimento de vaso recém formado na membrana corioalantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha. Este extrato também apresentou potencial inibitório sobre a expressão de VEGF e do fator induzido por hipoxia-1 (HIF-1a) em células de câncer de mama (MCF 7) sob condições normoxicas e hipóxicas (Zihlif et al., 2013). O extrato das flores de *Hibiscus sabdariffa*, também demonstrou atividade antiangiogênica em experimento com a MCA e este efeito foi atribuído ao potencial que a hibiscetina, composto isolado das flores deste vegetal, apresenta em se ligar ao VEGFR2 (Joshua et al., 2017).

Dentre os compostos análogos de isolados vegetais com atividade antiangiogênicas, as chalconas também têm sido investigadas. Lee et al. (2006), por exemplo, demonstrou que uma chalcona sintética (2'-hidroxi-4'-metoxichalcona) apresenta atividade antiangiogênica mediante ensaio na MCA com inibição do bFGF e da COX-2, além de reduzir o crescimento de células da artéria pulmonar vitelina.

Derivados sintéticos de chalconas também apresentaram atividade inibitória da angiogênese induzida por VEGF *in vitro* e *in vivo* pelo teste da MCA com inibição de receptores de tirosina cinases incluindo Tie-2 receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), bFGF, receptores de efrina do tipo B (EphB2) e do receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) (Lee et al., 2012). Karki et al. (2012) relatou algumas Di-hidroxichalconas inibem a expressão de VEGF em ensaios com a MCA e apresentam maior potencial para esta atividade em relação as Mono-hidroxichalconas.

Duas chalconas isoladas de *Medicago sativa* L. também exibiram moderada atividade antiangiogênica induzida *in vitro* pelo VEGF, com inibição da proliferação de HUVEC (Ma et al., 2016). Outro estudo realizado com a MCA também demonstrou que o precursor de flavonoides 4-hidroxi-alcalona (Q797) suprime o processo de angiogênese devido ao seu efeito seletivo sobre células do endotélio e do câncer epitelial humano pela modulação e expressão do VEGF e b-FGF, sem demonstrar quaisquer sinais de citotoxicidade (Varinska et al., 2012).

Embora existam inúmeros relatos científicos sobre a eficácia da atividade antiangiogênica na regressão do desenvolvimento de diversos tumores, alguns medicamentos antiangiogênicos direcionados em especial ao VEGF, promoveram uma resistência tumoral adquirida, levando à progressão da doença. O mecanismo sobre como os tumores se tornam resistentes ainda carece de maiores esclarecimentos. Porém, uma possível explicação para este evento seria o efeito direto dos inibidores de VEGF em células tumorais que expressam VEGF-R (Goel & Mercurio 2013).

Um estudo realizado por Tomida et al. (2015) demonstrou que a inibição crônica de VEGF em células do câncer de colon humano (HCT116) por 3 meses promoveu um aumento na resistência das células à apoptose induzida por hipóxia. Além disso, as células tumorais aumentaram significativamente a expressão de outros fatores angiogênicos, membro da família VEGF (PlGF, VEGF-B, VEGF-R1 e

VEGF-R2), sugerindo, portanto, que a inibição crônica de VEGF pode aumentar a expressão de fenótipos malignos em células de câncer de cólon.

Essa resistência também pode ser causada pelo aumento da sinalização VEGF no receptor VEGF-R2 ou na sinalização VEGF através de sua ligação em outros co-receptores. Um estudo em indivíduos com câncer de mama, por exemplo, demonstrou que o aumento da sinalização autócrina de VEGF / VEGFR2 através de MAPKs em células MCF7 que adquiriam resistência ao tamoxifeno (agente anti-estrógeno utilizado na quimioterapia do tratamento de câncer de mama) (Aesoy et al., 2008). O reconhecimento de vias autônomas do VEGF através dos sinalizadores autócrinos, fornece, portanto, novas visões sobre terapias anticâncer uma vez que estes sinalizadores podem representar um novo alvo terapêutico em associação com os fatores antiangiogênicos (Perrot-Appianat & Di-Benedetto, 2012).

Ressalta-se, porém, que os estudos relativos ao potencial antiangiogênico de diferentes substâncias, naturais ou sintéticas, têm apresentado significativa contribuição na descoberta de novas terapias que auxiliem na terapia anticâncer e tratamento de doenças neovasculares não controladas, incluindo a degeneração macular relacionada à idade. Além disso, estes estudos favorecem na escolha de diferentes modelos experimentais, *in vivo* e *in vitro*, possibilitando a investigação dos diferentes mecanismos de ação dos compostos (Chang et al., 2012; Al-Shabrawey et al., 2013; Agarwal et al., 2015).

2.4. Ensaio de angiogênese em membrana corioalantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha

O procedimento experimental da MCA em ovos embrionados de galinha (*Gallus domesticus*) foi descrito pela primeira vez em 1974 por Auerbach e colaboradores. Inicialmente se tratava de um método que permitia a verificação do crescimento de embriões em placas de Petri a partir do 20º dia de incubação dos ovos. O ensaio tem a vantagem de proporcionar acesso imediato ao embrião e sua MCA sobre a qual é possível realizar a inoculação de agentes teratogênicos e fazer a observação microscópica da morfogênese e crescimento do embrião (Auerbach et al., 1974). Além disso, esse modelo experimental tem sido usado em diferentes tipos

de estudos que buscam identificar compostos que induzem ou inibem o processo angiogênico (Nowak-Sliwinska et al., 2014; Rabhi et al., 2015).

A MCA é uma membrana responsável pela nutrição e trocas gasosas de embriões de galinha. Embora a maior atenção seja dada ao seu sistema vascular, é importante enfatizar que a MCA possui um sistema linfático totalmente desenvolvido o qual possui semelhanças funcionais e moleculares com o sistema linfático de mamíferos (Papoutsi et al., 2001).

O desenvolvimento da MCA ocorre de maneira semelhante ao anexo alantoide de mamíferos e se forma pela expansão caudal do saco vitelínico. No entanto, nas aves este anexo se funde ao anexo córion para formar a membrana corioalantóide. Inicialmente esta membrana é avascular, mas rapidamente forma um rico complexo vascular com o surgimento de artérias e veias (Figuras 5 e 6). O crescimento da MCA ocorre desde o terceiro dia do desenvolvimento embrionário e é completado no 10º dia, no entanto, o sistema vascular da MCA se torna completamente diferenciado por volta do 13º de incubação (Shapiro, 1992; Nowak-Sliwinska et al., 2014).

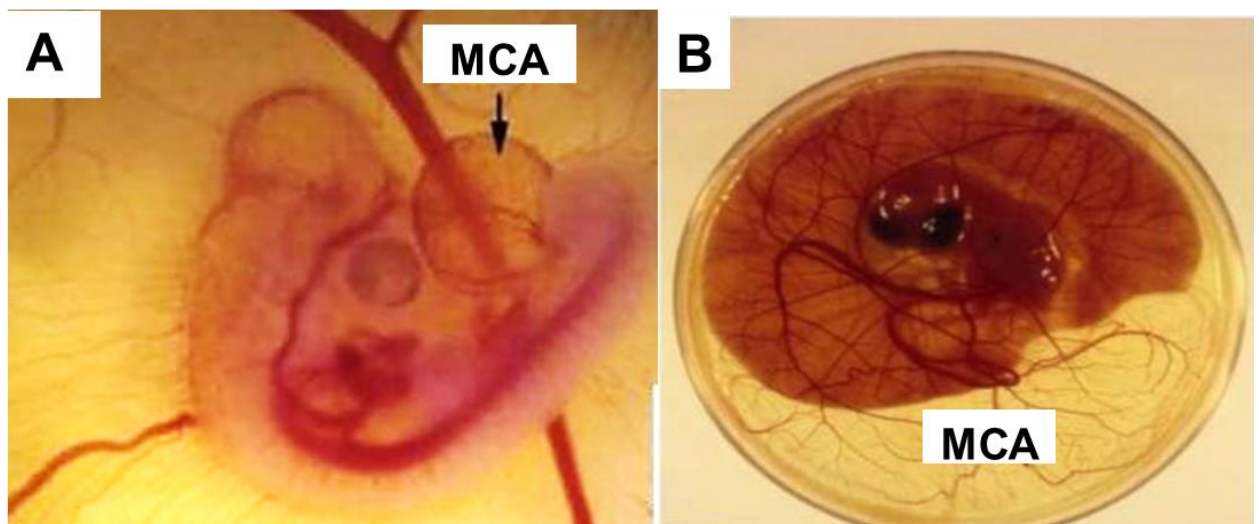


Figura 5. (A) Visão do complexo vascular de uma MCA no 3º dia de incubação do ovo embrionado; (B) MCA em crescimento e anastomose observados no 7º de incubação (Adaptado de Nowak-Sliwinska et al., 2014).



Figura 6. Ilustração de uma MCA obtida no 16° dia de maturação. A MCA apresenta artérias e veias bem estabelecidas que podem ser observadas a partir do 10° dia do desenvolvimento da rede vascular (Acervo S. R. L. Pontes).

Histologicamente, a MCA consiste em dois folhetos epiteliais que limitam uma fina camada no estroma (Figura 7). O epitélio superior possui origem ectodérmica, enquanto o estroma e o epitélio inferior são de origem mesodérmica e endodérmica, respectivamente (Hammer-Wilson et al., 2002). A vasculatura sanguínea e linfática da MCA reside no estroma. Desta forma, é importante ressaltar que qualquer substância fornecida na superfície da MCA deve passar pelo epitélio e atingir os vasos no estroma. As condições de baixa umidade, quando as MCAs são cultivadas fora do ovo, induzem uma divisão celular significativa, além da queratinização da camada epitelial superior o que dificulta o processo de absorção de substâncias e passagem de moléculas solúveis à rede vascular subjacente. Portanto, o controle de umidade representa um fator crítico durante o uso experimental desse sistema (Wutzler et al., 2003).

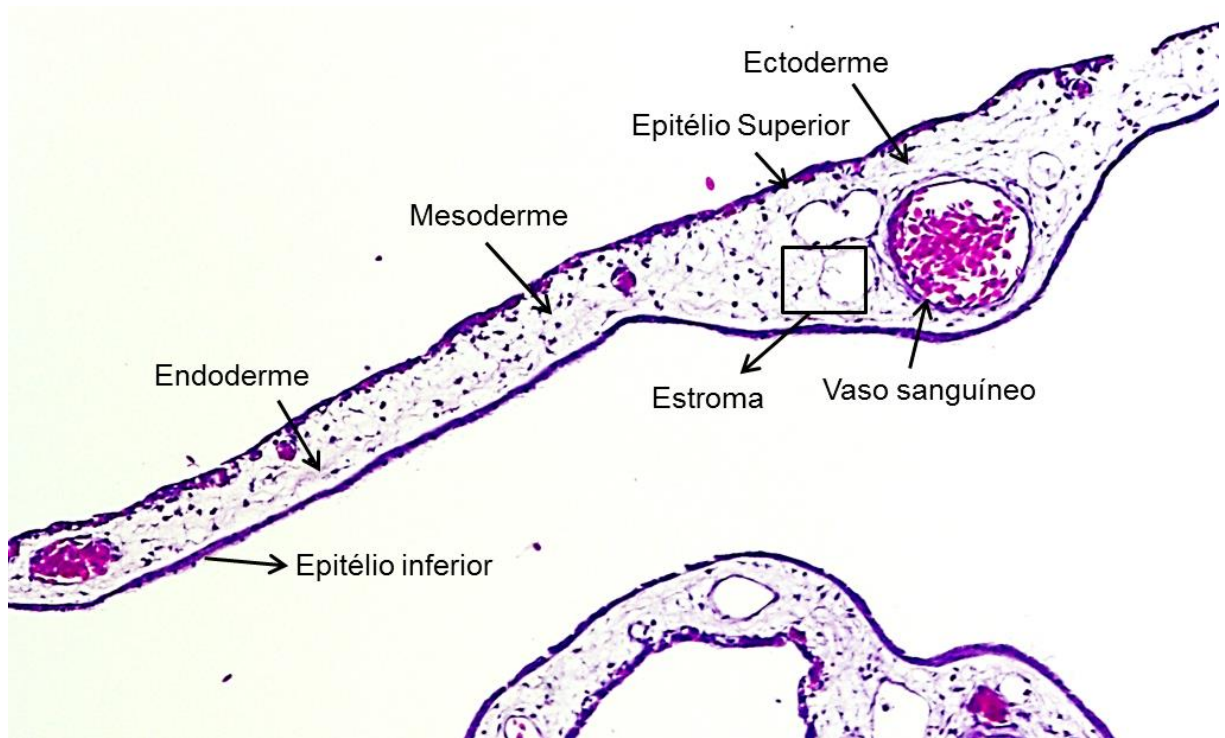


Figura 7. Fotomicrografia de uma MCA corada com hematoxilina-eosina (HE). O plexo capilar menor se localiza na porção mais superficial do epitélio da MCA em comparação com os vasos maiores localizados na região mesodérmica (Acervo S. R. L. Pontes).

Visto que a MCA possui um complexo vascular denso e de fácil visualização, o método experimental para avaliação do potencial angiogênico ou antiangiogênico de diferentes substâncias, naturais e sintéticas, tem sido comumente utilizado (Quesada et al., 2006; Melo-Reis et al., 2010; Lee et al., 2012; Almeida et al., 2014; Araújo et al., 2015; Chaves et al., 2016).

2.5. Mutagenicidade, Carcinogênese e Antimutagenicidade

A informação genética dos organismos vivos está armazenada no DNA, sob sequências nucleotídicas, e é transmitida de célula a célula durante o desenvolvimento e de geração a geração durante a reprodução. No entanto, esta transmissão não possui total estabilidade e, por vezes, alterações ou mutações podem ocorrer e gerar uma variabilidade genética (Snustad & Simmons, 2001).

A mutação representa um processo natural no qual as sequências de DNA são alteradas em organismos vivos. Essa variação pode ser identificada através de traços contínuos e discretos, além disso, as mutações promovem mudanças evolutivas que se baseiam no acúmulo de mutações múltiplas. A perpetuação do material genético depende, entretanto, de uma manutenção em níveis mínimos nas taxas de mutação (Peterson & Müller, 2016).

As principais alterações que ocorrem no material genético podem ocorrer através de mutações pontuais (alteração em apenas nucleotídeo ou de um grupo reduzido de nucleotídeos) rearranjos os quais acometem segmentos cromossômicos abrangendo inúmeros nucleotídeos. As mutações que ocorrem nas células somáticas (células não reprodutivas) aumentam a probabilidade de ocorrência do câncer, contudo essas mutações somáticas não são transmitidas para as gerações seguintes (Lodish et al., 2000).

As mutações denominadas de espontâneas são oriundas de eventos celulares normais e resultam de baixos níveis de erros metabólicos. Por outro lado, as mutações induzidas, resultantes da exposição do organismo a agentes mutagênicos (físicos, químicos ou biológicos) podem causar maiores danos no DNA e conseqüentemente erros metabólicos mais elevados (Griffiths et al., 2000).

A relação entre a mutação e câncer foi estabelecida em inúmeros estudos. Um exemplo a ser citado, são as mutações presentes nos sarcomas os quais representam um grupo heterogêneo de tumores que são tradicionalmente classificados segundo a morfologia e o tipo de tecido em que ocorrem, como o osteossarcoma, que ocorre no tecido ósseo (Sreekantiah et al., 1993; Amankwah et al., 2013).

Atualmente a classificação molecular baseada na mutação genética, divide os sarcomas em duas categorias: 1) sarcomas com alterações genéticas específicas, que podem ainda ser subclassificados com base nas translocações que resultam em transcrições de fusão oncogênicas (por exemplo, fusão dos oncogenes EWSR1 e FLI1 no osteossarcoma de Ewing) e nas mutações oncogênicas específicas (por exemplo, mutações no gene receptor tirosina quinase - KIT e no receptor do fator de crescimento PDGF em tumores estromais gastrointestinais) e 2) sarcomas que apresentam múltiplas anormalidades cariotípicas sem padrão um específico,

incluindo o osteossarcoma, leiomiossarcoma e lipossarcoma pleomórfico (Martins et al., 2012; Shaker et al., 2014; Zong & Chen, 2014; Grünewald et al., 2015).

O ambiente em que os organismos estão inseridos, por inúmeras vezes, também os expõe a uma grande variedade de agentes químicos tais como, cosméticos, conservantes de alimentos, pesticidas, compostos utilizados na indústria, poluente, dentre outros. Muitos desses compostos têm sido comercializados e demonstraram ser cancerígenos e mutagênicos em vários estudos científicos e alguns, posteriormente, foram submetidos a um processo de controle de uso decretado pelo governo de diferentes países (Cruzan, 2009; Magnuson et al., 2013; Adad et al., 2015; Ferrini et al., 2015; Marie et al., 2016).

Essas substâncias com capacidade de gerar mudanças no DNA são denominadas genotóxicas e a ciência responsável pelo estudo dos eventos relativos à lesões no DNA segundo a ação de tais substâncias é conhecida como mutagênese (Erdtmann, 2003).

Os compostos genotóxicos atuam como promotores tumorais, modificadores endócrinos, imunossupressores ou indutores de toxicidade. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), através de estudos científicos, considera que as substâncias genotóxicas representam 88% de todos os agentes cancerígenos e possivelmente cancerígenos para seres humanos (Kang et al., 2013).

Além da existência de substâncias genotóxicas, existem múltiplos fatores que induzem a perda de função de um determinado gene responsável pela regulação do ciclo celular, dentre eles está a predisposição genética hereditária (Stare & Jozefowicz, 2008).

A alimentação também é uma via de exposição à agentes com propriedades genotóxicas. Estudos predizem que cerca de um terço de todos os tipos de cânceres possui relação com o hábito alimentar. Neste sentido, inúmeras pesquisas demonstram a importância de determinadas dietas como modelo preventivo ao desenvolvimento do câncer (Jansen et al., 2013; White et al., 2013; Freedman et al., 2014; Thomson et al., 2014). As dietas ricas em vegetais, frutas, peixes e produtos lácteos com baixo teor de gordura estão associadas a um menor risco de câncer de mama, por exemplo. No entanto, as evidências se determinados vegetais, frutas ou outros alimentos podem reduzir o risco não estão totalmente elucidadas (Boggs et al., 2010; Farvid et al., 2016).

Embora o processo de mutagenicidade não seja um fator determinante para a ocorrência da carcinogênese (evento no qual as células normais se modificam em células cancerígenas), ele é um dos fatores frequentemente associados ao surgimento do câncer e a presença de alterações no DNA representa um elemento importante no desenvolvimento de inúmeros tipos de cânceres. Além disso, segundo a teoria da mutação somática do câncer, os agentes mutagênicos ao induzirem a mutação das células somáticas, contribuem para a ocorrência de erros nas proteínas transcritas, ocasionando alterações celulares as quais podem desencadear o processo carcinogênico (Baba & Cátoi, 2007; Vogelstein et al., 2013).

Em virtude da influência do mecanismo de mutagenicidade com o desenvolvimento da carcinogênese, inúmeros compostos tem sido testando quando a sua atividade antimutagênica (Oliveira et al., 2013; Słoczyńska et al., 2014; Hanusch et al., 2015; Horta et al., 2016). O termo antimutagênico foi inicialmente descrito em 1952 para definir substâncias com capacidade de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, de modo independente dos eventos envolvidos. Deste modo, os compostos naturais ou sintéticos que possuem a capacidade de modular a atividade de inúmeros agentes mutagênicos são denominados, geneticamente, antimutagênicos (Novick & Szilard, 1952).

O mecanismo de ação das substâncias antimutagênicas pode ser classificado em dois eventos principais: bio-antimutagênese e desmutagênese. Kada e colaboradores (1982, 1987) descreveram que na bio-antimutagênese, um elemento com atividade antimutagênica age em nível celular, sendo capaz de modular o reparo e a replicação do DNA inibindo, deste modo, possíveis erros decorrentes no sistema de reparo. Na desmutagênese, os compostos podem neutralizar ou inativar diretamente a atividade mutagênica de uma determinada substância através de uma ação química ou enzimática posterior ao processo metabólico, ou ainda atuam sequestrando e absorvendo os agentes mutagênicos e radicais livres, inibindo sua interação com o DNA (Bhattacharya, 2011).

No entanto, sabe-se que determinadas substâncias podem apresentar, em diferentes condições de tipo celular ou dose, podem apresentar atividade mutagênica e antimutagênica. Estas substâncias são denominadas mutágenos e carcinógenos Janus. Alguns exemplos destes compostos são: 5-aminoacridina e 9-aminoacridina, tiabendazol, tabaco, radiação ionizante, β -caroteno, quercetina,

testosterona e a chalcona sulfonamida sintética 4-N[fenilsulfonilamida] acetofenona 3 (Von-Borstel & Higgins, 1998; Mazumdar et al., 2011; Bhattacharya, 2011; Silva et al., 2015).

Ensaio de mutagenicidade em curto prazo têm sido amplamente usados para detectar agentes com atividade mutagênica e potenciais substâncias cancerígenas ambientais. As mesmas metodologias também podem ser utilizadas na detecção de potenciais compostos com ação antimutagênica e anticancerígena (Szikriszt et al., 2016). Os sistemas celulares de mamíferos usados na análise citogenética da mutagênese e antimutagênese, englobam experimentos *in vitro* e *in vivo*, onde nos ensaios *in vivo*, camundongos e ratos são usados com maior frequência. *In vitro*, o principal organismo utilizado são as linhagens TA 100 e TA 98 da bactéria *Salmonella typhimurium* (Eastmond et al., 2009).

Dentre os principais ensaios da genética toxicológica para a investigação de substâncias mutagênicas e antimutagênicas estão os testes de Ames em linhagens de bactérias do gênero *Salmonella*; teste do Micronúcleo em peixes, medula óssea de camundongos, linfócitos de sangue periférico e na mucosa bucal; teste cometa e *Allium cepa* (Dourado et al., 2017).

A potencial atividade quimiopreventiva de uma dada substância é analisada através do uso de reconhecidos agentes indutores de lesões no DNA, associados aos compostos testes. Nessas análises, inúmeros mutágenos reconhecidos têm sido amplamente utilizados, dentre eles se destacam a ciclofosfamida (CP), mitomicina C (MMC), doxorubicina (DXR), azida sódica e 4-nitroquinolina (4NQO) (Maron & Ames, 1983; Krishna et al., 1995; Attia et al., 2010; Oliveira et al., 2017).

Muitos destes compostos mutagênicos, como a MMC e CP, atuam pela atividade alquilante em virtude de uma ativação redutiva gerada durante sua metabolização, que forma metabólitos intermediários, como a semiquinona e hidroquinona, os quais podem se ligar ao DNA. Esta ligação por sua vez, promove ligações cruzadas na dupla fita do material genético (Słoczyńska et al., 2014).

Neste sentido, identificar substâncias naturais ou sintéticas com potencial ação mutagênica e antimutagênica possui relevante aplicação como medida preventiva ou medicamentosa, visto que a exposição a agentes antimutagênicos pode limitar ou mesmo impedir o efeito de substâncias mutagênicas e assim reduzir

os níveis de danos genéticos e conseqüentemente diminuir a ocorrência de cânceres e outras doenças com base genética (Eventi et al., 2009).

2.6. Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos

O teste do micronúcleo é considerado um dos mais utilizados em estudos de mutagenicidade. Seu uso abrange diferentes classes de compostos naturais e produtos químicos, como os farmacêuticos, agrícolas e aditivos alimentares. Embora exista uma maior tendência na avaliação de segurança destas substâncias em sistemas *in vitro*, os sistemas de testes *in vivo* recebem mais atenção no campo da genética toxicológica em virtude do seu peso de evidências (Hayashi, 2016).

O micronúcleo (MN) foi inicialmente descrito no final do século 19 quando os pesquisadores Howell e Jolly encontraram pequenas inclusões no sangue retirado de gatos e ratos. Estas inclusões, denominadas corpúsculo de Howell-Jolly também são observadas em eritrócitos do sangue periférico de pacientes com anemia grave (Searts & Udden, 2012). Em 1959, Evans et al. detectaram que os raios-gama induziram a formação de MNs nas coifas de raízes de feijão e tentaram avaliar quantitativamente a aberração cromossômica gerada. Este foi o primeiro relatório que avaliou a aberração cromossômica pela frequência de células que apresentavam MNs e, assim, estimaram que cerca de 60% dos fragmentos cromossômicos contribuíram para a formação de MNs observados.

Em 1970, Boller e Schmid desenvolveram um método para avaliar a frequência de eritrócitos micronucleados entre os eritrócitos normais que não apresentam seus próprios núcleos durante a hematopoiese, através do uso da medula óssea e células do sangue periférico do Hamster chinês o qual foi tratado com um agente alquilante Tremimon. Na metade da década de 1970, Heddle (1973) e Schmid (1975) construíram então os conceitos básicos do teste do MN.

As características desse teste utilizando a medula óssea de camundongos, por exemplo, constituem na observação do efeito do agente testado sobre eritrócitos policromáticos jovens (EPC), RNA-positivos, ou seja, são corados de azul ao invés de vermelho, para a coloração convencional (Giemsa). Os MNs são contados nos EPCs e apresentam um diâmetro de 1/20 a 1/5 em relação ao núcleo do EPC (Figura 8) (Heddle, 1973; Schmid, 1975). Os MNs são formados por cromossomos

inteiros ou fragmentos acêntricos oriundos de quebra cromossômica que se atrasam em relação aos demais durante a anáfase na divisão celular (Terradas et al., 2010).

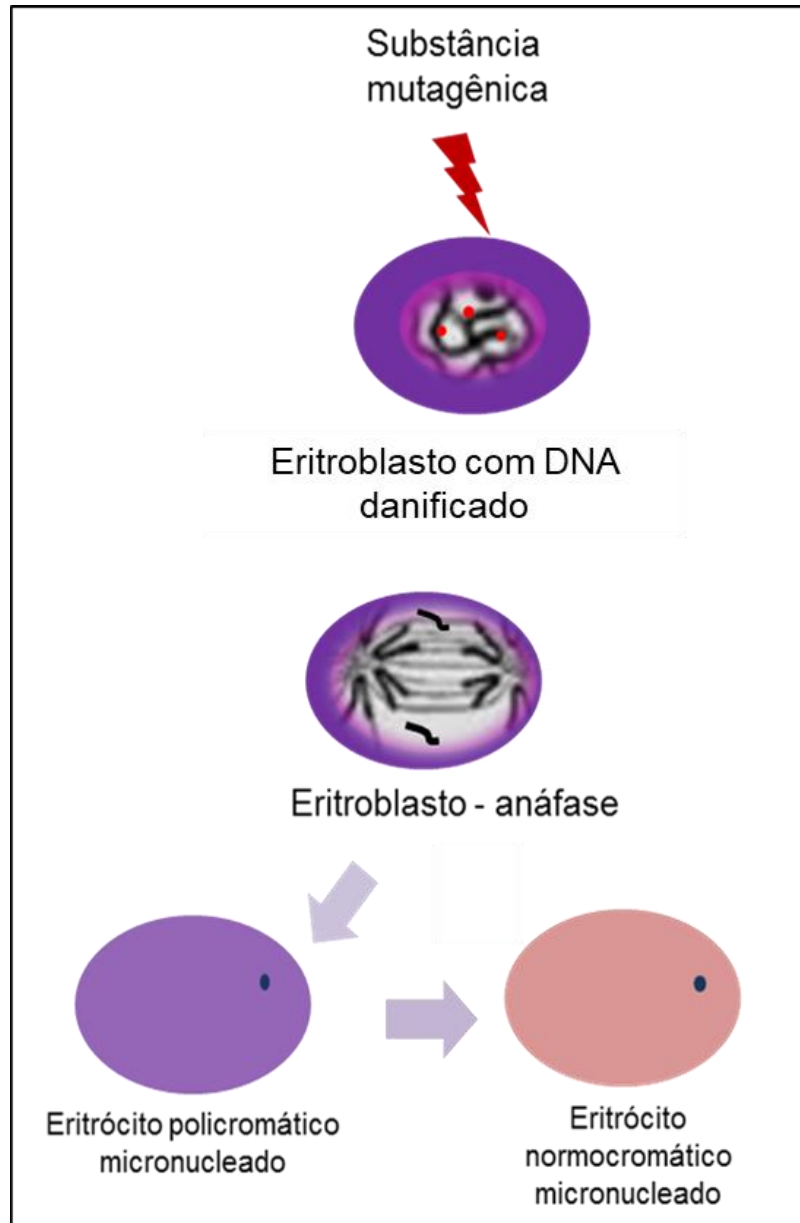


Figura 8. Formação de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea (Adaptado de Ribeiro, 2003).

Durante a hematopoiese, os eritroblastos expõem seus núcleos e se convertem em eritrócitos e mantêm os micronúcleos no citoplasma o que facilita seu reconhecimento. A presença de micronúcleos em EPC demonstra que estes corpúsculos foram gerados na mitose anterior, ou seja, na presença de um composto mutagênico. Visto que o período entre a última divisão e a formação do

EPC é de aproximadamente 8 a 12 horas, os micronúcleos formados pela indução do agente mutagênico serão detectados cerca de 10 horas após a administração da substância. Outro dado importante é que o tempo mínimo onde os micronúcleos são detectados ocorre entre 10 e 24 horas, período onde se têm a conformação de policromático (Rabello-Gay et al., 1991; Ribeiro, 2003).

Em geral, um total de 2000 eritrócitos são contados, devido a transição do EPC maduro para eritrócito normocromático (ENC) ser um processo constante. Em virtude dessa transição, é importante que haja uma separação na contagem de micronúcleos em EPC e ENC, visto que a presença destes elementos em ENC é indicativa de mutagenicidade na ausência de uma dada substância mutagênica. Nas substâncias utilizadas como controle negativo no teste do micronúcleo, as quais não afetam a proliferação da medula, a relação entre EPC e ENC é de aproximadamente 1:1 (Ribeiro, 2003).

A relação EPC/ENC também é utilizada como parâmetro para investigação da citotoxicidade de diferentes substâncias. Em geral, quando a substância teste apresenta efeito citotóxico, a presença de EPCs tende a ser maior que a de ENCs. A frequência de EPC micronucleado (EPCMN) em organismos tratados com uma substância que possui atividade mutagênica é superior ($p < 0,05$) ao controle negativo (Maistro, 2014).

2.7. Teste de Mutagenicidade de Ames

O teste de mutagenicidade de Ames foi desenvolvido na década de 70 por Bruce Ames, professor de Bioquímica na Universidade da Califórnia, em Berkeley. Este ensaio é amplamente utilizado em sistema *in vitro* para detectar possíveis agentes químicos ou naturais com potencial atividade mutagênica (Maron & Ames, 1983).

O procedimento se baseia no uso de diferentes estirpes da bactéria *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) oriundas da linhagem parental LT2, auxotróficas para o aminoácido histidina (his-) e se diferem entre si pelas diferentes mutações no operon desse aminoácido. As cepas mais utilizadas são TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537 e TA1538. Além das cepas de *Salmonella*, a estirpe *Escherichia coli* também pode ser testada neste método uma vez que

possui semelhança com a cepa TA102 de *S. typhimurium* na detecção de agentes mutagênicos (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Todas as cepas bacterianas de *S. typhimurium* usadas no teste de Ames possuem um gene mutante que as impede de sintetizar o aminoácido histidina o qual é essencial para sua sobrevivência. No entanto, na presença de um composto potencialmente mutagênico, os genes defeituosos podem ser novamente mutados para seu estado funcional, permitindo que a bactéria cresça em meio padrão que não contenha histidina suplementar. Essas mutações que levam a uma recuperação da atividade ou função normal são chamadas de reversas. As colônias mutantes, que podem sintetizar histidina são chamadas de revertentes (Mortelmans & Riccio, 2000).

As cepas TA 98 e TA 100, utilizadas no presente estudo, são as mais utilizadas no protocolo de Ames e são eficazes na identificação de inúmeros compostos mutagênicos (Tejs, 2008). A presença da mutação hisG46 na estirpe TA100 promove uma substituição da leucina (GAG/CTC) pela prolina (GGG/CCC), podendo ser retomada para o estado selvagem através de uma substância mutagênica que gere uma substituição de pares de bases em um dos pares GC (Umbuzeiro & Vargas, 2003).

A mutação hisD3052 que ocorre no gene hisD que codifica a histidinol desidrogenase, está presente na cepa TA 98 e se baseia em um erro no quadro de leitura do DNA (*frameshift mutation*) afetando a correta leitura de uma sequência próxima com oito resíduos GC – C-G-C-GC-G-C-G- repetitivos. Essa mutação pode se reverter a partir de substâncias mutagênicas como o 2-nitrofluoreno. Deste modo, o uso destas duas cepas promove a detecção de agentes mutagênicos ou antimutagênicos com diferentes mecanismos de ação (Maron & Ames, 1983).

Algumas substâncias cancerígenas não apresentam atividade mutagênica em sua forma original, mas podem ser convertidas em substâncias mutagênicas ao serem metabolizadas no fígado. Uma vez que as bactérias não têm a mesma capacidade metabólica que os mamíferos, alguns protocolos do teste de Ames utilizam extratos de enzimas hepáticas de ratos ou hamster (fração S9) para promover a conversão metabólica do produto testado. Isso permite que o investigador determine se a substância teste expressa atividade mutagênica após a metabolização. Alguns compostos são mutagênicos com e sem metabolismo,

enquanto outros são ativos apenas sob uma ou outra condição (Hakura et al., 2001, 2003).

No protocolo padrão do teste de Ames as cepas bacterianas são cultivadas em placas de Petri que contém meio ágar mínimo, na ausência de histidina, simultaneamente com a substância teste. Os agentes com atividade mutagênica promovem uma indução na reversão da mutação, recuperando a capacidade de sintetizar o aminoácido histidina. As colônias revertentes que crescem no meio mínimo são quantificadas depois de um período de incubação entre 48 e 72 h (Ames et al., 1973). A substância teste é considerada mutagênica quando o número de colônias revertentes ultrapassa em cerca de 2 a 3 vezes o total de colônias revertentes do controle negativo, ou caso este aumento seja estatisticamente significativo (Figura 9) (Goodson-Gregg & De Stasio, 2009).

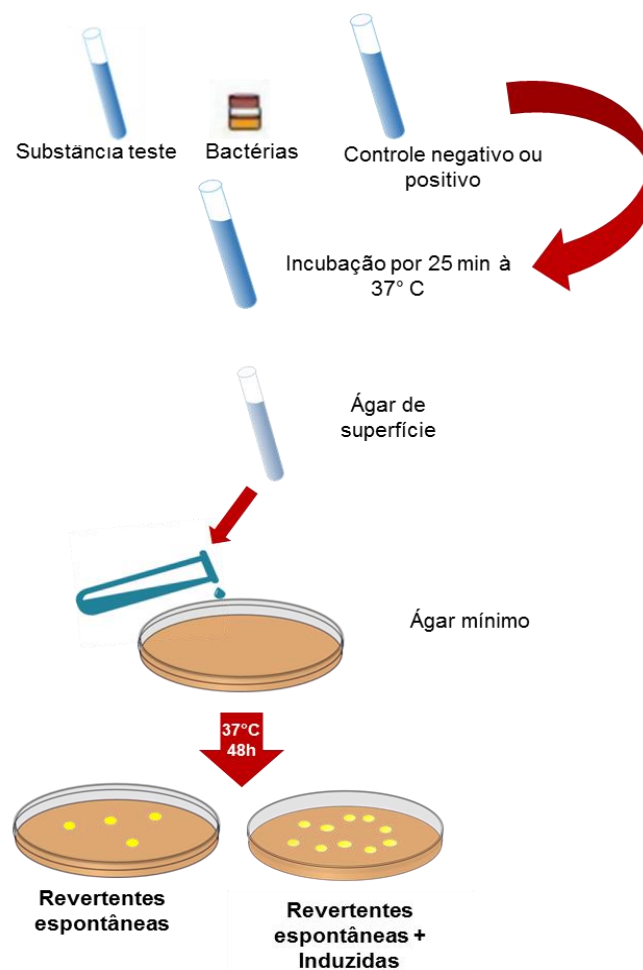


Figura 9. Esquemática do teste de mutagenicidade de Ames em cepas de *Salmonella typhimurium* (Adaptado de Zanoni, 2010).

2.8. Técnicas Espectroscópicas

Para que a elucidação da estrutura de uma determinada substância ocorra é essencial que o isolamento ou síntese, purificação e utilização de técnicas espectroscópicas sejam empregadas. Na caracterização de uma substância como o princípio ativo responsável pelas atividades medicinais atribuídas a um vegetal, é imprescindível a realização de estudos que investiguem suas potencialidades farmacológicas, mecanismo de ação, toxicidade, determinação de seus efeitos colaterais e, ainda, obtenção de análogos sintéticos mais potentes e menos tóxicos (Chaves, 2006; Heinke et al., 2011).

Um das principais técnicas utilizadas na determinação da estrutura das substâncias são as espectroscópicas, onde os dados físico-químicos são investigados por meio da transmissão, absorção ou reflexão da energia de radiação incidente em uma amostra. Essas técnicas são representadas principalmente pela espectrometria de massa (EM), espectroscopia de infravermelho (IV), espectroscopia UV/Visível, espectroscopia de fluorescência, rotação óptica específica, cristalografia de raios X, etc. (Albarici et al., 2010; Mahajan & Pai, 2010).

As técnicas espectroscópicas permitem a investigação da análise de forças de ligação molecular, identificação de ligações específicas entre átomos em uma molécula, além da identificação da pureza de um determinado composto (Ross et al., 2011).

O princípio básico da espectroscopia centra-se nas interações entre a radiação eletromagnética e a matéria. A luz é utilizada como uma forma de radiação eletromagnética, onde uma dada substância é exposta a uma faixa de luz e o instrumento espectroscópico mede o comportamento molecular resultante da exposição à luz (Albarici et al., 2010).

Tratando-se de substâncias novas, é imprescindível para a caracterização de suas estruturas o uso de técnicas avançadas e análise adaptada dos vários espectros obtidos. Todavia, a condição principal consiste no isolamento de compostos com estruturas já conhecidas, porém, ainda assim, na maior parte dos casos, a confirmação das estruturas é realizada através do uso de metodologias sofisticadas, resultando em gastos desnecessários de tempo e custos (Eldahshan, 2011).

2.8.1. Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A absorção de energia de uma determinada substância depende de sua estrutura molecular, e por isso, a espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis) consiste em um método útil para caracterizar a absorção, transmissão e reflexividade de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (Brown et al., 2009).

A espectroscopia UV-Vis estuda as transições eletrônicas das moléculas à medida que absorvem a luz nas regiões UVs visíveis no espectro eletromagnético. Visto que a energia absorvida é quantificada, o espectro de uma única transição eletrônica deveria corresponder a uma linha discreta. No entanto, esta previsão não se concretiza, uma vez que a absorção eletrônica gera sobreposições dos átomos a subníveis rotacionais e vibracionais; assim, um espectro de UV-Vis tem o aspecto de uma banda (Agatonovic-Kustrin et al., 2012).

As bandas de absorção são caracterizadas pelo valor do comprimento de onda onde ocorre a máxima absorção de energia. Este comprimento corresponde, portanto, ao comprimento de onda cuja luz UV irradiada é suficiente para promover uma transição na estrutura eletrônica da substância testada (Figura 10). A intensidade desta transição depende, em especial, da interação entre a energia incidente e o sistema eletrônico. Essa transição de elétrons ocorre do orbital molecular ocupado mais elevado (HOMO) ao menor orbital molecular desocupado (LUMO) (Muthu et al., 2014).

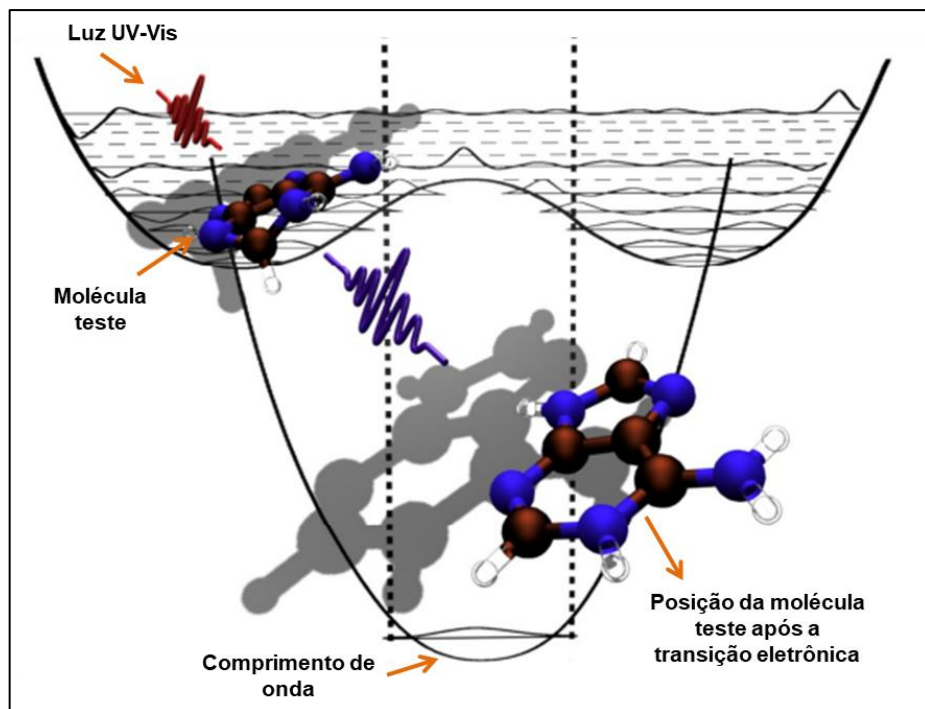


Figura 10. Resumo esquemático da técnica de espectroscopia UV-Vis (Adaptado de Schultz, 2009).

A espectroscopia UV-Vis representa o principal método óptico no estudo de parâmetros considerados relevantes no desenvolvimento tumoral, tais como o volume vascular, oxigenação, extensão da matriz extracelular, presença de metabólicos que atuam como radicais livres e biomarcadores, além da proliferação celular (Brown et al., 2009). O estudo destes parâmetros pela espectroscopia UV-Vis ocorre devido a possibilidade desta técnica fornecer informações precisas dos espectros de absorção integral de uma amostra (fármaco, tecido tumoral, por exemplo) em tempo real (Yang et al., 2016).

O mais amplo uso da espectroscopia UV-Vis no campo da clínica médica consiste no diagnóstico de danos teciduais, pois quando as células são danificadas por determinadas condições, patológicas ou não, algumas enzimas tendem a “vazar” para a corrente sanguínea e a quantidade presente indica a gravidade do dano tecidual. As proporções relativas de diferentes enzimas podem também ser usadas para diagnosticar, por exemplo, doenças hepáticas, pancreáticas bem como de outros órgãos (Pence & Mahadevan-Jansen, 2016).

Nos campos da bioquímica e genética a espectroscopia UV-Vis é utilizada na quantificação do DNA e proteína / atividade enzimática, bem como na desnaturação térmica do DNA (Porterfield & Zlotnick, 2010; Banihashemian et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a atividade angiogênica, antiangiogênica, mutagênica e antimutagênica da chalcona 1E, 4E-1- (4-clorofenil) -5- (2,6,6-trimetilciclohexen-1-il) penta-1,4-dien-3-ona (CAB7 β) em sistemas-teste bacteriano e animal.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade angiogênica e antiangiogênica da CAB7 β pelo ensaio de angiogênese em membrana corioalantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha.
- Avaliar pelo ensaio da MCA, a atividade angiogênica de células tumorais do sarcoma da linhagem S180 e investigar a influência angiogênica ou antiangiogênica da CAB7 β sobre a linhagem S180.
- Avaliar o potencial mutagênico e antimutagênico da CAB7 β pelo teste de mutagenicidade de Ames com as cepas TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*.
- Avaliar a possível atividade mutagênica e antimutagênica da CAB7 β pelo teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos.
- Avaliar a ação citotóxica e anticitotóxica da CAB7 β pelo teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos.
- Verificar as propriedades ópticas da CAB7 β através dos métodos espectroscópicos de absorção UV/Vis.
- Identificar a conformação de menor energia da CAB7 β através da análise de geometrias moleculares e mapeamento da superfície de energia potencial deste composto em fase gasosa e em solução de dimetilsulfóxido.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Síntese da CAB7 β

A bischalcona do tipo $\alpha\beta$ 7-ionona, CAB7 β , com fórmula molecular $C_{20}H_{23}ClO$, foi sintetizada no Laboratório de Síntese e Estudos Cristalográficos do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Inicialmente foi realizada a síntese da cetona e posteriormente esta foi condensada ao *p*-clorobenzaldeído, através da reação de Claisen Schmidt, para obtenção da chalcona AB7 β -ionona.

Como reagentes, foram utilizados metanol, β -ionona e *p*-clorobenzaldeído, com purezas de 99%. Como catalisador foi utilizado hidróxido de sódio com pureza de 85%. Os solventes utilizados foram acetona e álcool isopropílico.

4.1.2. Procedimento experimental

Em um balão reator estéril (50 mL), foi utilizado 15 mL de metanol e 3,0 mmol de hidróxido de sódio em 0,3 mL de água destilada, em seguida foi adicionado 1,5 mmol de β -ionona, após 5 minutos foi adicionado 2,5 mmol de *p*-clorobenzaldeído, a reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente (Figura 11).

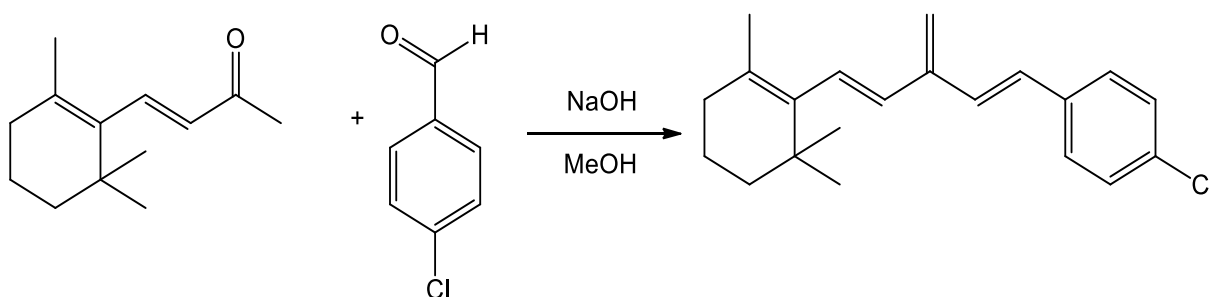


Figura 11. Esquema da síntese da 1E, 4E-1-(4-clorofenil) -5-(2,6,6-trimetilciclohexen-1-il) penta-1,4-dien-3-ona

O tempo total da reação durou cerca de 1 h e 30 min. Após este período foi realizada a verificação da formação de precipitado. Com a formação do precipitado, o composto foi removido do balão reator e adicionado em um funil estéril com papel

filtro e Becker para sua filtração. Após filtrado, o precipitado foi lavado com água destilada e seco no papel de filtro, em seguida solubilizado com álcool isopropílico onde permaneceu em repouso durante 15 dias, até a total evaporação destes solventes. Posteriormente, os cristais da chalcona formada foram removidos e adicionados em tubos de eppendorf para a caracterização físico-química.

4.2 Células S180

As células de Sarcoma 180 (S180) foram cedidas pelo Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás. Inicialmente as células foram mantidas em camundongos *Swiss*, com idade de 6 a 8 semanas e peso corporal entre 30 a 40 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da UFG, por meio de passagens sucessivas intraperitoneais na quantidade de 2×10^6 células ajustadas para um volume final de 0,2 mL. Após 7 dias de inoculação tumoral, o líquido da cavidade peritoneal foi aspirado, as células foram lavadas em solução salina de tampão fosfato (PBS) e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, as células foram suspensas em meio RPMI (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina e quantificados com o corante Azul de Tripiano 1% (m/v) (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO) em Câmara de Neubauer. A viabilidade das células utilizadas para o estudo foi $\geq 90\%$ (Menezes et al., 2007).

4.3. Ensaio da angiogênese em membrana corioalantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha

4.3.1. Ovos embrionados

Foram utilizados 120 ovos férteis de galinha (*Gallus domesticus*) linhagem Rhoss, adquiridos na granja da chácara São Domingos localizada no Km 9 da estrada velha para Bela Vista, Vale dos Pampas, Aparecida de Goiânia - GO.

4.3.2. Substâncias utilizadas no teste da MCA

- a) Cloreto de Sódio 0,9%, Samtec Biotecnologia Ltda, Lote: CDI. Validade: dezembro de 2017.
- b) Controle negativo: Água para Injeção, Samtec Biotecnologia Ltda, Lote: OUW, Validade: outubro de 2017.
- c) Substância veículo: Dimetilsulfóxido – DMSO (99%): Neon Comercial®, lote 20881. Validade: Dezembro de 2019.
- d) Controle inibidor: Solução de dexametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$) 4mg/mL - Aché Laboratórios Farmacêuticos S. A., Lote: 1510580. Validade: setembro de 2017.
- e) Controle indutor: Creme cicatrizante de feridas, Regederm® - Pelenova Biotecnologia S. A., Lote: 00134061. Validade: janeiro de 2018.
- f) Os cristais da CAB7 β foram diluídos em DMSO para obtenção das concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Ressalta-se que a escolha do controle indutor se baseou nas evidências científicas relacionadas ao potencial do soro da *Hevea brasiliensis* (principal componente do REGEDERM®) em estimular o processo angiogênico (Ferreira et al., 2009, Mendonça et al., 2010).

4.3.3. Procedimento experimental para a avaliação da atividade angiogênica na MCA

Os ovos embrionados de galinha foram incubados em estufa automática a temperatura de 38°C, em ambiente úmido (65%) e deslocados lateralmente a cada 15 minutos durante os cinco primeiros dias de incubação. No quinto dia, foi realizada, na base maior da casca do ovo, uma abertura circular (1,0 cm de diâmetro) com auxílio de uma micro-retífica para exposição da MCA (Figura 12) (Melo-Reis et al., 2010).



Figura 12. Abertura do ovo embrionado para exposição da MCA. A) Procedimento da abertura circular na base maior do ovo com auxílio de micro-retífica; B) Visão da MCA. (Acervo S. R. L. Pontes).

No 13º dia de incubação, os ovos foram divididos em oito grupos com 15 ovos cada: 1) Controle negativo: solução de água destilada; 2) Substância veículo: DMSO; 3) Controle inibidor de angiogênese: Solução de dexametasona (4mg/ml); 4) Controle indutor de angiogênese: Regederm®; 5) CAB7β na maior dose (50 μg/μL); 6) células tumorais S180 na concentração de 6×10^5 por CAM; 7) Co-tratamento da CAB7β na dose de 25 μg/μL com as células do sarcoma S180 (6×10^5); 8) Co-tratamento da CAB7β na dose de 50 μg/μL com as células do sarcoma S180 (6×10^5).

Um volume total de 20 μL dos tratamentos foi colocado diretamente sobre a MCA onde decorridas 72 horas, a resposta angiogênica foi avaliada e as MCAs foram fixadas em solução formaldeído por 5 minutos, posteriormente cortadas, retiradas e mantidas em placa de petri para analisar e quantificar a rede vascular formada (Melo-Reis et al., 2010; Araújo et al., 2015; Reji & Ragunathan, 2015; Chaves et al., 2016). As imagens das MCAs obtidas foram fotografadas em tamanho padrão de 640x480 pixels com 96 dpi horizontal e vertical, através do Microscópio

Digital USB, 2.0 megapixels e capturadas pelo software AMCAP versão 9.016 acoplado a um microcomputador DELL, adaptado a uma lupa. Os parâmetros: número de complexos, tamanho dos vasos, calibre e número de junções das MCAs foram quantificados utilizando o software Angioquant Toolbox, MATLAB 6.5, o qual fornece uma mensuração dos valores dada em Pixels (Vermareji et al., 2012; Fergelot et al., 2013; Reji & Ragunathan, 2015).

4.3.4. Análise histológica da MCA

Após a obtenção das fotografias, as MCAs foram fixadas em álcool a 70% durante 24 horas e posteriormente foram incluídas em blocos de parafina. Em seguida, foram preparados cortes histológicos de 5 µm que foram corados com solução de HE, segundo técnica clássica padronizada. As laminas dos cortes histológicos foram analisadas em microscópio óptico (Ribatti et al., 2001).

Foram avaliados diferentes parâmetros: integridade da camada epitelial coriônica e alantoide, presença de elementos inflamatórios, neovascularização (angiogênese), presença de fibroblastos, hemácias e picnose. Os resultados foram classificados visualmente segundo a intensidade e os dados foram convertidos em variáveis quantitativas através da atribuição dos seguintes escores: ausente (0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3).

4.4. Avaliação das atividades mutagênica e antimutagênica da CAB7β pelo teste do micronúcleo

4.4.1. Controles utilizados

- a) Água para Injeção, Samtec Biotecnologia Ltda, Lote: OUW, Validade: outubro de 2017.
- b) Soro Bovino Fetal: Laborclin®, Lote: 60428001. Validade: abril de 2018.
- c) Controle negativo: Substância veículo - Dimetilsulfóxido – DMSO (99%): Neon Comercial®, lote 20881. Validade: dezembro de 2019.
- d) Controle positivo: Doxorrubicina (5mg/mL), DXR - Glenmark®, Lote: A4150116. Validade: agosto de 2017.

e) Coloração Panótico para células hematológicas (corante 1 - triarilmetano a 0,1%, corante 2 - solução de xantenos a 0,1%, corante 3 – solução de tiazinas a 0,1%): New Prov®, Lote: 15314E. Validade: julho de 2017.

4.4.2. Animais

Foram utilizados 70 camundongos machos e fêmeas, saudáveis, da espécie *Mus musculus* linhagem Swiss Webster, oriundos do Biotério da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, apresentando peso corpóreo entre 30 e 40 gramas e idade entre 45 e 60 dias. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com medidas de 40x30x16 cm com 4 animais cada, forradas com maravalha e foram alimentados *ad libitum* com ração labina, Presence® e água filtrada. A sala de experimentação onde os animais permaneceram foi mantida em temperatura ambiente (25°C) e com sistema de ventilação, ciclo de claro- escuro (claridade 07: 00 - 19: 00, escuro 19: 00 - 07: 00).

Foram necessários 55 camundongos para os testes de mutagenicidade e antimutagenicidade, além de 15 animais para os controles negativo e positivo. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás sob protocolo de nº 2831100316.

Treze grupos foram formados, cada qual contendo cinco animais, para obtenção dos grupos controle e experimental. Os animais foram marcados individualmente e pesados no mesmo dia da administração das substâncias químicas. Os grupos consistiram em Co-tratamento (grupos 1, 2, 3, 4 , 5 e 6 da Tabela 2), Pré-tratamento (grupos 7, 8, 9, 10 e 11 da Tabela 2 e Pós-tratamento (grupos 12, 13 e 14 da Tabela 2). Todos os tratamentos ocorreram via intraperitoneal (ip).

Co-tratamento: Os animais dos grupos 1, 2, 3 foram respectivamente tratados com 12,5, 25, 50 mg/kg de peso corpóreo (pc), via ip, com a CAB7β concomitante à administração da DXR na dose de 5 mg/kg pc, via ip e os animais dos grupos 4, 5 e 6 receberam respectivamente uma única administração, via ip, da CAB7β na dose de 50 mg/kg pc, DMSO (controle negativo) na proporção de 0,1 mL/10g pc e da DXR (controle positivo) na dose de 5 mg/kg pc.

Pré-tratamento: Os grupos 7, 8 e 9 foram tratados respectivamente, via ip com a CAB7 β nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg pc durante cinco dias, seguido pela administração da DXR na dose de 5 mg/kg pc, via ip, duas horas após o último tratamento com a CAB7 β . O grupo 10 foi tratado apenas com a CAB7 β na maior dose, 50 mg/kg pc, via ip, por cinco dias, afim de verificar seu possível efeito mutagênico. Os animais do grupo 11 receberam via ip DMSO na proporção de 0,1 mL/10g durante cinco dias e serviram como controle negativo.

Pós-tratamento: Os animais dos grupos 12, 13 e 14 foram primeiramente tratados com a DXR e após 6 e 12 horas foram respectivamente tratados via ip nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg pc da CAB7 β .

Tabela 2. Substâncias administradas nos grupos de tratamento

	Grupos	Substâncias e doses administradas
Grupos de Co-tratamento	1	CAB7 β 12,5 mg/kg + DXR
	2	CAB7 β 25 mg/kg + DXR
	3	CAB7 β 50 mg/kg + DXR
	4	CAB7 β 50 mg/kg sozinha por 24 h
	5	Controle negativo* - Substância veículo por 24 h
	6	Controle positivo DXR 5 mg/kg por 24 h
Grupos de Pré-tratamento	7	CAB7 β 12,5 mg/kg durante 5 dias
	8	CAB7 β 25 mg/kg durante 5 dias
	9	CAB7 β 50 mg/kg durante 5 dias
	10	CAB7 β 50 mg/kg sozinha durante 5 dias
	11	Controle negativo* - Substância veículo durante 5 dias
Grupos de Pós-tratamento	12	<i>Todos os grupos foram tratados inicialmente com a DXR</i> 6h depois: 12,5 mg/kg da Chalcona; 12h depois: 12,5 mg/kg da Chalcona
	13	6h depois: 25mg/kg da CAB7 β ; 12h depois: 25 mg/kg da CAB7 β
	14	6h depois: 50 mg/kg da CAB7 β ; 12h depois: 50 mg/kg da CAB7 β

*DMSO (0,1 mL/10g p.c.).

4.4.3. Procedimento experimental

O procedimento experimental seguido em conformidade com o método de Heddle (1973). Todos os animais tratados com a DXR foram eutanasiados por deslocamento cervical após 24h da administração; e os animais que receberam apenas a CAB7 β foram sacrificados 24h após a última administração do composto.

Após o processo de eutanásia por deslocamento cervical, conforme descrito pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) como procedimento mais rápido e conciso, a epífise proximal do fêmur foi removida e a medula óssea hematopoiética foi aspirada com 1mL de soro bovino fetal. Após a homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 1000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado e o precipitado de células foi homogeneizado com pipeta. Posteriormente a preparação laminar foi realizada com uma gota (10 μ g do precipitado). Após a secagem das lâminas, estas foram coradas segundo método rápido de coloração hematológica de Romanowsky, com uso do kit Panótico.

4.5. Avaliação das atividades mutagênica e antimutagênica da CAB7 β pelo teste de Ames

4.5.1. Cepas Bacterianas

As cepas de *S. typhimurium* TA98 e TA100 utilizadas no teste de Ames, foram fornecidas pelo Laboratório de Radiobiologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

4.5.2. Reagentes, soluções e meios de cultura utilizados no teste de Ames

Solução de sais de Vogel-Bonner

- Sulfato de magnésio P. A. (1 g), ácido cítrico monohidratado P.A. (10 g), fosfato de potássio dibásico P. A. (50 g), fosfato de sódio e amônio P. A. (17,5 g), água destilada (65 ml).

- **Solução de Dextrose 40%**
- Dextrose P. A. (60g), água destilada (90 ml).

Meio Mínimo Glicosado (placa-teste)

- Ágar (15 g), solução de sais de Vogel-Bonner (20 ml), solução de dextrose (50 ml), água destilada (930 ml).

Para a preparação das placas-teste contendo o Meio Mínimo Glicosado, foram distribuídos 25 mL do meio de cultura em placas de Petri as quais permaneceram por 12 horas em estufa a 37°C.

Soluções de histidina e biotina

- Histidina (50 mg), água destilada (10 ml), biotina (18 mg), água destilada (125 ml).

Traços de histidina e biotina

- Biotina (30,9 mg), L-Histidina (24 mg), água destilada (250 ml).

Ágar de superfície (top-ágar)

- Ágar Bacto (0,6 g), cloreto de Sódio (NaCl) (0,5 g), solução de histidina/biotina (10 ml), água destilada (250 ml).

Caldo Nutritivo

- Caldo Nutritivo (2,5 g), água destilada (100 ml).

Controle Positivo:

- TA98 – 4 nitroquinolina (4NQO - 0,005 µg).
- TA100 - Azida sódica (0,005 µg), água destilada (1ml).

Controle Negativo:

- TA 98 e 100 – DMSO

4.5.3. Procedimento experimental

O teste de mutagenicidade de Ames foi realizado conforme a metodologia proposta por Maron & Ames (1983). As cepas de *S. typhimurium* TA98 e TA100 foram incubadas por 12h em caldo nutriente, a 37°C, sob agitação e aeração constantes em banho-maria agitador, até atingirem a fase estacionária de crescimento ($1-2 \times 10^9$ cells/mL). Na investigação do efeito mutagênico, alíquotas de 100 µl das culturas de cada cepa bacteriana foram incubadas com 12,5, 25 e 50 µg/placa da CAB7β por 25 minutos à 37°C, em tubos de ensaio em triplicata com agitação e aeração constantes. Os controles negativo (10 µL de DMSO) e positivo (1,5 µg de 4NQO por placa para TA98, e 3 µg de azida sódica para TA100) também foram incluídos nos experimentos.

Na avaliação da atividade antimutagênica, os controles positivos foram co-administrados com diferentes doses da CAB7β (12,5, 25 e 50 µg/placa). Após a incubação, foi adicionado ágar glicosado liquefeito (top-ágar) à temperatura de 45°C, contendo solução de histidina/biotina (0,5 mM), 0,6% de ágar Difco e 0,5% de NaCl. O conteúdo foi vertido em placas de Petri, em triplicata, contendo ágar mínimo glicosado (1,5% de ágar, 2% de glicose e solução de sais de Vogel-Bonner), que foram incubadas a 37°C durante 48 horas em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O.). Após este período, os números de colônias revertentes prototróficas para histidina foram contados, considerando a média aritmética dos resultados entre as placas (Figura 13).



Figura 13. Etapas do teste de Ames para investigação de atividade antimutagênica da CAB7 β . A) Incubação da cepa *S. typhimurium* TA98 em caldo nutriente; B) Remoção da cepa TA98 após 12h de incubação; C) Adição de top-ágar em tubos de triplicata contendo a cepa bacteriana incubada com a CAB7 β ; D) Reversão do conteúdo dos tubos em placas de Petri, em triplicata, contendo ágar mínimo glicosado; E) Incubação das placas de Petri em estufa D.B.O.; F) Placa de Petri contendo colônias revertentes da cepa TA98 após incubação em B.O.D. com a CAB7 β (Acervo S. R. L. Pontes).

4.6. Análise de dados

Na análise da atividade angiogênica e antiangiogênica da chalcona sobre as MCAs e em concomitância com as células S180, além da análise de todos os parâmetros investigados no ensaio histológico das MCAs, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste não paramétrico de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Para analisar a mutagenicidade da chalcona pelo teste do micronúcleo, foi o utilizado o teste t de Student para a comparação das frequências dos resultados obtidos dos grupos tratados com as substâncias testes com o grupo controle positivo. Esses resultados também foram comparados ao grupo de controle negativo pelo mesmo teste. O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05. Para avaliar a ação de citotóxica, considerou-se a relação de micronúcleos presentes em EPC e ENM das amostras que receberam a chalcona, nas três concentrações utilizadas, comparando-a ao controle positivo pelo teste de qui-quadrado.

Na avaliação da mutagenicidade da chalcona pelo teste de Ames, após a contagem do número de revertentes foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose utilizada. A RM consiste na seguinte equação:

$$RM = \frac{\text{média do nº de revertentes por placa teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média do nº de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

Considera-se como resultado positivo para a mutagenicidade, quando o número de colônias revertentes nas placas teste for igual ou superior ao dobro do número de colônias revertentes espontâneas do controle negativo (Maron & Ames, 1983). Os resultados também foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA e *post hoc* Tukey.

Na avaliação da antimutagenicidade, a normalidade dos resultados foi determinada pelo teste estatístico ANOVA e *post hoc* Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo quando comparado ao controle positivo. A análise estatística foi realizada utilizando o software Bioestat BioStat LE, versão 6.2.2.0. A porcentagem de inibição da mutagenicidade (PI) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$PI(\%) = \left[1 - \left(\frac{\text{nº de revertentes na placa teste} - RE}{\text{nº de revertentes na placa do controle positivo} - RE} \right) \right] \times 100$$

Placa teste: placas incubadas com mutágeno e composto.

Placa do controle positivo: placa incubada somente com o mutágeno.

RE: revertentes espontâneos (cepas testes incubadas na ausência de composto e mutágeno).

4.7. Caracterização Fotofísica da CAB7 β

4.7.1. Procedimento experimental

A amostra da CAB7 β foi avaliada pela técnica de espectroscopia de absorção UV/Vis. A amostra foi devidamente pesada e então diluída em DMSO P.A. e sua concentração foi ajustada para 200 μ M. A leitura do seu espectro foi adquirida no Laboratório de Fotofísica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF/UFG), em um espectrofotômetro UV-Vis U-2900 – Hitachi e em uma cubeta de quartzo de 2,0 mm x 10 mm (Isaac et al., 2005).

O monitoramento da dependência do valor da absorbância da CAB7 β em função de sua concentração foi realizado para obtenção do coeficiente de absorção molar (ϵ). Este coeficiente ϵ é um parâmetro que reporta a probabilidade de absorção da radiação de uma amostra em função do comprimento de onda da radiação. Para determinar o valor de ϵ com precisão, foram realizadas medidas de absorção variando a concentração da amostra da CAB7 β . Para isso, foi utilizada a relação de Lambert-Beer, dada por (Galo & Colombo, 2009):

$$A = \epsilon Cl \quad (1)$$

Esta expressão relaciona a absorbância (A) da amostra com o coeficiente de absorção molar (ϵ), a concentração molar (C) e o caminho óptico que a luz irá percorrer, ou seja, o comprimento da cubeta (l). Em um gráfico que monitora a absorbância em função da concentração molar, a inclinação da curva pelo seu coeficiente angular da reta é dada por:

$$tg\alpha = \Delta A / \Delta C \quad (2)$$

onde α representa o ângulo formado entre a curva e o eixo da concentração. Igualando as equações (1) e (2) e considerando o valor de um ponto da curva com determinada absorção e concentração, obtém-se:

$$\varepsilon = \text{tg}\alpha / l \quad (3)$$

Evidentemente, o coeficiente de absorção molar depende do comprimento de onda da radiação.

4.7.2. Análise dos efeitos de DMSO sobre o espectro de absorção da CAB7 β

4.7.2.1. Métodos Computacionais

Foram utilizados cálculos B3LYP para obtenção das geometrias moleculares de mínima energia da molécula da CAB7 β . Cálculos TD-DFT com o funcional CAM-B3LYP foram usados para determinar os resultados teóricos do espectro de absorção e dos orbitais moleculares de fronteira. Todos os cálculos foram realizados no pacote de estrutura eletrônica do programa Gaussian (Tomasi et al., 1999; Frisch et al., 2009).

5. REFERENCIAS

- Abegão, L. M. G., Fonseca, R. D., Santosa, F. A., Souza, G. B., Barreiros, A. L. B. S., Barreiros, M. L., Alencar, M. A. R. C., Mendonça, C. R., Silva, D., Boni, L., & Rodrigues-Jr, J. J. (2016). Second- and Third-Order Nonlinear Optical Properties of Unsubstituted and Mono-Substituted Chalconas. *Chemical Physics Letters*, 648: 91–96.
- Ackermann, A., Karagöz, A. C., Choochani, A., Buchfelder, M., Eyüpoglu, I., Tsoqoeva, S. B., & Savaskan, N. (2017). Cytotoxic profiling of artesunic and betulinic acids and their synthetic hybrid compound on neurons and gliomas. *Oncotarget*, 7 jun.
- Adad, L. M. de M., de Andrade, H. H. R., Kvitko, K., Lehmann, M., Cavalcante, A. A. de C. M., & Dihl, R. R. (2015). Occupational exposure of workers to pesticides: Toxicogenetics and susceptibility gene polymorphisms. *Genetics and Molecular Biology*, 38(3), 308–315.
- Aesoy, R., Sanchez, B. C., Norum, J. H., Lewensohn, R., Viktorsson, K., & Linderholm, B. (2008). An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signaling loop confers resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Research*, 6:1630–8.
- Agarwal, A., Rhoades, W. R., Hanout, M., Soliman, M. K., Sarwar, S., Sadiq, M. A., & Nguyen, Q. D. (2015). Management of neovascular age-related macular degeneration: current state-of-the-art care for optimizing visual outcomes and therapies in development. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 9, 1001–1015. h
- Agatonovic-Kustrin, S., & Morton, D. W. (2012). The Use of UV-Visible Reflectance Spectroscopy as an Objective Tool to Evaluate Pearl Quality. *Marine Drugs*, 10(7): 1459–1475.
- Albarici, T.R., Vieira, P.C., Fernandes, J. B., Silva, M. F. G. F., & Pirani, J. R. (2010). *Química Nova*, 33: 2130-2134.

Alcaraz, M. J., Vicente, A. M., Araico, A., Dominguez, J. N., Terencio, M. C., & Ferrandiz, M. L. (2004). Role of nuclear factor-kB and heme oxygenase-1 in the mechanism of action of an anti-inflammatory chalcone derivative in RAW 264.7 Cells. *British Journal of Pharmacology*, 142: 1191–1199.

Alibeiki, F., Jafari, N., Karimi, M., & Peeri Dogaheh, H. (2017). Potent anti-cancer effects of less polar Curcumin analogues on gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma cells. *Scientific Reports*, 7, 2559.

Almeida, L. M., Floriano, J. F., Ribeiro, T. P., Magno, L. N., Mota, L. S. L. S., Peixoto, N., Mrue, F., Melo-Reis, P. R., Lino-Junior, R. S., Graeff, C. F. O., & Gonçalves, P. J. (2014). *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25: 2153–2162.

Al-Shabrawey, M., Elsherbiny, M., Nussbaum, J., Othman, A., Megyerdi, S., & Tawfik, A. (2013). Targeting Neovascularization in Ischemic Retinopathy: Recent Advances. *Expert Review of Ophthalmology*, 8(3), 267–286.

Alvarado-Gonzalez, A., & Arce, I. (2015). Tiotropium Bromide in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Bronchial Asthma. *Journal of Clinical Medicine Research*, 7(11): 831–839.

Amankwah, E. K., Conley, A. P., & Reed, D. R. (2013). Epidemiology and therapies for metastatic sarcoma. *Clinical Epidemiology*, 5, 147–162.

Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., & Lee, F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70:2281–5.

Araújo, L. A., Assunção, L. A., Silva-Júnior, N. J., Lemes, S. R., & Melo-Reis, P. R. (2015). Angiogenic activity of sucupira (*Pterodon emarginatus*) oil. *Scientia Medica*, 25: 1-7.

Arruda, A. L. A., Souza, D. G., Vieira, C. J. B., Oliveira, R. F., Pavan, F. R., Fujimura, C. Q. L., Resende, U. M., & Castilho, R. O. (2012). Análise fitoquímica e atividade antimicobacteriana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(2): 276-281.

Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8): 1582–1614.

Attia, S. M., Bakheet, S. A., & Al-Rasheed, N. M. (2010). Proanthocyanidins Produce Significant Attenuation of Doxorubicin-Induced Mutagenicity via Suppression of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(6): 404–413.

Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., & Folkman, J. (1974). A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos. *Developmental Biology*, 41:391-394.

Baba, A. I., & Cătoi, C. (2007). Comparative Oncology. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy; Chapter 2, Carcinogenesis.

Baker, L. C., Boulton, J. K., Thomas, M., Koehler, A., Nayak, T., Tessier, J., & Robinson, S. P. (2016). Acute tumour response to a bispecific Ang-2-VEGF-A antibody: insights from multiparametric MRI and gene expression profiling. *British Journal of Cancer*, 115 (6), 691–702.

Bandgar, B. P., Gawande, S. S., Bodade, R. G., Totre, J. V., & Khobragade, C. N. (2010). Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18:1364–1370.

Banihashemian, S. M., Periasamy, V., Boon Tong, G., & Abdul Rahman, S. (2016). Spectroscopic (UV/VIS, Raman) and Electrophoresis Study of Cytosine-Guanine Oligonucleotide DNA Influenced by Magnetic Field. *PLoS ONE*, 11(3): e0149488.

- Barreiro, E. J., & Bolzani, V. S. (2009). Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, 32(3): 679-688.
- Batista, L. S., Olinda, R. S., Medeiros, V. B., Rodrigues, C. M. F., Oliveira, A. F., & Paiva, E. S. (2012). Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. *Ciência Rural*, 42(1): 136-141.
- Batista, L. S., Olinda, R. S., Medeiros, V. B., Rodrigues, C. M. F., Oliveira, A. F., & Paiva, E. S. (2012). Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. *Ciência Rural*, 42(1): 136-141.
- Beck, B., Driessens, G., Goossens, S., Youssef, K. K., Kuchnio, A., Caaauwa, A., Sotiropoulou, P. A., Loges, S., Candi, A., Mascre, G., Drogat, B., Dekoninch, S., Haigh, J. J., Carmeliet, P., & Blanpain, C. (2011). A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature*, 478:399–403.
- Bharatham, K., Bharatham, N., Park, K. H., & Lee, K. W. (2008). Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of α -glucosidase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26: 1202-12.
- Bhattacharya, S. (2011). Natural antimutagens: a review. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5: 116-26.
- Boggs, D. A., Palmer, J. R., Wise, L. A., Spiegelman, D., Stampfer, M. J., Adams-Campbell, L. L., & Rosenberg, L. (2010). Fruit and Vegetable Intake in Relation to Risk of Breast Cancer in the Black Women's Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 172(11): 1268–1279.
- Boller, K., & Schmid, W. (1970). Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo-Testsystem. Haematologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. *Human Genetik*, 11: 35–54.
- Bortolotto, L. F. B., Barbosa, F. R., Silva, G., Bitencourt, T. A., Belebony, R. O., Baek, S. J., Marins, M., Fachin, A. L. (2017). Cytotoxicity of trans-chalcone and

licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (85): 425-433.

Boumendjel, A., Boccard, J., Carrupt, P. A., Nicolle, E., Blanc, M., Geze, A., Choisnard, L., Wouessidjewe, D., Matera, E. L., & Dumontet, C. (2008). Antimitotic and antiproliferative activities of chalcones: forward structure-activity relationship. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51:2307–2310.

Božić, D. D., Milenković, M., Ivković, B., & Cirković, I. (2014). Antibacterial activity of three newly-synthesized chalcones & synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Indian Journal of Medical Research*, 140(1), 130–137.

Brown, J. Q., Vishwanath, K., Palmer, G. M., & Ramanujam, N. (2009). Advances in Quantitative UV-Visible Spectroscopy for Clinical and Pre-clinical Application in Cancer. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(1): 119–131.

Buch, D. R., Arantes, A. B., & Campelo, P. M. S. (2008). Verificação da atividade cicatrizante do exudato de folhas de *Jatropha multifida* L. *Revista Brasileira de Farmácia*, 89(2): 142-145.

Bukhari, S. N., Tajuddin, Y., Benedict, V. J., Lam, k. N., Jantan, I., Jalil, L., Jasamai, M. (2014). Synthesis and Evaluation of Chalcone Derivatives as Inhibitors of Neutrophils' Chemotaxis, Phagocytosis and Production of Reactive Oxygen Species. *Chemical Biology & Drug Design*, 83(2): 198–206

Cao, Y. (2009). Tumor angiogenesis and molecular targets for therapy. *Frontiers Bioscience*, 14: 3962–73.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6): 653-660.

Carneiro, CC., da Costa Santos, S., de Souza Lino, Jr., Bara, M. T., Chaibub, B. A., de Melo Reis, P. R., Chaves, D. A., da Silva, A. J., Silva, L. S., de Melo e Silva, D., & Chen-Chen, L. (2016). Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin

isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 310: 1-8.

Carvalho, A. P., & Ferreira, P. C. G. (2013). Biotecnologia da Biodiversidade: Um Novo Instituto Brasileiro. *Revista Virtual de Química*, 5 (3): 328-342.

Chang, J. H., Garg, N. K., Lunde, E., Han, K.-Y., Jain, S., & Azar, D. T. (2012). Corneal Neovascularization: An Anti-VEGF Therapy Review. *Survey of Ophthalmology*, 57(5), 415–429.

Chaves, D. A., Lemes, S. R., Araujo, L. A., Sousa, M. A. M., Freitas, G. B., Lino-Junior, R. S., Mrue, F., & Melo-Reis, P. R. (2016). Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18: 524530.

Chaves, M.H. (2006). Plantas medicinais: importância e desafios. *Sapiência*, 3(10).

Chen, C. K., Yu, W. H., Cheng, T. Y., Chen, M. W., Su, C. Y., Yang, Y. C., & Kuo, M. L. (2016). Inhibition of VEGF₁₆₅/VEGFR2-dependent signaling by LECT2 suppresses hepatocellular carcinoma angiogenesis. *Scientific Reports*, 6, 31398.

Chiaradia, L. D., Mascarello, A., Purificacao, M., Vernal, J., Cordeiro, M. N. S., Zenteno, M. E., Villarino, A., Nunes, R. J., Yunes, Rosendo A., & Terenzi, H. (2008). Synthetic chalcones as efficient inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(23): 6227-6230.

Clapp, G., Thebault, S., Jeziorski, M. C., & Escalera, G. M. (2009). Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiological Reviews*, 89(4): 1177-1215.

Corrêa, P. G., Pimentel, R. M. de M., Cortez, J. S. de A., & Xavier, H. S. (2008). Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais Brasileiras. *Ciência e Cultura*, 60(3).

Costa, P. R. R. (2009). Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. *Revista Virtual de Química*, 1(1): 58-66.

- Cotran, R., Kumar, V., & Collins, T. (1999). *Pathologic Basis of Disease* - cap 8. 6^a ed. WB Saunders. Philadelphia.
- Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D., & Werb, Z. (2000). MMP-9 Supplied by Bone Marrow-Derived Cells Contributes to Skin Carcinogenesis. *Cell*, 103(3), 481–490.
- Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T., & Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(9): 488 – 494.
- Cruzan, G. (2009). Assessment of the cancer potential of methanol. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(4): 347-63.
- Dao, T. T. H., Linthorst, H. J. M., & Verpoorte, R. (2011). Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, 10(3): 397–412.
- de Oliveira, J.T., Barbosa, M.C., de Camargos, L.F., da Silva, I. V., Varotti, F. P., da Silva, L. M., Moreira, L. M., Lyon, J. P., dos Santos, V. J., & dos Santos, F. V. (2017). Digoxin reduces the mutagenic effects of Mitomycin C in human and rodent cell lines. *Cytotechnology*, 69 (185): 1-12.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology*, 4(6): 687–699.
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2015). Tumor Angiogenesis: MMP-Mediated Induction of Intravasation- and Metastasis-Sustaining Neovasculature. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, 44-46, 94–112.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2(2): 303–336.
- Domínguez, J. N., León, C., Rodrigues, J., Domínguez, N. G., Gut, J., & Rosenthal, P. J. (2005). Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. *Il Farmaco*, 60: 307–11.
- Dourado, P. L. R., da Rocha, M. P., Roveda, L. M., Raposo, J. L., Cândido, L. S., Cardoso, C. A. L., & Grisolia, A. B. (2017). Genotoxic and mutagenic effects of

polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays. *Genetics and Molecular Biology*, 40(1): 123–133.

Ducki, S., Rennison, D., Woo, M., Kendall, A., Chabert, J. F., McGown, A. T., & Lawrence, N. J. (2009). Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: synthesis and biological evaluation of antivasular activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17:7698–7710.

Dudley, A. C. (2012). Tumor Endothelial Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(3), a006536.

Dyrager, C., Wickstrom, M., Fridén-Saxin, M., Friberg, A., Dahlén, K., Wallén, E. A. A., Gullbo, J., Grotti, M., & Luthman, K. (2011). Inhibitors and promoters of tubulin polymerization: synthesis and biological evaluation of chalcones and related dienones as potential anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19: 2659–65.

Eastmond, D. A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W. A., Cimino, M. C., Dobrev, I., Douglas, G. R., Nohmi, T., Phillips, D. H., & Vickers, C. (2009). Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*, 24: 341–349.

Eldahshan, O. A. (2011). Isolation and structure elucidation of phenolic compounds of carob leaves grow in Egypt. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3: 52-55.

Ellis, L. M., & Hicklin, DJ. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer*, 8: 579–591.

Erdtmann, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: Silva, J., Erdtmann, B., & Henriques, J. A. P. (2003). *Genética Toxicológica*. 1 ed. Porto Alegre: Ed. Alconce, pp. 26-27.

Evans, H. J., Neary, G. J., & Williamson, F. S. (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and

the effect of oxygen: Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology*, 3: 216–29.

Eventi, A., Lubrano, V., Scarpato, R., Turchi, G. (2009). Protective effects of plicatin B on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by different mutagens. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 124–8.

Expósito, O., Bonfill, M., Moyano, E., Onribia, M., Mirjalili, M. H., Cusidó, R. M., & Palazón, J. (2009). Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9(1): 109-121.

Falah, R. R., Talib, W. H., & Shbailat, S. J. (2017). Combination of metformin and curcumin targets breast cancer in mice by angiogenesis inhibition, immune system modulation and induction of p53 independent apoptosis. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 9(4), 235–252.

Farvid, M. S., Chen, W. Y., Michels, K. B., Cho, E., Willett, W. C., & Eliassen, A. H. (2016). Fruit and vegetable consumption in adolescence and early adulthood and risk of breast cancer: population based cohort study. *The BMJ*, 353, i2343.

Ferreira, M., Mendonça, R. J., Netto, J. C., Mulato, M. (2009). Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Brazilian Journal of Physics*, 39(3): 564-9.

Ferrini, K., Ghelfi, F., Mannucci, R., & Titta, L. (2015). Lifestyle, nutrition and breast cancer: facts and presumptions for consideration. *E Cancer Medicinal Science*, 9: 1-11.

Findik, E., Dingil, A., Karaman, I., & Ceylan, M. (2009). Synthesis of terpenoid-like bischalcones from α - and β -ionones and their biological activities. *Synthetic Communications*, 39(24).

Fonseca, J., Marques, S., Silva, P. M. A., Brandão, P., Cidade, H., Pinto, M. M., & Bousbaa, H. (2016). Prenylated Chalcone 2 Acts as an Antimitotic Agent and Enhances the Chemosensitivity of Tumor Cells to Paclitaxel. *Molecules*, 21, 982: 1-14.

- Foubert, P., & Varner, J. A. (2012). Integrins in Tumor Angiogenesis & Lymphangiogenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 757: 471–486.
- Freedman, D. A., Peña-Purcell, N., Friedman, D. B., Ory, M., Flocke, S., Barni, M. T., & Hébert, J. R. (2014). Extending Cancer Prevention to Improve Fruit and Vegetable Consumption. *Journal of Cancer Education: The Official Journal of the American Association for Cancer Education*, 29(4): 790–795.
- Fridlender, M., Kapulnik, Y., & Koltai, H. (2015). Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. *Frontiers in Plant Science*, 6, 799.
- Galo, A. L., & Colombo, M. F. (2009). Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. *Química Nova*, 32(9): 488-492.
- Garcia, Eloi S. (1995). Biodiversidade, biotecnologia e saúde. *Cadernos de Saúde Pública*, 11(3): 495-500.
- Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews. Cancer*, 13(12): 871–882.
- Goodson-Gregg, N., & De Stasio, E. A. (2009). Reinventing the Ames Test as a Quantitative Lab That Connects Classical and Molecular Genetics. *Genetics*, 181(1): 23–31.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition. New York: W. H. Freeman; Spontaneous mutations.
- Grünewald, T. G. P., Bernard, V., Gilardi-Hebenstreit, P., Raynal, V., Surdez, D., Aynaud, M.-M., & Delattre, O. (2015). Chimeric *EWSR1-FLI1* regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene *EGR2* via a GGAA microsatellite. *Nature Genetics*, 47(9): 1073–1078.

Gu, J., Yuanshen, G., Chen, L., Yuan, G., Lu, H. Z., & Xu, X. (2013). Use of natural products as chemical library for drug discovery and network pharmacology. *Plos One*, 8(4): 1-10.

Guidance for industry: chronic cutaneous ulcer and burn wounds e developing products for treatment. (2006). U.S. Department of Health and Human Services e Food and Drug Administration; June 2006.

Guido, R. V. C., Adriano, A. D., & Oliva, G. (2010). Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, 24(70): 81-98.

Gupta, D., & Jain, D. K. (2015). Chalcone derivatives as potential antifungal agents: Synthesis, and antifungal activity. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 6(3): 114–117.

Gutierrez, K. D., Morris, V. A., Wu, D., Barcy, S., & Lagunoff, M. (2013). Ets-1 Is Required for the Activation of VEGFR3 during Latent Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection of Endothelial Cells. *Journal of Virology*, 87(12): 6758–6768.

Guzy, J., Vašková-Kubálková, J., Rozmer, Z., Fodor, K., Mareková, M., Poškrobová, M., Perjési, P. (2010). Activation of oxidative stress response by hydroxyl substituted chalcones and cyclic chalcone analogues in mitochondria. *FEBS Letters*, 584(3): 567-570.

Hakura, A., Suzuki, S., Sawada, S., Motooka, S., & TSatoh, T. (2001). An improvement of the Ames test using a modified human liver S9 preparation. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 46(3): 169-72.

Hakura, A., Suzuki, S., Sawada, S., Sugihara, T., Hori, Y., Uchida, K., Kerns, W. D., Satoru, S., Motooka, S., & Satoh, T. (2003). Use of human liver S9 in the Ames test: assay of three procarcinogens using human S9 derived from multiple donos. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37(1): 20-7.

Hammer-Wilson, M. J., Cao, D., Kimel, S., & Berns, M. W. (2002). Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for

photosensitizers administered intraperitoneally (IP) into the chick embryo. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(9): 721–728.

Hanusch, A. L., de Oliveira, G. R., de Sabóia-Morais, S. M. T., Machado, R. C., dos Anjos, M. M., & Chen Chen, L. (2015). Genotoxicity and Cytotoxicity Evaluation of the Neolignan Analogue 2-(4-Nitrophenoxy)-1Phenylethanone and its Protective Effect Against DNA Damage. *PLoS ONE*, 10(11), e0142284.

Hassan, L. E. A., Dahham, S. S., Saghir, S. A. M., Mohammed, A. M. A., Eltayeb, N. M., Majid, A. M. S. A., & Majid, A. S. A. (2016). Chemotherapeutic potentials of the stem bark of *Balanite aegyptiaca* (L.) Delile: an antiangiogenic, antitumor and antioxidant agent. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 396.

Hayashi, M. (2016). The micronucleus test—most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes and Environment*, 38, 18.

Heddle, J. A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research*, 18: 187–190.

Heinke, R., Franke, K., Porzel, A., Wessjohann, L. A., Ali, N. A. A., & Schmidt, J. (2011). *Phytochemistry*, 72: 929–934.

Hervé, M. A., Buteau-Lozano, H., Vassy, R., Bieche, I., Velasco, G., & Pla, M. (2008). Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. *American Journal of Pathology*, 172:167–78.

Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Oosterom, A. T. V., & Bruijn, E. A. (2004). *Pharmacological Reviews*, 56 (4): 549-580.

Horta, R. N., Kahl, V. F. S., Sarmiento, M. da S., Nunes, M. F. S., Porto, C. R. M., de Andrade, V. M., & Silva, J. D. (2016). Protective effects of acerola juice on genotoxicity induced by iron *in vivo*. *Genetics and Molecular Biology*, 39(1): 122–128.

Hu, B., Zhang, H., Meng, X., Wang, F., & Wang, P. (2014). Aloe-emodin from rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory

responses in RAW264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 153 (3): 846–853.

Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S., & Philpott, K. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6): 1239–1249.

Hussain, H., & Green, I. R. (2017). Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research (1997-2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27(8): 1-11.

Isaac, V. L. B., Silva, T. M. A., Migliato, K. F., & Salgado, R. N. (2005). Qualidade de creme fotoprotetor A/O. *Cosmetics and Toiletries*, 17(2): 68-70.

Jansen, R. J., Robinson, D. P., Stolzenberg-Solomon, R. Z, *et al.* (2013). Nutrients from fruit and vegetable consumption reduce the risk of pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 44: 152–161.

Jantan, I., Bukhari, S. N. A., Adekoya, O. A., & Sylte, I. (2014). Studies of synthetic chalcone derivatives as potential inhibitors of secretory phospholipase A₂, cyclooxygenases, lipoxygenase and pro-inflammatory cytokines. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 1405–1418.

Jimenez, P., Pathak, A., & Phan, A. T. (2011). The role of taxanes in the management of gastroesophageal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2(4): 240–249.

Jin, Y., Kaluza, D., & Jakobsson, L. (2014). VEGF, Notch and TGFβ/BMPs in regulation of sprouting angiogenesis and vascular patterning. *Biochemical Society Transactions*, 42(6): 1576-83.

Joly, C. A., Haddad, C. F. B., Verdade, L. M., Oliveira, M. C., Bolzani, V. S., & Berlink, R. G. S. (2011). Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. *Revista USP*, 89: 114-133.

Joshua, M., Okere, C., Sylvester, O., Yahaya, M., Precious, O., Dluya, T., & Jahng, W. J. (2017). Disruption of Angiogenesis by Anthocyanin-Rich Extracts of *Hibiscus*

sabdariffa. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 8(2): 299–307.

Kada, T., & Shimoi, K. (1987). Desmutagens and bio-antimutagens: Their modes of action. *BioEssays*, 7:113-115.

Kada, T., Inoue, T., & Namiki, N. (1982). Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowski EJ (ed) *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*. Praeger, New York, pp 137-151.

Kang, S. H., Kwon, J. Y., Lee, J. K., & Seo, Y. R. (2013). Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. *Journal of Cancer Prevention*, 18(4): 277–288.

Karamysheva, A. F. (2008). Mechanisms of Angiogenesis. *Biochemistry*, 73(7): 751-762.

Karki, R., Kang, Y., Kim, C, H., Kwak, K., Kim, J. A., & Lee, E. S. (2012). Hydroxychalcones as potential antiangiogenic agent. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(9): 2926-2929.

Kim, K. N., Ko, Y. J., & Kang, M. C. (2013). Anti-inflammatory effects of trans-1,3-diphenyl-2,3-epoxypropane-1-one mediated by suppression of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 53: 371–375.

Kiran, M. S., Anand, B., Sai, S. S. S., & Rao, G. N. (2014). Second- and Third-Order Nonlinear Optical Properties of Bis-Chalcone Derivatives. *J. Photochem. Photobiol. A*. 290: 38–42.

Kong, Y., Grembecka, J., Edler, M. C., Hamel, E., Mooberry, S. L., Sabat, M., Rieger, J., & Brown, M. L. (2005). Structure-based discovery of a boronic acid bioisostere of combretastatin A-4. *Chemistry & Biology*, 12: 1007–1014.

Kong, Y., Wang, K., Edler, M. C., Hamel, E., Mooberry, S. L., Paige, M. A., & Brown, M. L. (2010). A boronic acid chalcone analog of combretastatin A-4 as a potent anti-proliferation agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(2).

Kormann, E. C., Amaral, P. A., David, M., Eifler-Lima, V., Cechinel-Filho, V., & Buzzi, F. C. (2012). Kavain analogues as potential analgesic agentes. *Pharmacological Reports*, 64:1419-1426.

Krishna, G., Petreere, J., Anderson, J., & Theiss, J. (1995). Use of cyclophosphamide as a positive control in dominant lethal and micronucleus assays. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 335(3): 331-337.

Lahlou, M. (2013). The success of natural products in drug discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 4:17-31.

Lee J. S., Bukhari, S. N. A., & Fauzi, N. M. (2015). Effects of chalcone derivatives on players of the immune system. *Drug Design, Development and Therapy*, 9: 4761–4778.

Lee, J. S., Kang, Y., Kim, J. T., Thapa, D., Lee, E. S., & Kim, J. A. (2012). The anti-angiogenic and anti-tumor activity of synthetic phenylpropenone derivatives is mediated through the inhibition of receptor tyrosine kinases. *European Journal of Pharmacology*, 677(1-3): 22-30.

Lee, S. A., Ryu, H. W., Kim, Y. M., Choi, S., Lee, M. J., Kwak, T. K., Kim, H. J., Chuo, M., Park, H. K., & Lee, J. W. (2009). Blockade of fourtransmembrane L6 family member 5 (TM4SF5)-mediated tumorigenicity in hepatocytes by a synthetic chalcone derivative. *Hepatology*, 49: 1316-25. .

Lee, S. A., Ryu, H. W., Kim, Y. M., Choi, S., Lee, M. J., Kwak, T. K., Kim, H. J., Cho, M., Park, K. H., & Lee, J. W.(2009). Blockade of four-transmembrane L6 family member 5 (TM4SF5)-mediated tumorigenicity in hepatocytes by a synthetic chalcone derivative. *Hepatology*, 49:1316–1325.

Lee, T. H., Seng, S., Sekine, M., Hinton, C., & Fu, Y., Avraham, H. K., & Avraham, S. (2007). Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human

breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Medicine*, 4(6):e186

Lee, Y. S., Lim, S. S., Shin, K. H., Ohuchi, K., Jung, S. H. (2006). Anti-angiogenic and anti-tumor activities of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(5): 1028-31.

Lim, J., Yang, K., Taylor-Harding, B., Wiedemeyer, W. R., & Buckanovich, R. J. (2014). VEGFR3 Inhibition Chemosensitizes Ovarian Cancer Stemlike Cells through Down-Regulation of BRCA1 and BRCA2. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 16(4), 343–353.e2.

Lima, R. S., Perez, C. N., da Silva, C. C., Santana, M. J., Queiroz Júnior, L. H. K., Barreto, S., de Moraes, M. O., & Martins, F. T. (2016). Structure and cytotoxic activity of terpenoid-like chalcones. *Arabian Journal Chemistry*, 1-12.

Liu, X., & Go, M. L. (2006). Antiproliferative properties of piperidinylchalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14:153–163.

Liu, X., & Go, M. L. (2007). Antiproliferative activity of chalcones with basic functionalities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15:7021–7034.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Dameli, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; Section 8.1, Mutations: Types and Causes.

Lund, A. W., Wagner, M., Fankhauser, M., Steinskog, E. S., Broggi, M. A., Spranger, S., & Swartz, M. A. (2016). Lymphatic vessels regulate immune microenvironments in human and murine melanoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(9), 3389–3402.

Ma, Q. G., Li, T., Wei, R. R., Liu, W. M., Sang, Z. P., & Song, Z. W. (2016). Characterization of Chalcones from *Medicago sativa* L. and Their Hypolipidemic and Antiangiogenic Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(43): 8138-8145.

Magnuson, B., Munro, I., Abbot, P., Baldwin, N., Lopez-Garcia, R., Ly, K., & Socolovsky, S. (2013). Review of the regulation and safety assessment of food substances in various countries and jurisdictions. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 30(7), 1147–1220.

Mahajan, A., & Pai, N. (2010). *Journal Chemical and Pharmaceutical Research*, 2: 97-103.

Mai, C. W., Yaeghoobi, M., Abd-Rahman, N., Kang, Y. B., & Pichika, M. R. (2014). Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 77: 378-87.

Maistro, E. L. (2014). The In Vivo Rodent Micronucleus Test. In.: SIERRA LM; GAIVÃO I. Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach, Methods in Pharmacology and Toxicology. 1a ed. New York: Springer, Cap. 6.

Maria, K., Dimitra, H. L., & Maria, G. (2008). Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcones and related Mannich bases. *Medicinal Chemistry*, 4(6): 596-596.

Marie, C., Cabut, S., Vendittelli, F., & Sauvart-Rochat, M. P. (2016). Changes in Cosmetics Use during Pregnancy and Risk Perception by Women. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(4), 383.

Maron, D. M., Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215.

Martin, J. W., Squire, J. A., & Zielenska, M. (2012). The Genetics of Osteosarcoma. *Sarcoma*, 2012, 627254.

Mathur, S., & Hoskins, C. (2017). Drug development: Lessons from nature. *Biomedical Reports*, 6(6): 612–614.

Matos, L.G., Santos, L. D. A. R., Vilela, C. F., Tresvenzol, L. M. F., Paula, J. R., & Costa, E. A. (2003). Atividades analgésica e/ou anti-inflamatória da fração aquosa do

extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13: 15-16.

Maydt, D., De Spirt, S., Muschelknautz, C., Stahl, W., & Müller, T. J. J. (2013). Chemical reactivity and biological activity of chalcones and other α,β -unsaturated carbonyl compounds. *Xenobiotica*, 43(8): 711-718.

Mazumdar, M., Giri, S., Giri, A. (2011). Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: analysis of micronucleus and chromosome aberrations in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721:147-52.

Mello, M. J. R., Leite, J. A. D., Vasconcellos, R. J. F., & Morais, H. H. A. (2013). Atividade anti-inflamatória, cicatrizante e antimicrobiana (myracrodruon urundeuva fr. All.), aplicado em fraturas do extrato aquoso de aroeira-do-sertão a 20% expostas induzidas em mandíbula de coelho. *Revista de cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial*, 13(10): 97-104.

Melo-reis, P. R., Andrade, L. S., Silva, C. B., Araújo, L. M. M., Pereira, M. S., Mrue, F., & Chen-Chen, L. (2010). Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax látex. *Brazilian Journal of Biology*, 70(1): 189-194.

Mendonça, R. J., Mauricio, V. B., Teixeira, L. B., Lachat, J. J., & Coutinho-Netto J. (2010). Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Phytotherapy Research*, 24(5): 764-768.

Milen, I. G. (2011). Contemporary approaches towards production of phytopharmaceuticals: Plant Biotechnology meets Medicinal Chemistry. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(10): 822-822(1).

Montanari, C., Bolzani A. V. (2011). Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, 24(1): 105-111.

Mortelmans, K., & Riccio, E. S. (2000). The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation Research*, 455(1-2): 61-9.

Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455(1-2): 29-60.

Mota, F. M., Carvalho, H. H. C., & Wiest, J. M. (2011). Atividade antibacteriana *in vitro* de inflorescências de *Achyrocline satureioides*(Lam.) DC. - Asteraceae ("macela", "marcela") sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(3): 298-304.

Muthu, S., Rajamani, T., Karabacak, M., & Asiri, A. M. (2014). Vibrational and UV spectra, first order hyperpolarizability, NBO and HOMO-LUMO analysis of 4-chloro-N-(2-methyl-2,3-dihydroindol-1-yl)-3-sulfamoyl-benzamide. *Spectrochimica Acta. Part A, molecular and biomolecular spectroscopy*, 122:1-14.

Muthukkaruppan, V. R., Kubai, L. & Auerbach. R. (1982). Tumor-induced neovascularization in the mouse eye. *Journal of the National Cancer Institute*, 69: 699–708.

Nassar, E., Abdel-Aziz, H. A., Ibrahim, H. S., & Mansour, A. M. (2011). Synthesis of Diarylpyrazoles Containing a Phenylsulphone or Carbonitrile Moiety and their Chalcones as Possible Anti-Inflammatory Agents. *Scientia Pharmaceutica*, 79(3): 507–524.

Ngaki M. N., Louie G. V., Philippe R. N., Manning G., Pojer F., & Bowman M. E. (2012). Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis. *Nature*, 485:530-U147.

Ngameni B., Touaibia M., & Patnam R. (2006). Inhibition of MMP-2 secretion from brain tumor cells suggests chemopreventive properties of a furanocoumarin glycoside and of chalcones isolated from the twigs of *Dorstenia turbinata*. *Phytochemistry*, 67: 2573-9.

Ngameni, B., Touaibia, M., & Belkaid, A. (2007). Inhibition of matrix metalloproteinase-2 secretion by chalcones from the twigs of *Dorstenia barteri* Bureau. *Arkivoc*, ix: 91-103.

Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3): 213–219.

Niu, G., & Chen, X. (2010). Vascular Endothelial Growth Factor as an Anti-angiogenic Target for Cancer Therapy. *Current Drug Targets*, 11(8): 1000–1017.

Nordlie, M. A., Wold, D. E., & Simkhovich, D. Z. (2006). Molecular Aspects of Ischemic Heart Disease: Ischemia/Reperfusion–Induced Genetic Changes and Potential Applications of Gene and RNA Interference Therapy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 11(1): 17-30.

Novick, A., & Szilard, L. Anti-mutagens. *Nature*, 170: 926-927.

Nowakowska, Z. (2007). A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42: 125-137.

Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 17(4): 779–804.

Oliveira, A. F., Batista, J. S., Paiva, E. S., Sllva, A. E., Farias, Y. J. M. D., Damasceno, C. A. R., Brito, P. D., Queiroz, S. A. C., Rodrigues, C. M. F., & Freitas, C. I. A. (2010). Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia férrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(3): 302-310.

Oliveira, M. N. (2013). Prospecção farmacológica de compostos sintéticos “alcalóides-like” para o tratamento de gliomas malignos. Dissertação [Mestrado Biotecnologia] – Universidade Estadual de Feria de Santana, Bahia.

Oliveira, R. J., Salles, M. J. S., da Silva, A. F., Kanno, T. Y. N., Lourenço, A. C. dos S., Leite, V. da S., & Mantovani, M. S. (2013). *In vivo* evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. *Genetics and Molecular Biology*, 36(3): 413–424.

Orlikova, B., Tasdemir, D., Golais, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2011). Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes & Nutrition*, 6(2): 125–147.

Ota, A., & Ulrich, N. P. (2017). An Overview of Herbal Products and Secondary Metabolites Used for Management of Type Two Diabetes. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 436.

Papoutsis, M., Tomarev, S. I., Eichmann, A., Prols, F., Christ, B., & Wilting, J. (2001). Endogenous origin of the lymphatics in the avian chorioallantoic membrane. *Developmental Dynamics*, 222(2): 238–251.

Parker, M. W., Xu, P., Guo, H. F., & Vander, K. C. W. (2012a). Mechanism of Selective VEGF-A Binding by Neuropilin-1 Reveals a Basis for Specific Ligand Inhibition. *PLoS One*, 7:e49177.

Parker, M. W., Xu, P., Li, X., & Vander-Kooi, C. W. (2012b). Structural basis for selective vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) binding to neuropilin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 287:11082–9.

Peitsids, P., & Agrawal, R., (2010). Role of vascular endothelial growth factor in women with PCO and PCOS: a systematic review. *Reproductive Biomedicine online*, 20(4): 444-452.

Pence, I., & Mahadevan-Jansen, A. (2016). Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 45(7): 1958–1979.

Penido, C., Conte, F. P., Chagas, M. S. S., Rodrigues, C. A. B., Pereira, J. F. G., Henriques, M. G. M. O. (2006). Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflammation Research*, 55(11): 457-64.

Perrot-Applanat, M., & Di Benedetto, M. (2012). Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: Adhesion, survival, migration and invasion. *Cell Adhesion & Migration*, 6(6), 547–553.

Peterson, T., & Müller, G. B. (2016). Phenotypic Novelty in Evo Devo: The Distinction Between Continuous and Discontinuous Variation and Its Importance in Evolutionary Theory. *Evolutionary Biology*, 43: 314–335.

Pinho, B. R., Ferreres, F., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2013). Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65: 1681-1700.

Porterfield, J. Z., & Zlotnick, A. (2010). A Simple and General Method for Determining the Protein and Nucleic Acid Content of Viruses by UV Absorbance. *Virology*, 407(2): 281–288.

Pourgholami, M. H., & Morris, D. L. (2008). Inhibitors of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cardiovascular & Hematological Agents Medicinal Chemistry*, 6: 343-347.

Quesada, A. R., Muñoz-Chápuli, R., & Medina, M. A. (2006). Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Medicinal Research Reviews*, 26: 483–530.

Quintin, J., Desrivot, J., Thoret, S., Le Menez, P., Cresteil, T., & Lewin, G. (2009). Synthesis and biological evaluation of a series of tangeretin-derived chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19:167–169.

Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. R., & Monteleone - Neto, R. (1991). Mutagênese, carcinogênese, teratogênese: critérios e métodos de avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 241 p.

Rabhi, C., Arcile, G., Cariel, L., Lenoir, C., Bignon, J., Wdzieczak-Bakala, J., & Ouazzani, J. (2015) Antiangiogenic-Like Properties of Fermented Extracts of Ayurvedic Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Food*, 18: 1065–1072.

Ramesha, B. T., Gertsch, J., Priti, V., Ganeshaiyah, K. N., & Uma, S. R. (2011). Biodiversity and Chemodiversity: Future perspectives in bioprospecting. *Current Drug Targets*, 12:1-16.

Ramkumar, V., Anandhi, S., & Kannana, P. (2013). Gopalakrishnan, R. Synthesis, Single Crystal Growth, Characterization and Comparison of Two New Enone Shifted Chalcones and Their NLO Behavior, *Cryst. Eng. Comm*, 15:2438–2449.

Rao, Y. K., Fang, S. H., & Tzeng, Y. M. (2004). Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. *Bioorg Med Chem*. 12:2679–2686.

Rao, Y. K., Fang, S. H., & Tzeng, Y. M. (2009). Synthesis and biological evaluation of 3',4',5'-trimethoxychalcone analogues as inhibitors of nitric oxide production and tumor cell proliferation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17:7909–7914.

Razmi, A., Zarghi, A., Arfaee, S., Naderi, N., & Faizi, M. (2013). Evaluation of Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Activities of Novel Chalcone Derivatives. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 12(Suppl), 153–159.

Manjunathan, R., & Ragunathan, M. (2015). Chicken chorioallantoic membrane as a reliable model to evaluate osteosarcoma—an experimental approach using SaOS2 cell line. *Biological Procedures Online*, 17, 10.

Ribatti, D., & Nico, B. (2016). Tumor angiogenesis. From bench to bedside. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 121(1): 12-19.

Ribeiro, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K. (2003). Mutagênese ambiental. Canoas: Ed. ULBRA, cap.7, pp.173-200.

Ross, B., Tran, T., Bhattacharya, P., Watterson, D.M., & Sailasuta, N. (2011). Application of NMR spectroscopy in medicinal chemistry and drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(1): 93-114.

Sankar, L., Arumugam, D., Boj, S., & Pradeep, P. (2017). Expression of Angiogenic Factors in Psoriasis Vulgaris. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 11(3): EC23–EC27.

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants'

Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 8(1): 1–10.

Saydam, G., Aydin, H. H., Sahin, F., Kucukoglu, O., Erciyas, E., Terzioglu, E., Buyukkececi, F., & Omay, S. B. (2003). Cytotoxic and inhibitory effects of 4,4'-dihydroxy chalcone (RVC-588) on proliferation of human leukemic HL-60 cells. *Leukemia Research*, 27:57–64.

Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31:9–15.

Schultz, T. (2009). Spectroscopic methods for biology and medicine.

Sears, D. A., & Udden, M.M. (2012). Howell-Jolly Bodies: A Brief Historical Review. *American Journal of the Medical Sciences*, 343 (5): 407 - 409.

Shah, A., Khan, A. M., Qureshi, R., Ansari, F. L., Nazar, M. F., & Shah, S. S. (2008). Redox Behavior of Anticancer Chalcone on a Glassy Carbon Electrode and Evaluation of its Interaction Parameters with DNA. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(8): 1424–1434.

Shaker, M., Pascarelli, K. M., Plantinga, M. J., Love, M. A., Lazar, A. J., Ingram, D. R., & Broccoli, D. (2014). Differential Expression of Cysteine Dioxygenase 1 in Complex Karyotype Liposarcomas. *Biomarkers in Cancer*, 6: 1–10.

Shapiro, F. (1992). Vertebral development of the chick embryo during days 3-19 of incubation. *Journal of Morphology*, 213(3): 317-33.

Silva, C. R., Borges, F. F. V., Bernardes, A., Perez, C. N., Silva, D. de M., & Chen-Chen, L. (2015). Genotoxic, Cytotoxic, Antigenotoxic, and Anticytotoxic Effects of Sulfonamide Chalcone Using the Ames Test and the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test. *PLoS ONE*, 10(9), e0137063.

Silva, G., Marins, M. A., Fachin, A. L., Seong-Ho, L., Baek, S. J. (2016). Anti-Cancer Activity of trans-Chalcone in Osteosarcoma: Involvement of Sp1 and P53. *Molecular Carcinogenesis*, 55: 1438–1448.

- Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., & Waszkielewicz, A. M. (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics*, 55(2): 273–285.
- Sousa, T. C. de., Maia-Filho, A. L. M., de Araújo, K. S., Lopes, L. da S., Silva, H. R., Rodrigues, J. S., & da Costa, C. L. S. (2014). Anti-inflammatory Effect of Pequi Oil (*Caryocar brasiliense*) in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal of Medical Biomedical & Applied Science*, 1(1).
- Sreekantaiah, C., Davis, J. R., & Sandberg, A. A. (1993). Chromosomal abnormalities in leiomyosarcomas. *The American Journal of Pathology*, 142(1): 293–305.
- Stare, S. M., & Jozefowicz, J. J. (2008). The Effects of Environmental Factors on Cancer Prevalence Rates and Specific Cancer Mortality Rates in a Sample of OECD Developed Countries. *Internacional Journal of Applied Economics*, 5: 92-115.
- Steege, H. T., Vaessen, R., Cárdenas-López, D., Sabatier, D., Antonelli, A., Oliveira, S. M., Pitman, N. C. A., Jorgensen, P. M., & Salomão R. P. (2016). The discovery of the Amazonian tree flora with an updated checklist of all known tree taxa. *Scientific Reports*, 6, A29549.
- Su, J.L., Yen, C.J. & Chen, O.S. (2007). The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *British Journal of Cancer*, 96(4): 541-5.
- Szikriszt, B., Póti, Á., Pipek, O., Krzystanek, M., Kanu, N., Molnár, J., & Szüts, D. (2016). A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. *Genome Biology*, 17, 99.
- Tejs, S. (2008). The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*, 4 (1): 7-14
- Terradas, M., Martin, M., Tusell, L., & Genesca, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research*, 705: 60–67.

Thomson, C. A., McCullough, M. L., Wertheim, B. C., Chlebowski, R. T., Martinez, M. E., Stefanick, M. L., & Neuhouser, M. L. (2014). Nutrition and Physical Activity Cancer Prevention Guidelines, Cancer Risk, and Mortality in the Women's Health Initiative. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 7(1): 42–53.

Tomasi, J., Mennucci, B., & Cancès, E. (1999). *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 464: 211- 26.

Tomida, C., Yamagishi, N., Aibara, K., Yano, C., Uchida, T., Abe, T., Ohno, A., Kirasaka, K., Nikawa, T., & Teshima-Kondo, S. (2015). Chronic exposure of VEGF inhibitors promotes the malignant phenotype of colorectal cancer cells. *The Journal of Medical Investigation*, 62 (1.2): 75-79.

Toscan, C. M. Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.

Turolla, M. S. R., & Nascimento, E. de S. (2006). Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(2): 289-306.

Ucuzian, A. A., Gassman, A. A., East, A. T., & Greisler, H. P. (2010). Molecular Mediators of Angiogenesis. *Journal of Burn Care & Research : Official Publication of the American Burn Association*, 31(1), 158.

Umbuzeiro, G. A., & Vargas, V. M. F. (2003). Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., & Marques, E. K. Mutagênese ambiental. Canoas: Ed. ULBRA, 356p.

Valiatti, F. B., Crispim, D., Benfica, C., Valiatti, B. B., Kramer, C. K., & Canani, L. H. (2011). The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis and diabetic retinopathy. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 55(2): 106-113.

Valli, M., Pivatto, M., Danuello, A., Castro-Gamboa, I., Silva, D. H. S., Cavalheiro, A. J., Araújo, A. R., Furlan, M., Lopes, M. N., & Bolzani, V. S. Tropical biodiversity: has

it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? *Química Nova*, 35(11): 2278-2287.

Vanlandingham, P. A., Nuno, D. J., Quiambao, A. B., Phelps, E., Wassel, R. A., Ma, J.-X. & Farjo, R. A. (2017). Inhibition of Stat3 by a Small Molecule Inhibitor Slows Vision Loss in a Rat Model of Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(4): 2095–2105.

Varinska, L., Wijhe, M., Belleri, M., Mitola, S., Perjesi, P., Presta, M., Koolwijk, P., Ivanova, L., & Moizis, L.(2012). Anti-angiogenic activity of the flavonoid precursor 4-hydroxychalcone. *European Journal of Pharmacology*, 691(1-3): 125–33.

Vasconcelos, A., Campos, V. F., Nedel, F., Seixas, F. K., Dellagostin, O. A., Smith, K. R., de Pereira, C. M. P., Stefanello, F. M., Collares, T., & Barschak, A. G. (2013). Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl thiophene on human colon adenocarcinoma cells. *Cell Biochemical & Function*, 31(4): 289-297.

Veeresham, C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3(4): 200–201.

Veigas-Junior, V. F. (2008). Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2): 308-313.

Viegas – Junior, C. (2003). Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26(3): 390-400.

Virrey, J. J., Dong, D., Stiles, C., Patterson, J. B., Pen, L., NI, M., Schonthal, A. H., Chen, T. C., Hofman, F. M., & Lee, A. S. (2008). Stress Chaperone GRP78/BiP Confers Chemoresistance to Tumor-Associated Endothelial Cells. *Molecular Cancer Research*, 6(8): 1268- 1275.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6127): 1546–1558.

Von-Borstel, R. C. & Higgins, J. A. (1998). Janus carcinogens and mutagens. *Mutation Research*, 402: 321–329

Wanami, L. S., Chen, H. Y., Peiró, S., García de Herreros, A., & Bachelder, R. E. (2008). Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: implications for tumor progression. *Experimental Cell Research*, 314:2448–53.

White, M. C., Peipins, L. A., Watson, M., Trivers, K. F., Holman, D. M., & Rodriguez, J. L. (2013). Cancer Prevention for the Next Generation. *The Journal of Adolescent Health : Official Publication of the Society for Adolescent Medicine*, 52(5 0): S1–S7.

Wilky, B. A., Jones, R. L., & Keedy, V. L. (2017). The current landscape of early drug development for patients with Sarcoma. *American Society of Clinical Oncology education book*, 37:807-810.

Wutzler, P., Sauerbrei, A., Hartl, A., & Reimer, K. (2003). Comparative testing of liposomal and aqueous formulations of povidone-iodine for their angiourritative potential at the chorioallantoic membrane of ex ovo cultivated chick embryos. *Dermatology*, 207(1): 43–47.

Yang, P.W., Hsu, I.J., Wang, Y.C., Hsieh, C.Y., Shih, K.H., Wong, L. F., Shih, N.Y., Hsieh, M.S., Hou, M.T.K., & Lee, J. M. (2016). Visible-absorption spectroscopy as a biomarker to predict treatment response and prognosis of surgically resected esophageal cancer. *Scientific Reports*, 6, 33414.

Yang, X., Wang, W., Tan, J., Song, D., Li, M., Liu, D., Jing, Y., & Zhao, L. (2009). Synthesis of a series of novel dihydroartemisinin derivatives containing a substituted chalcone with greater cytotoxic effects in leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19: 4385–4388.

Yao, L., Liu, F., Hong, L., Sun, L., Liang, S., Wu, K., & Fan, D. (2011). The function and mechanism of COX-2 in angiogenesis of gastric cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 30(1), 13

Zhao, Y., & Adjei, A. A. (2015). Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *The Oncologist*, 20(6), 660–673.

Zanoni, T. B. Investigação das rotas de biotransformação do grupo cromóforo e avaliação toxicológica parcial dos corantes dispersos Sudam III e disperso amarelo 9. Ribeirão Preto. Dissertação [Mestrado Toxicologia] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo; 2010.

Zihlif, M., Afifi, F., Abu-Dahab, R., Abdul Majid, A. M. S., Somrain, H., Saleh, M. M., & Naffa, R. (2013). The antiangiogenic activities of ethanolic crude extracts of four *Salvia* species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(358): 1-10.

Zong, L., & Chen, P. (2014). Prognostic value of KIT/PDGFR mutations in gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, 12(71): 1-8.

Zuanazzi, J. A. S. (2002). Flavonóides. In: Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gormann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS; p.577-614.

6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

6.1. Manuscrito 1

Optical properties of a chalcone derivate and its antangiogenic activity in an *in vivo* system using the sarcoma 180 cell line

Susy Ricardo Lemes^{1*}, Luizmar Adriano Júnior², Diego da Silva Manoel³, Maria Alice Montes de Sousa⁴, Ruben Dario Fonseca^{3,5}, Rosa Silva Lima⁶, Caridad Noda-Perez⁶, Paulo Roberto de Melo Reis⁴, Clever Gomes Cardoso⁷, Elisângela de Paula Silveira-Lacerda⁸, Marcio Adriano Rodrigues Souza², Cleber Renato Mendonça³, Pablo José Gonçalves^{2,6}, Leonardo de Boni³, Tertius Lima da Fonseca², Nelson Jorge da Silva Junior⁴

¹ Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás, Campus-II, ICB IV, 74001- 970, Goiânia, GO, Brasil.

²Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Campus-II, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil.

³Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

⁴Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 74605-010, Goiânia, Goiás, Brasil.

⁵Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de la Costa, 58 N° 55-66 080002, Barranquilla, Atlantico, Colombia

⁶Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus-II, 74001970, Goiânia, Goiás, Brazil.

⁷Departamento de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás Campus-II, 74690-900, Goiânia, Goiás, Brasil.

⁸Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus-II, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil.

* Corresponding author. Phone: +55 62 3110-0951; E-mail: susynzr@gmail.com

Publicado no periódico Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy (Fator de impacto 3.88).

Abstract

Chalcones and their derivatives exhibit numerous pharmacological activities such as antibacterial, antifungal, cytotoxic, antinociceptive and anti-inflammatory. Recently, they have been assessed aiming for novel application in nonlinear optics and in the treatment of immune diseases and cancers. In this study, we investigate the optical properties of synthetic chalcona 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one (CAB7 β) and its antiangiogenic potential using the chorioallantoic membrane (CAM) with the S180 sarcoma cell line. Experimental and theoretical results show intense absorption in the UVA-UVC region, which is associated with a $\pi \rightarrow \pi^*$ transition with intramolecular charge transfer from the trimethyl-cyclohexen-1-yl ring to the chlorophenyl ring. Quantum chemical calculations of the first hyperpolarizability, accounting for both solvent and frequency dispersion effects, are in very good concordance with hyper-Rayleigh scattering measurements. In addition, two-photon absorption allowed band centered at 650 nm was observed. Concerning antiangiogenic activity, CAB7 β causes a significant reduction in the total number, junctions, length and caliber of blood vessels stimulated by S180 cells reducing the presence of blood vessels, inflammatory cells and others elements related to angiogenic process. It is found that CAB7 β is a versatile compound and a promising candidate for linear and nonlinear optical applications, in therapy against sarcoma and phototherapy.

Keywords: Antiangiogenic activity, Chalcona, Optical properties, Sarcoma

1. Introduction

Chalcones are organic molecules widely found in plants and precursors of flavonoid biosynthesis. They correspond chemically to α,β -unsaturated ketones with an ideal structure for the synthesis and planning of new drugs [1,2]. It is well known that chalcones and their derivatives exhibit numerous pharmacological activities, such as antibacterial, antifungal, cytotoxic, antinociceptive and anti-inflammatory [3-6]. However, in recent years, these compounds have been assessed for novel application in the treatment of immune diseases and cancers [7,8].

On the other hand, chalcones show good crystallizability and may exhibit intense absorption in the UV and/or visible spectral region and high optical nonlinearities with ultrafast response, including two-photon absorption [9-12]. In addition, these molecules allow easy structural manipulation by binding different substituents to the aromatic rings, meaning their pharmacological and optical/photophysical properties can be adjusted [9-11]. In particular, the inclusion of electron donor and acceptor groups at the sites of these molecules is an effective procedure for obtaining large nonlinear properties [10].

In recent years, chalcones and derivatives have been employed in oncology as molecular targeted approaches for cancer prevention and are considered promising antiangiogenic agents [11-14]. Anti-cancer activity has been attributed to inhibitory potential against several targets, such as multidrug resistance pathways, hormones, proteins, and cell proliferation, among others [15,16]. Tumor growth and metastasis depend on an important process called angiogenesis, namely, the growth of blood vessels from a pre-existent vasculature [17]. In antiangiogenic therapy, the blood supply for cancer cells would be cut off, thereby depriving the tumor of nutrients and impeding its growth [18-20].

One of the most widely used animal models for analyzing the angiogenic process is the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay [17]. Moreover, the CAM is highly sensitive and commonly used in tumor cell grafts, drug toxicity testing and for its angiogenic or antiangiogenic potential, among others [21-24]. Some reports suggest that human tumor cells or tissues implanted in the chorioallantoic membrane (CAM) can induce angiogenesis. This potential is being used to develop antiangiogenic agents to

provide better therapy and prevent tumor progression [25,26]. Osteosarcoma cells, for example, can induce vascularization and tumor growth in the CAM, interposed with the capillaries present in this membrane to induce angiogenesis [27,28].

Lima et al [2] recently synthesized a new class of chalcones by applying the Claisen–Schmidt condensation reaction, using α - or β - ionone with substituted benzaldehydes. The 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one chalcone (CAB7 β) exhibited cytotoxic activity against cancer cell lines (SF-295, HCT-116 and OVCAR-8). Given their alleged optical properties, this has stimulated interest in testing these compounds in cancer therapy.

In the present article, we investigated the linear and nonlinear optical properties of synthetic chalcone (CAB7 β) and its antiangiogenic potential, using the chorioallantoic membrane (CAM) with the cell line to induce angiogenesis. Therefore it was verified first molecular hyperpolarizability and two-photon absorption (2PA) were characterized using UV-vis absorption, hyper-Rayleigh scattering (HRS) and Z-Scan techniques respectively. In addition, quantum calculations applying second-order Møller–Plesset perturbation theory (MP2) and Density Functional Theory (DFT) methods were used to broaden the understanding of the linear and nonlinear optical (NLO) properties of this molecule. The antiangiogenic potential of the chalcone was assessed using the chorioallantoic membranes (CAMs) assay using tumor cells S180 to induce angiogenesis. We also conducted an analysis of the histological parameters of the CAMs obtained.

2. Material and methods

2.1 Chalcone synthesis

The chalcone 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one (CAB7 β) was synthesized at the Synthesis and Crystallographic Studies Laboratory of the Institute of Chemistry at the Federal University of Goiás and are described in [2]. The ketone was synthesized and then condensed to *p*-chlorobenzaldehyde via the Claisen Schmidt reaction to obtain CAB7 β -ionone.

Methanol, β -ionone and *p*-chlorobenzaldehyde were used as reagents, with 99% purity. Sodium hydroxide (85% pure) was used as a catalyst, with acetone and isopropyl alcohol as solvents.

Methanol (15 mL), sodium hydroxide (3.0 mmol) and 0.3 mL of distilled water were placed in a sterile reactor flask (50 mL), added with 1.5 mmol of β -ionone. After 5 minutes, 2.5 mmol of *p*-chlorobenzaldehyde was added and the reaction was maintained under magnetic stirring at room temperature (Figure 1).

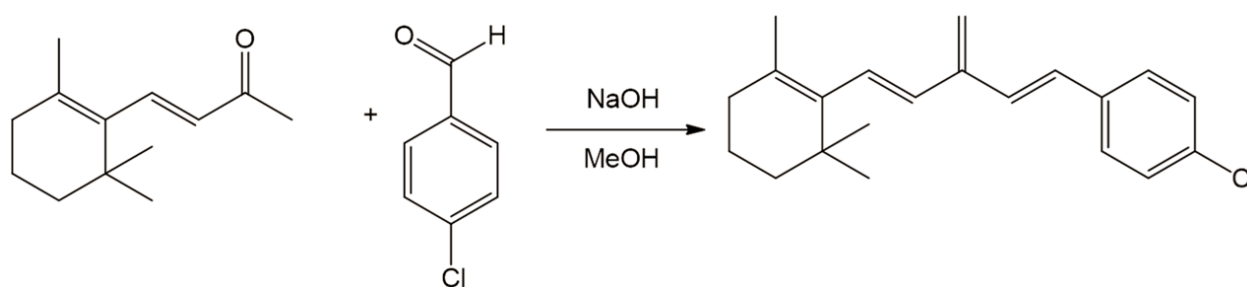


Figure 1. Diagram depicting the synthesis of 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one. The compound was previously synthesized and presented.

The total reaction time was 1 h and 30 min. Next, the precipitate was removed from the reactor flask and filtered into a beaker through a sterile funnel lined with filter paper. After filtering, the precipitate was washed with distilled water, dried on filter paper, solubilized with isopropyl alcohol and then left to rest for 15 days, until the solvents had completely evaporated. Next, the CAB7 β crystals were removed and placed into Eppendorf tubes for optical and photophysical characterization and for use in the angiogenesis assay.

2.2 Linear absorption

The CAB7 β sample was initially assessed by UV/vis spectroscopy. It was weighed and then diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) P.A. The molar absorption coefficient was obtained by analyzing the absorption spectra for different concentrations of the sample [29]. Absorption spectra were obtained in a Hitachi U-2900 UV-Vis

spectrophotometer at room temperature ($\sim 27^\circ\text{C}$), using a 2.0 mm \times 10 mm quartz cuvette.

2.3 Hyper Rayleigh Scattering Technique (HRS)

In order to measure the first order hyperpolarizability (β_{HRS}) of the Chalcone (CAB7 β) dissolved in DMSO, we used concentration ranged from 10^{18} up to 10^{19} molecules/cm³. An extension of the conventional HRS technique involving picosecond pulses was used to obtain β_{HRS} [29]. Briefly, in this experimental technique, a Q-switched and modelocked Nd:YAG laser, which delivered pulse of 100 ps at 1064 nm, was employed as the excitation source. The laser beam is focused at the middle point of a 1cm fused silica cuvette. The HRS signal emitted by the sample is collected perpendicularly to the pump beam direction by a photomultiplier tube (PMT, Hamamatsu H5783p). Between the sample and the PMT a telescope was mounted in order to achieve high solid angle. The excitation intensity was measured in real time with a fast ($\sim 1\text{ns}$ rise time) silicon detector and used as reference intensity channel. Computer software controls the acquisition system with a homemade LabView interface. More details about our experimental apparatus can be found elsewhere [29,30].

2.4 Z-scan technique

With the Z-Scan technique, the nonlinear optical effect induced in the sample is obtained by analyzing changes in optical transmittance due to an intense laser beam. In order to measure it, the sample is translated symmetrically to the focal region of a focused laser beam. Optical transmittance is recorded for each position of the sample in relation to the focal point and normalized by the transmittance at the far field (furthest from the focal point). As a result, a typical normalized transmittance curve, $T(z)$ is obtained as a function of the z position and is described by the following equation [31].

$$T(z) = \frac{1}{\sqrt{\pi}q_0(z,0)} \int_{-\infty}^{+\infty} \ln[1 + q_0(z,0)e^{-\tau^2}] d\tau \quad (1)$$

in which, $q_0(z, 0) = \beta I_0 L (1 + z^2/z_0^2)^{-1}$. In this equation β is the nonlinear absorption coefficient, which is related to the TPA process in the present case; I_0 is the intensity of the laser pulse at the focal point; L the sample optical path; and z_0 the Rayleigh length associated with the beam and lens parameters.

The highest intensity is achieved at the lens focal plane, in which the nonlinear optical effect (two-photon absorption) has the highest magnitude. As such, for a two-photon absorption process, the light field creates intensity-dependent absorption $\alpha = \alpha_0 + \beta I_0$, in which α_0 is the linear absorption coefficient (zero for the sample described here). β is obtained by fitting Z-scan data with Eq. (1). Thus, the experimental TPA cross section (σ^{TPA}) is obtained with $\sigma^{TPA} = (h\nu/N) \beta$, in which N is the number of molecules per cm^3 . The 2PA cross-section was expressed in Göppert-Mayer (GM) units ($1 \text{ GM} = 1 \times 10^{-50} \text{cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$). Further details about the Z-scan technique can be found elsewhere [30,32].

In the present study, the two-photon absorption (2PA) spectrum was measured by building several open aperture Z-scan curves for distinct laser wavelengths using an optical parametric amplifier (OPA) (Quantronix, model TOPAS), which allowed us to tune the light source from 480 nm to 790 nm. The pulse width of our OPA in the wavelength range is about 120 fs. Our OPA is pumped by 150-fs laser pulses (775nm) with a 1kHz repetition rate delivered by a Ti:Sapphire chirped pulse amplified system (1kHz MxR-CLARK). To ensure a Gaussian spatial profile for the laser beam used, spatial filtering is performed before the Z-scan setup. On the Z-scan line, the beam was focused by a 15-cm-focal-length converging lens. The sample was placed on a motorized translation stage and its position varied along the focused beam. The light intensity transmitted through the sample was monitored at different sample positions by a Silicon photodetector, amplified by a Locking amplifier and recorded with a microcomputer. The experiment was conducted using a homemade LabView program.

2.5 Computational Procedure

Geometry optimization calculations of the chalcone were performed in gas-phase and in DMSO solution with the B3LYP functional. The solvent effects were included

using the polarizable continuum model within integral equation formalism (IEFPCM) [33], where the solvent is treated as a continuous medium characterized by its dielectric constant (DMSO: $\epsilon = 46.83$) [34]. Theoretical results for the UV-Vis absorption spectra of CAB7 β were obtained using time-dependent density functional theory (TDDFT) [30] with the CAM-B3LYP functional. Static and dynamic first hyperpolarizabilities were calculated analytically using the coupled perturbed Hartree–Fock (CPHF) procedure. At the MP2 level, the calculations of the static properties were performed numerically through the finite field (FF) method using field strengths of the order of 0.001 a.u. For comparison, we have performed extra calculations using the standard B3LYP and a long-range corrected CAM-B3LYP functionals. To estimate the correlated dynamic results at the MP2 and DFT levels we have employed the multiplicative correction scheme used in the literature [35]. The cc-pVTZ basis set has been adopted in all quantum chemical calculations, that were performed using the Gaussian 09 electronic structure program [36].

2.6 S180 cells

The sarcoma 180 (S180) cells used here were supplied by the Laboratory of Molecular Genetics and Cytogenetics of the Federal University of Goiás. The cells were initially maintained inside 6 to 8-week-old Swiss mice, weighing between 30 and 40 grams, provided by the University's vivarium, via successive intraperitoneal injections of 2×10^6 cells adjusted for a final volume of 0.2 mL. After 7 days of tumor cell inoculation, the ascetic fluid was aspirated and the cells were washed in phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes. Next, the cells were suspended in RPMI medium (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of penicillin and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of streptomycin, and quantified using 1% Trypan Blue solution (m/v) (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO) in a Neubauer chamber. The viability of the cells used for this study was $\geq 90\%$ [27, 37,38].

2.7 Angiogenesis assay in the chick chorioallantoic membrane (CAM)

We used 120 fertile Ross broiler chicken (*Gallus domesticus*) eggs purchased from the São Domingos farm, located at Km 9 on the road to Bela Vista in Vale dos Pampas, Aparecida de Goiânia, Goiás state (GO), Brazil. The eggs were incubated in an automatic oven at 38°C, in a humid environment (65%) and turned every 15 minutes for the first five days. On the fifth day, a circular hole (1.0 cm wide) was made in the shells using a small drill to expose the CAM and the eggs were returned to the incubator. On the 13th day of incubation, the eggs were divided into eight groups of 15 eggs: Neutral control: distilled water solution – H₂O; 2) Carrier substance: solvent used to dilute CAB7β - DMSO; 3) Angiogenesis inhibitor control: dexamethasone solution - DE (4mg/mL); 4) Angiogenesis inducer control: Regederm® - RE; 5) Highest CAB7β dose (50 µg/µL); 6) S180 cells at 6 × 10⁵ per CAM; 7) Co-treatment with 25 µg/µL of CAB7β and S180 cells – C.25 + S180 (6 × 10⁵); 8) Co-treatment with 50 µg/µL of CAB7β and S180 cells - C.25 + S180 (6 × 10⁵) [39,40]. A total volume of 20 µL of the treatments was placed directly over the CAMs and the angiogenic response was assessed after 72 hours. Next, the CAMs were fixed in formaldehyde for 5 minutes, then cut, removed and kept in Petri dishes to analyze and quantify the vascular network formed [40]. The CAMs were photographed under standardized conditions with a 2.0 megapixel USB digital microscope adapted to a magnifying glass. The images were captured in AMCAP software (version 9.016) on a DELL laptop. The parameters (number of complexes, vessel size and number of junctions) were quantified using Angioquant Toolbox software, MATLAB 6.5, which provides measurements in pixels [41].

2.8 Histological Analysis of CAMs

The CAMs were fixed in 70% alcohol for 24 hours and then inserted in paraffin blocks. Next, 5 µm histological sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), according to the classic standardized technique. The slides of the histological sections were analyzed in an optical microscope [42].

The following parameters were assessed: integrity of the choroidal and allantois layers, presence of inflammatory elements, neovascularization (angiogenesis), presence

of fibroblasts, red blood cells and pyknosis. The results were visually classified according to intensity and the data were converted into quantitative variables by attributing the following scores: absent (0), slight (1), moderate (2) and intense (3).

2.9 Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were used to assess the antiangiogenic activity of CAB7 β alone or in conjunction with S180 cells, and to analyze the parameters investigated in the histological test of CAMs. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1 Theoretical molecular structure

The B3LYP/cc-pVTZ results for bond length, bond and dihedral angles obtained in the gas-phase and DMSO solution are depicted in Table 1. Figure 2 shows the minimum energy geometry obtained in the presence of DMSO

Table 1. B3LYP/cc-pVTZ results for the geometric parameters of the chalcone molecule in gas-phase and in DMSO solution. $BLA_{6-7=8-9}=(d_{C6-C7} + d_{C8-C9} - 2.d_{C7=C8})/2$ and $BLA_{9-10=11-12}=(d_{C9-C10} + d_{C11-C12} - 2.d_{C10=C11})/2$

	Gas-phase	DMSO	Δ
	Bond length (Å)		
C1–C2	1.542	1.542	0.000
C1–C6	1.546	1.547	0.001
C1–C18	1.544	1.544	0.000
C1–C19	1.543	1.543	0.000
C2–C3	1.521	1.521	0.000
C3–C4	1.522	1.522	0.000
C4–C5	1.509	1.508	-0.001
C5=C6	1.352	1.354	0.002
C5–C20	1.506	1.505	-0.001
C6–C7	1.465	1.462	-0.003
C7=C8	1.342	1.345	0.003
C8–C9	1.481	1.475	-0.006
C9–C10	1.484	1.478	-0.006

C9—O22	1.224	1.234	0.010
C10=C11	1.340	1.343	0.003
C11—C12	1.457	1.457	0.000
C15—Cl21	1.749	1.756	0.007

Angle (°)

A(C18—C1—C19)	108.4	108.4	0.0
A(C5=C6—C7=C8)	-42.3	-41.1	1.2
A(C6—C1—C2—C3)	42.3	42.2	-0.1
A(C1—C2—C3—C4)	-61.3	-61.5	-0.2
A(C2—C3—C4—C5)	46.0	46.3	0.3
A(C3—C4—C5=C6)	-14.6	-14.5	0.1
A(C4—C5=C6—C1)	-4.6	-5.2	-0.6
A(C5—C6—C1—C2)	-9.2	-8.7	0.5
A(C7=C8—C9—C10)	178.5	176.5	-2.0
A(C8—C9—C10=C11)	179.2	178.0	-1.2
A(C1—C6—C7=C8)	138.3	139.8	1.5
A(C10=C11—C12—C13)	-0.4	-0.7	-0.3
A(C10=C11—C12—C17)	179.5	179.1	-0.4
A(C9—C10=C11—C12)	-179.6	-179.6	0.0

BLA (Å)

BLA ₆₋₇₌₈₋₉	0.131	0.124	-0.007
BLA ₉₋₁₀₌₁₁₋₁₂	0.131	0.125	-0.006

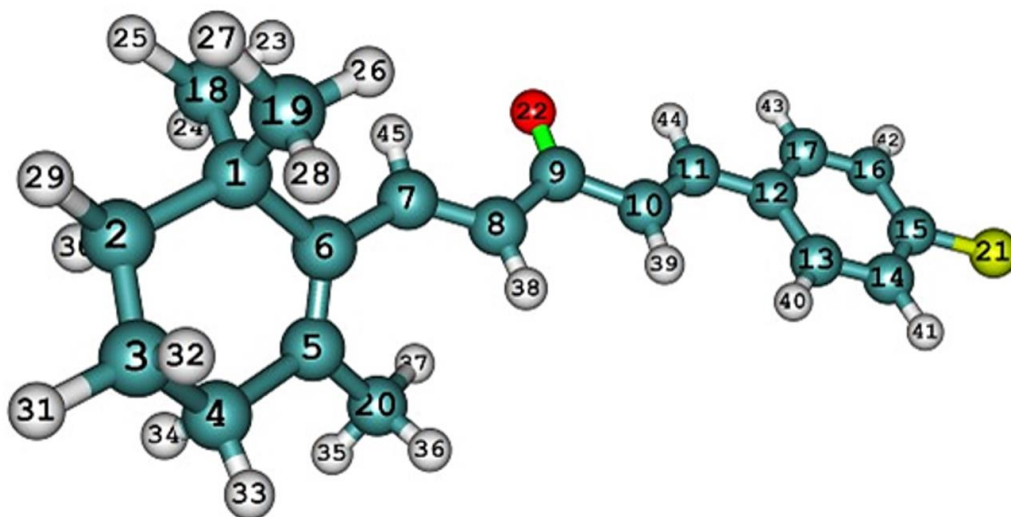


Figure 2. Molecular geometry of the chalcone obtained in energy minimization calculations at DFT-B3LYP/cc-pVTZ level in the presence of DMSO.

In general, the effects of the solvent cause slight changes in the geometric parameters. The 1,4-pentadien-3-one bridge (C7=C8–C9(O22)–C10=C11) is coplanar with the chlorophenyl ring. However, the value of dihedral angle C5=C6–C7=C8 shows that the chalcone geometry is non-planar in the gas-phase (42.3°) and in DMSO solution (41.1°). The most pronounced variations in bond length are observed in the bonds between the carbons of the 1,4-pentadien-3-one (0.006Å) bridge, the C9=O22 bond (0.010Å) and the C15–Cl21 bond (0.007Å). The bond length alternation (BLA) in the bridge between the two rings, estimated as $BLA(d_{C6-C7} + d_{C8-C9} - 2 \cdot d_{C7=C8})/2$, is about 0.131Å in the gas-phase and 0.124Å in DMSO. The decrease in the BLA parameter in solution indicates an increase in the degree of electron delocalization, which, in turn, affects solvatochromic displacement to the lowest energy absorption band of the chalcone, demonstrating the important role played by the BLA.

3.2 Linear absorption

Figure 3 shows the UV/vis absorption spectra of the sample at different concentrations. It can be observed that their absorption is in the ultraviolet (UVA) region, between 250 and 400 nm, with the presence of an intense, well-defined peak centered at 328 nm. The molar absorption coefficient (ϵ) was determined by evaluating sample absorbance (at 328 nm) as a function of concentration (6 to 200 μ M), from which a value of $\epsilon = 2.32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was obtained.

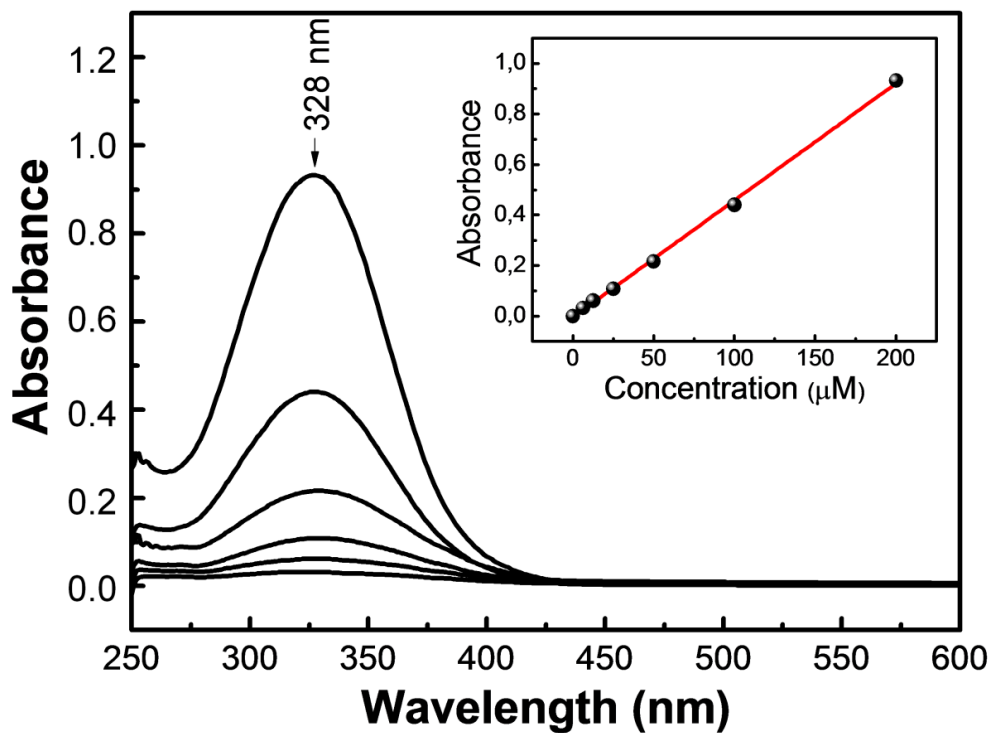


Figure 3. UV/Vis absorption spectra as a function of chalcone concentration. The inner box shows the absorbance values at 328 nm as a function of concentration.

For the chalcone absorption band, the TD-CAM-B3LYP results show a higher intensity band ($\lambda = 334$ nm) in the UVA region of the electromagnetic spectrum, as shown in Figure 4. This lowest energy absorption band is associated with a $\pi \rightarrow \pi^*$ transition between the highest occupied molecular orbital (HOMO, H) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO, L) (Figure 5).

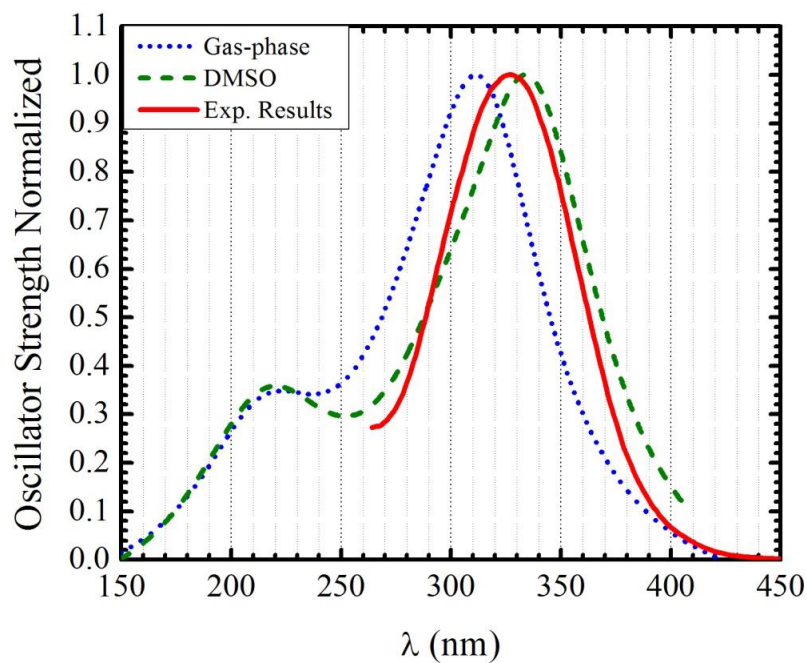


Figure 4. Experimental (in DMSO solution) and theoretical (in the gas-phase and DMSO solution) results obtained at TD-CAM-B3LYP/cc-pVTZ level for the absorption spectrum of CAB7 β .

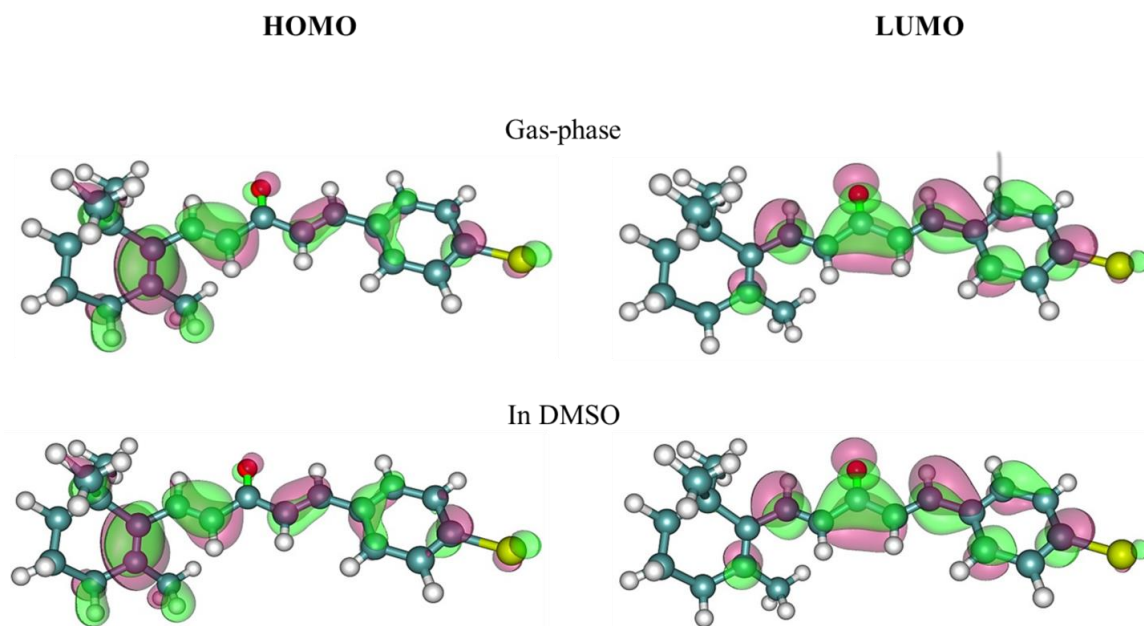


Figure 5. HOMO and LUMO orbitals of the CAB7 β molecule obtained at DFT-CAM-B3LYP/cc-pVTZ level.

The H→L excitation is characterized by intramolecular charge transfer from the trimethyl-cyclohexen-1-yl ring to the chlorophenyl ring. The maximum absorption peak obtained in DMSO solution exhibits excellent agreement with the experimental result ($\lambda = 328$ nm), with a deviation of 6 nm (Figure 4). The calculations show an additional band centered at $\lambda = 220$ nm, indicating the possibility of optical activity in the UVC region of the electromagnetic spectrum. The dominant excitation in this higher energy absorption band is H→L+1 and the solvatochromic displacement observed is negligible. One of the main characteristics of sunscreen molecules is related to the molar absorption coefficient in the UVA region. An organic compound with a molar absorption coefficient ϵ value larger than $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ can be considered a good candidate for sunscreen applications [43]. Thus, the linear absorption coefficient observed by CAB7 β in the UVA region ($\epsilon = 2.32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, at 328 nm) suggests its potential use in sunscreens.

It is illustrative to analyze how the environment might affect the charge distribution of the functional groups, where solvent effects are more pronounced. Figure 6 shows a comparison between partial atomic charges obtained at the CAM-B3LYP/6-311+G(2d) level in gas-phase and in DMSO by fitting an electrostatic potential in a grid-based method (CHELPG) [24]. One can see that, in solution, there is an accumulation of charge on oxygen and sulfur atoms, indicating that specific solvent–solute interactions enhance the acceptor character of these functional groups. As such, the dipole moment changes with the solvent effect, increasing from 1.31 a.u. (gas-phase) to 1.93 a.u. (DMSO), approximately 47%.

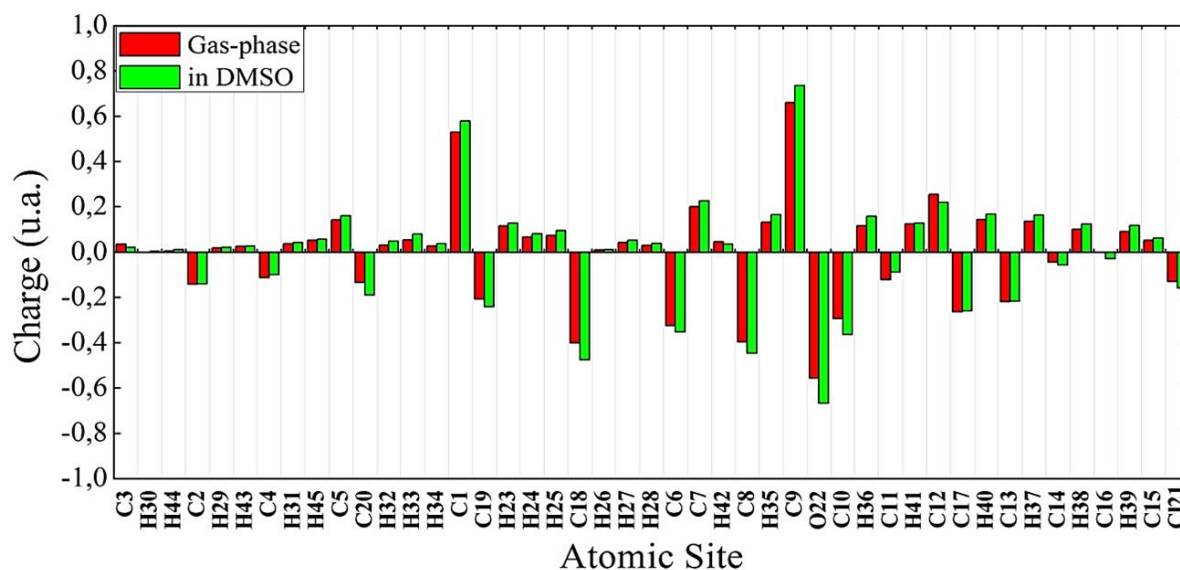


Figure 6. DFT-CAM-B3LYP/6-311+G(2d) results of atomic charges obtained using the CHELPG method.

3.3 First-order hyperpolarizability

Figures 7(a) and 7(b) show typical experimental Hyper-Rayleigh scattering signals, respectively, for p-Nitroaniline (pNA “reference sample”) and CAB7 β molecules dissolved in DMSO. The HRS signal scattered by the sample and reference shows a typical parabolic dependence with the excitation intensity. The insets of Figure 7(a) and 7(b) depicts the linearization intensity of the first-hyperpolarizability signal $I(2\omega)/I^2(\omega)$ as a function of the sample concentration ($I(2\omega)$ is the intensity from the scattered beam at 2ω and $I(\omega)$ corresponds to the intensity of excitation beam). The linear behavior as a function of the concentration is expected for the first-order hyperpolarizability. From the ratio between the slopes of the two curves (inset of 7(a) and 7(b)), $\beta_{\text{CAB7}\beta}$ can be calculated comparing with the pNA well-known β . pNA dissolved in DMSO presents a $\beta_{\text{PNA}} = 26.2 \times 10^{-30} \text{ cm}^5/\text{esu}$ at 1064 nm [44,45]. Consequently, the value for the first-order hyperpolarizability of CAB7 β is $\beta_{\text{CAB7}\beta} = 23.1 \times 10^{-30} \text{ cm}^5/\text{esu}$. This value is of the same order compared with unsubstituted chalcone previous studies [12].

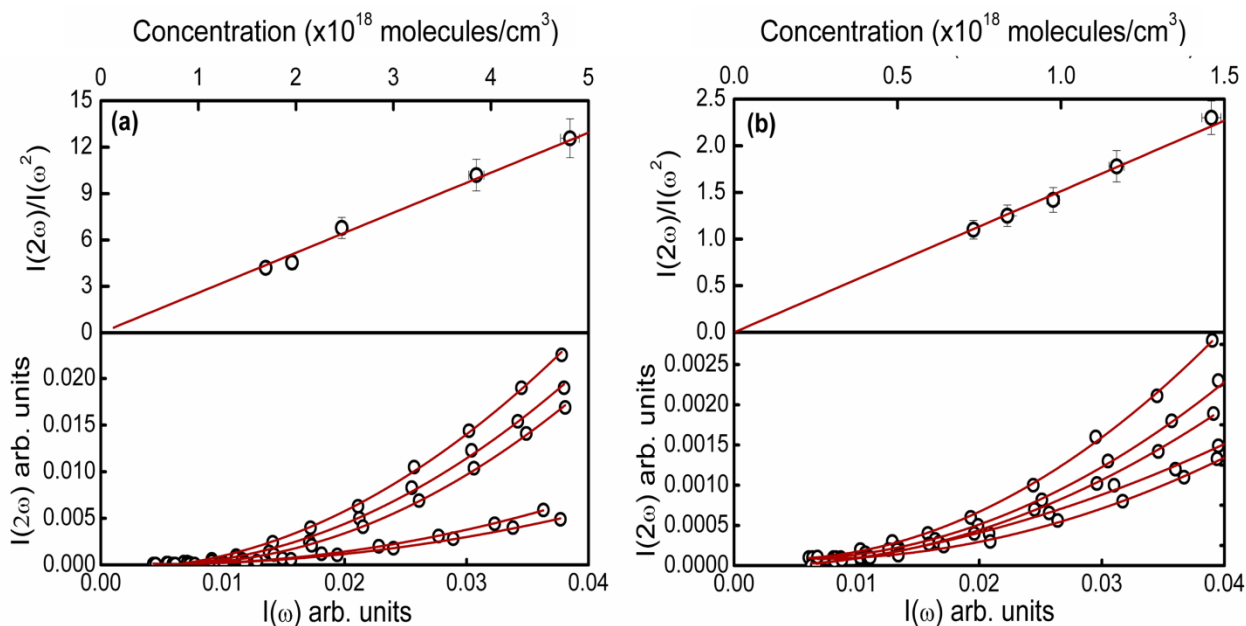


Figure 7. Dependency of the first hyperpolarizability scattering signals as a function of pump intensity for the (a-bottom) **pNA** and (b-bottom) **CAB7β** molecule dissolved in DMSO. Solid lines show the second order polynomial dependence of the signal for each concentration. (a-Top) and (b-Top) show the linear dependence between the hyperpolarizability signal ($I(2\omega)/I^2(\omega)$) and the concentrations for the corresponding molecules.

Table 2 shows static and dynamic results for HRS first hyperpolarizability of the CAB7β molecule obtained at the MP2/cc-pVTZ, B3LYP/cc-pVTZ and CAM-B3LYP/cc-pVTZ levels in the gas-phase and in DMSO solution with the PCM solvation model. The dynamic results were estimated using the multiplicative correction scheme for the standard wavelength at $\lambda = 1064$ nm.

Table 2 - HRS first hyperpolarizability ($\times 10^{-30}$ cm⁵/esu) calculated at different levels of approximation with the DFT-B3LYP/cc-pVTZ optimized geometry.

Level	Gas-phase		DMSO	
	$\lambda=\infty$	$\lambda=1064\text{nm}$	$\lambda=\infty$	$\lambda=1064\text{nm}$
MP2/cc-pVTZ	8.6	12.2	22.3	22.3
DFT-B3LYP/cc-pVTZ	11.2	23.7	32.90	49.4
DFT-CAM-B3LYP/cc-pVTZ	8.4	14.1	22.9	26.3
Experimental	-	-	-	23.1

The effect of solvent on the static HRS β values causes marked increases by factors of 2.6 and 2.9 at the MP2/cc-pVTZ and CAM-B3LYP/cc-pVTZ levels respectively, compared with the gas-phase results. The corresponding increase for the dynamic results is 85%. The effect of frequency dispersion is far less significant in solution, and the dynamic results at $\lambda = 1064$ nm increase by factors of 1.4 and 1.7 (gas-phase) and 1.0 and 1.2 (DMSO), with respect to the corresponding static values. In this way, both MP2/cc-pVTZ and CAM-B3LYP/cc-pVTZ calculations, including solvent and frequency dispersion effects, predict similar values of HRS β (22.3×10^{-30} and 26.3×10^{-30} cm⁵/esu) that are in very good agreement with the experimental result (22.1×10^{-30} cm⁵/esu), while the B3LYP model predicts a value (49.4×10^{-30} cm⁵/esu) that is overestimated in 122%. This latter comparison also shows that the performance of the CAM-B3LYP (a long-range corrected functional) is better than the B3LYP (a standard functional) in predicting the NLO property in DMSO. The nonlinear response presented here was obtained for molecules in solution, which are only a first approximation to molecules in the material environment. For chalcones in particular, large first-order hyperpolarizability can be achieved by including donor and acceptor groups at their extremities, which exhibit intense electronic absorption in low energy regions associated with charge transfer between the ground and the first excited states [46]. Nevertheless, the nonlinear material can be put to practical use if the crystal is non-centrosymmetric.

3.4 Two-photon absorption properties

In Figure 8, the open circles (left axis) represent the experimental two-photon (2PA) cross-section spectrum for the CAB7 β , determined by performing open-aperture Z-scan measurements with femtosecond laser pulses. For comparison purposes, the one-photon (1PA) cross-section spectrum of the CAB7 β is also presented in Figure 8 (red dashed line – right axis). The result on Figure 8 reveals a well-defined 2PA band in the visible region. We can observe the existence of one 2PA allowed band centered at 650 nm with a maximum value for the 2PA cross-section of about 32 GM.

This 2PA band matches very well the linear absorption, as can be seen. In general, 1PA and 2PA dipolar selection rules are antagonist. However, for CAB7 β , which presents a low molecular symmetry, the parity of the excited state is not precisely defined. Consequently, the same electronic state may be accessed via both, one and two-photon absorptions, which explain both spectra have the same shape. The results also show two-photon absorption in the therapeutic window (600 – 700 nm), where biological tissues are relatively transparent. This makes it possible to increase light penetration into human tissue and could consequently increase photodynamic efficacy. Given that chalcones have been used in photodynamic therapy via one-photon absorption [47,48], the compound under study can also be considered a promising candidate for photodynamic therapy via one- and two-photon absorption [49,50].

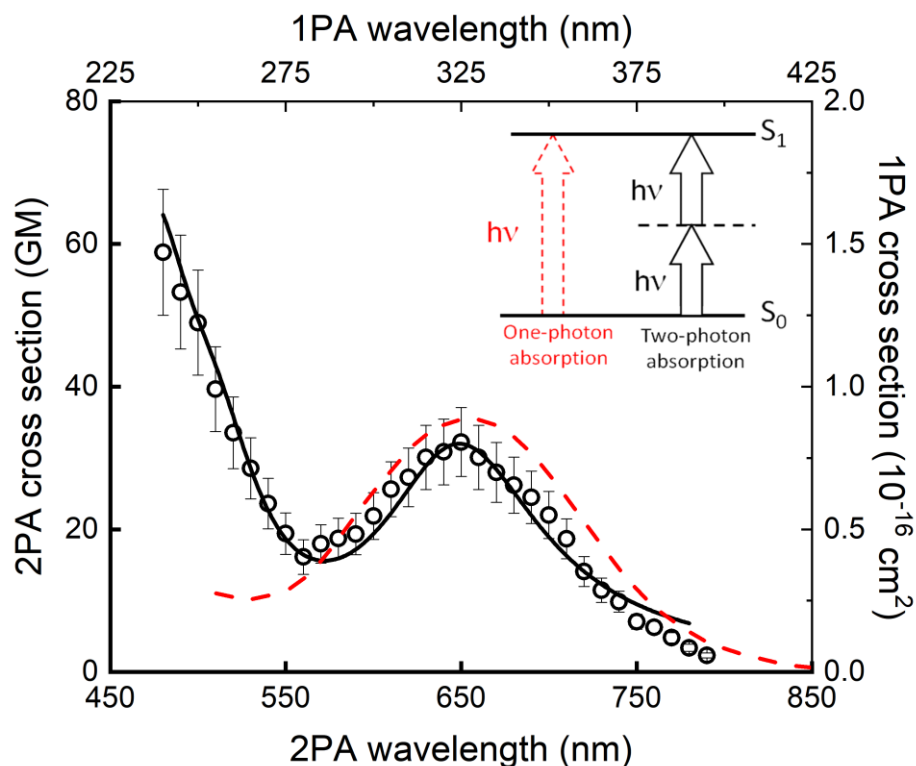


Figure 8. Open circles (left axis) represent the experimental 2PA cross-section spectrum, while the red dashed line (right axis) shows the 1PA cross-section spectrum of the CAB7 β molecule.

3.5 Angiogenesis assessment using the CAM test

Figure 9 shows the results of angiogenesis test of CAB7 β and human S180 sarcoma cells. The CAM group treated with only the highest CAB7 β with dose 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (CAB7 β 50) exhibited reductions in the tubule complexes, junctions, length and size of blood vessels ($p < 0.05$) when compared with the neutral control group (H_2O).

The results show that the S180 cell line causes a significant increase ($p < 0.05$) in the tubule complexes, junctions, lengths and size of CAM blood vessels when compared to the neutral control (H_2O) and carrier group (DMSO). Additionally, there was no significant difference in blood vessel length ($p > 0.05$) in relation to the inducer control group (RE).

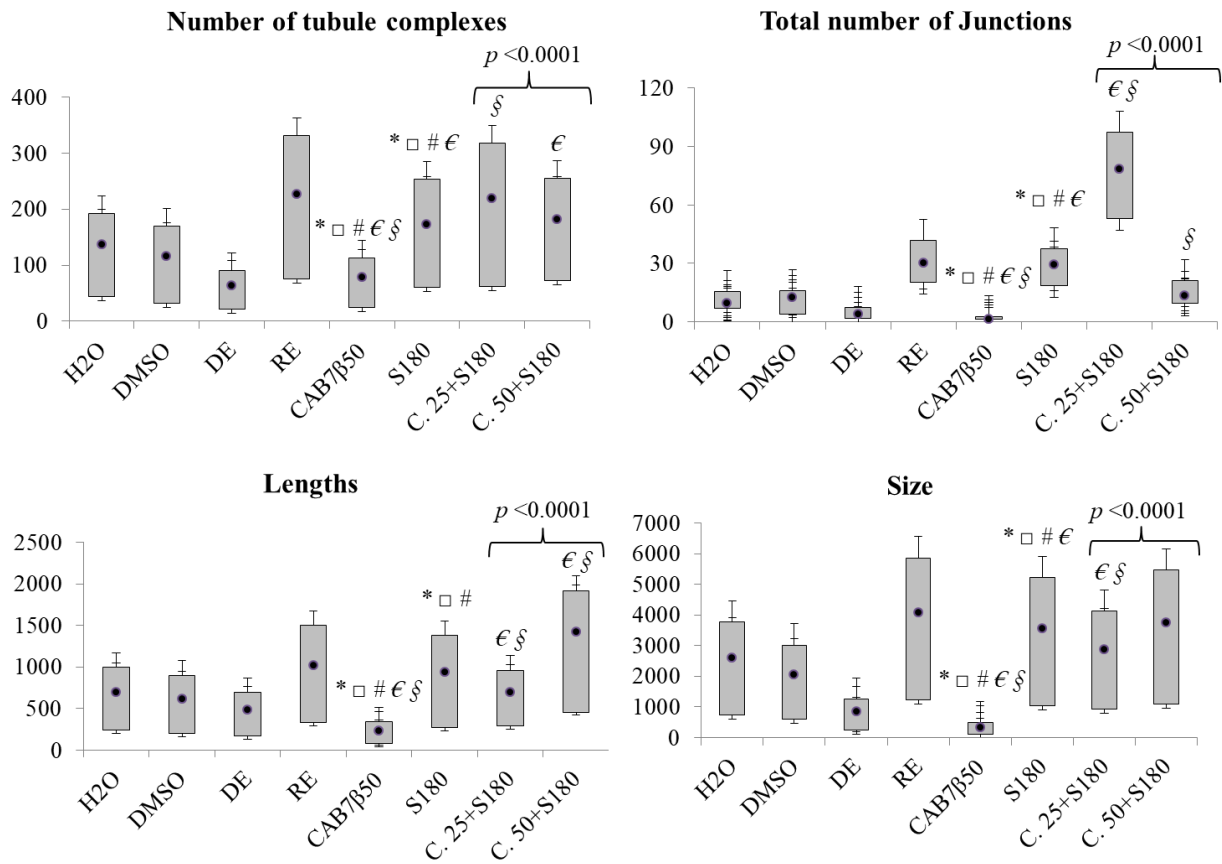


Figure 9. Box Plot of the number of tubule complexes, junctions, length and sizes for vessels formed in CAMs treated with the test substances and controls. Fifteen CAMs were obtained per treatment group, * $p < 0.05$ compared to the neutral control (H₂O), # $p < 0.05$ compared to the angiogenesis inhibitor control (DE), € $p < 0.05$ compared to the carrier substance (DMSO), § $p < 0.05$ compared to the angiogenesis inducer control (RE), § $p < 0.05$ compared to CAB7β (50 μg/μL), § $p < 0.05$ compared to S180 cells. The key shows a comparison between CAM groups treated with 25 and 50 μg/μL of CAB7β along with S180 cells.

In the group treated with 25 μg/μL of CAB7β and S180 cell lines (6×10^5 cells/volume), there was a significant decrease ($p < 0.05$) in the length and size of blood vessels compared to the inducer control group (RE) and S180 cells.

The co-treatment of *CAM* with CAB7 β (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and S180 cells (6×10^5 cells/volume) reduced the number of tubule complexes, junctions and size of vessels present in the membranes with significant difference ($p < 0.05$) in the parameter of the number of tubule complexes when compared to the inducer control group (RE).

It is interesting to note that the length and size were higher ($p < 0.0001$) in the group that received 50 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ of CAB7 β and S180 cells when compared to those treated with 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and S180 cells. However, the number of tubule complexes and junctions were lower ($p < 0.0001$) in the group administered 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of CAB7 β and S180 cells than those administered a dose of 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and S180 cells.

Figure 10 shows the vascular network of the control and test substances, with more blood vessels present in the following groups: inducer control, S180 sarcoma cells, CAB7 β 25 + S180 and CAB7 β 50 + S180. There are fewer vessels in inhibitor controls (DE) and the group treated with the chalcone alone (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). There is notable potential for S180 cells to induce the growth of allantois vessels in the mesenchyme, indicating tumor cell interaction in the ectodermal vascular compartments of CAMs. However, the CAMs treated with 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of CAB7 β and S180 cells lines exhibited fewer vessels and junctions than the inducer control and S180 groups.

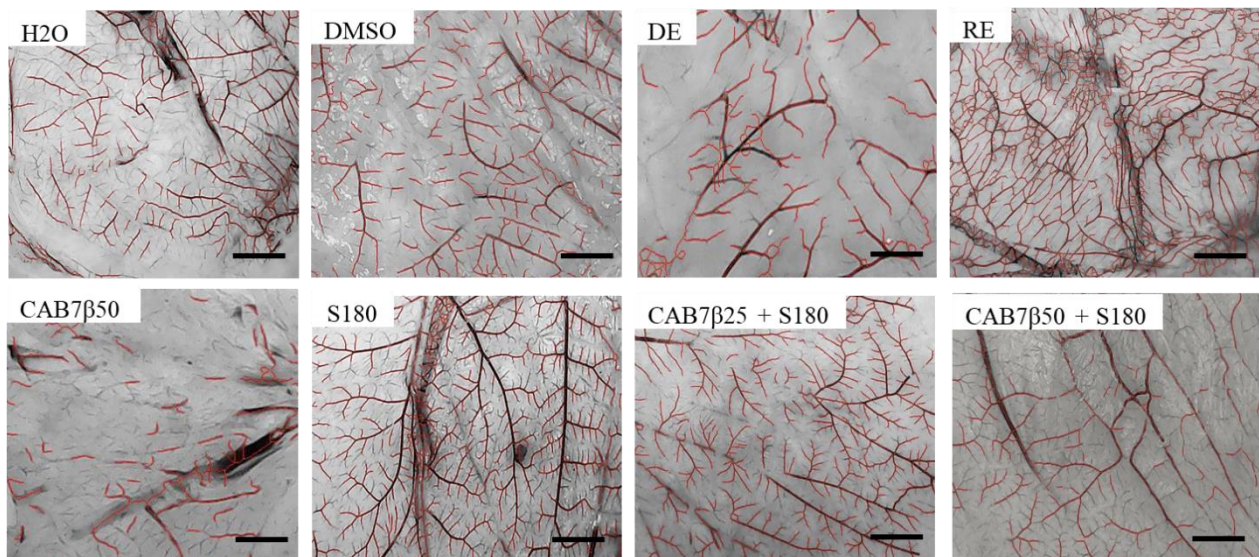


Figure 10. Micrographs of CAMs 72 hours after treatment with H₂O (neutral control - 20 μL), DMSO (carrier substance - 20 μL), DE (angiogenesis inhibitor - 4 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$), RE

(angiogenesis inducer - 30 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$), CAB7 β 50 (50 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$), S180 cells (20 μl of cells at 6×10^5), CAB7 β 25 + S180 and CAB7 β 50 + S180. The skeletonized images of the CAMs were obtained after quantification, using Angioquant software, and indicate the presence of blood vessels in the CAM (shown as red lines), suggesting the angiogenic capacity of the substances tested. (scale bar=20 μm).

The CAM assay has been used to induce blood vessel growth in order to understand the interactive and invasive traits of different tumor cell lines, since vessel growth and the presence of inflammatory elements may demonstrate angiogenic capacity in these cells, which, in turn, favor tumor growth and metastasis [51, 52, 53]. Research using osteosarcoma (SaOS2), ovarian cancer (IGROV-1, OVCAR-3, SKOV-3 and OV-90) and human larynx carcinoma (Hep3) cell lines in the CAM model has demonstrated their angiogenic potential [17, 22, 54]. Some studies indicate high expression of angiogenic factors such as tumor necrosis factors TNF- α and TNF- β , interleukins IL-1 and IL-2, rEGF, MMPs and VEGF in mice transplanted with S180 cells [55-58]. In this respect, the present study found angiogenesis induction by S180 cells, suggesting that angiogenesis stimulation of the S180 cell line in the CAM assay may be related to the increased expression of certain angiogenic factors.

Some studies on the antiangiogenic activity of chalcones indicate that these compounds can inhibit angiogenic factors. Chalcones were found to hinder angiogenic activity in the CAM model, inhibiting fibroblast (FGFs) and epidermal growth factors (EGFs) as well as the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2) [59-61]. In the CAM assay, the flavonoid precursor 4-hydroxychalcone (Q797) suppresses angiogenesis due to its selective effect on endothelial cells and human epithelial cancer by modulating and expressing VEGF and b-FGF, with no signs of cytotoxicity [62].

The antiangiogenic activity of CAB7 β may be a promising target for the development of new anti-cancer therapies, especially against sarcoma, due to its antiangiogenic potential, caused by the inhibition of new blood vessel growth. S180 cells induce blood vessel growth, since they display high expression of angiogenic factors

[55-58], favoring tumor development. The results of CAM histological analysis (Table 3) corroborate the CAM test.

3.6 Histological analysis of CAMs

The results of histological analysis of CAMs (Table 3) corroborate with CAM test. In CAMs treated with CAB7 β alone (50 μg / μL), the results for the histological parameters indicate no significant difference for mean pyknosis and vessel thickness in relation to the neutral control group ($p > 0.05$), whereas means for the presence of fibroblasts, inflammatory cells and red blood cells did not differ significantly ($p > 0.05$) from inhibitor controls (DE) thus demonstrating the anti-inflammatory activity of CAB7 β .

The S180 group exhibited a significant increase in number of blood vessels similar ($p > 0.05$) to the inducer control group (RE). The presence of fibroblasts, inflammatory cells, vessel thickness and red blood cells in the S180 group was also similar ($p > 0.05$) to the means detected in the group treated with the inducer control substance (RE). Interestingly, as shown in Figure 11, vessels in the allantoic epithelium (AE) and mesenchyme (M) showed an irregular growth pattern in the S180 group, as well as large caliber vessels in the allantoic epithelium and clustered red blood cells. Another noteworthy feature of this group was the presence of blood vessels in the chorionic epithelium (ChE) containing nucleated erythrocytes, red blood cells and numerous monocytes.

In our study, CAMs co-treated with 25 μg / μL of CAB7 β and S180 cells exhibited similar means ($p > 0.05$) to inducer controls (RE) for all the parameters, except pyknosis. However, CAMs co-treated with 50 μg / μL and S180 cells showed a significant reduction ($p < 0.05$) in the presence of inflammatory cells and red blood cells in relation to the inducer control, S180 and S180 + CAB7 β (25) groups, with values similar to those of neutral control and carrier substance ($p > 0.05$). Figure 11 shows fewer blood vessels and inflammatory elements in the 50 μg / μL CAB7 β + S180 groups when compared to the S180 and CAB7 β 25 + S180 groups.

Table 3. Histological analysis of chick chorioallantoic membranes (CAM). Mean \pm standard deviation (SD) of the histological parameters classified on a 3-point scale (five membranes were obtained in each treatment)¹.

Treatments ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Angiogenesis	Fibroblasts	Inflammatory Cells	Pyknosis	Thickness of CAM vessels	Presence of red blood cells
H ₂ O	1.4 \pm 0.2	1.3 \pm 0.3	1.8 \pm 0.4	0.9 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3	1.6 \pm 0.3
DMSO	1.3 \pm 0.4	1.4 \pm 0.5	2.1 \pm 0.4	1 \pm 0	1.5 \pm 0.3	1.35 \pm 0.5
DE	1 \pm 0	0.5 \pm 0.35	1.13 \pm 0.6	1 \pm 0.4	1 \pm 0	1 \pm 0.3
RE	2.7 \pm 0.4	2.2 \pm 0.6	2.7 \pm 0.4	1.12 \pm 0	2.4 \pm 0.4	2.4 \pm 0.4
CAB7 β (50)	1.7 \pm 0.3 ^{a, b, c, d, f}	0.8 \pm 0.3 ^{a, b, d, f}	1.3 \pm 1 ^{a, b, d, f}	1.3 \pm 0.4	1.7 \pm 0.3 ^{a, b, c, f}	1.2 \pm 0.6 ^{b, d, f}
S180	2.4 \pm 0.5 ^{a, b, c}	2.13 \pm 0.3 ^{a, b}	3 \pm 0.5 ^{a, b, c}	1.5 \pm 0.7 ^{a, b, c, d}	2.12 \pm 0.6 ^{a, b, c}	2.25 \pm 0.7 ^{a, b, c}
S180 + CAB7 β (25)	2.25 \pm 0.5 ^{a, b, c, e}	2.5 \pm 0.6 ^{a, b, c}	2.5 \pm 0.4 ^{a, c, e, f, g}	1.58 \pm 0.5 ^{a, b, c, d}	2.4 \pm 0.5 ^{a, c, b, e}	2.4 \pm 0.6 ^{a, c, e, g}
S180 + CAB7 β (50)	2.5 \pm 0.5 ^{a, b, c, e}	2.4 \pm 0.6 ^{a, c, b, e}	2 \pm 0.7 ^{c, d, f}	1.3 \pm 0.4 ^{a, b, c}	2.4 \pm 0.5 ^{a, b, c, e}	1.8 \pm 0.4 ^{b, c, d, e, f}

¹ANOVA, Tukey's test. a: Compared to neutral control - H₂O ($p < 0.05$); b: Compared to the carrier substance – DMSO ($p < 0.05$); c: Compared to inhibitor controls - DE ($p < 0.05$); d: Compared to inducer controls – RE ($p < 0.05$); e: Compared to CAB7 β (50 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$) ($p < 0.05$); f: Compared to S180 ($p < 0.05$); g: Compared to S180 + CAB7 β 50 ($p < 0.05$).

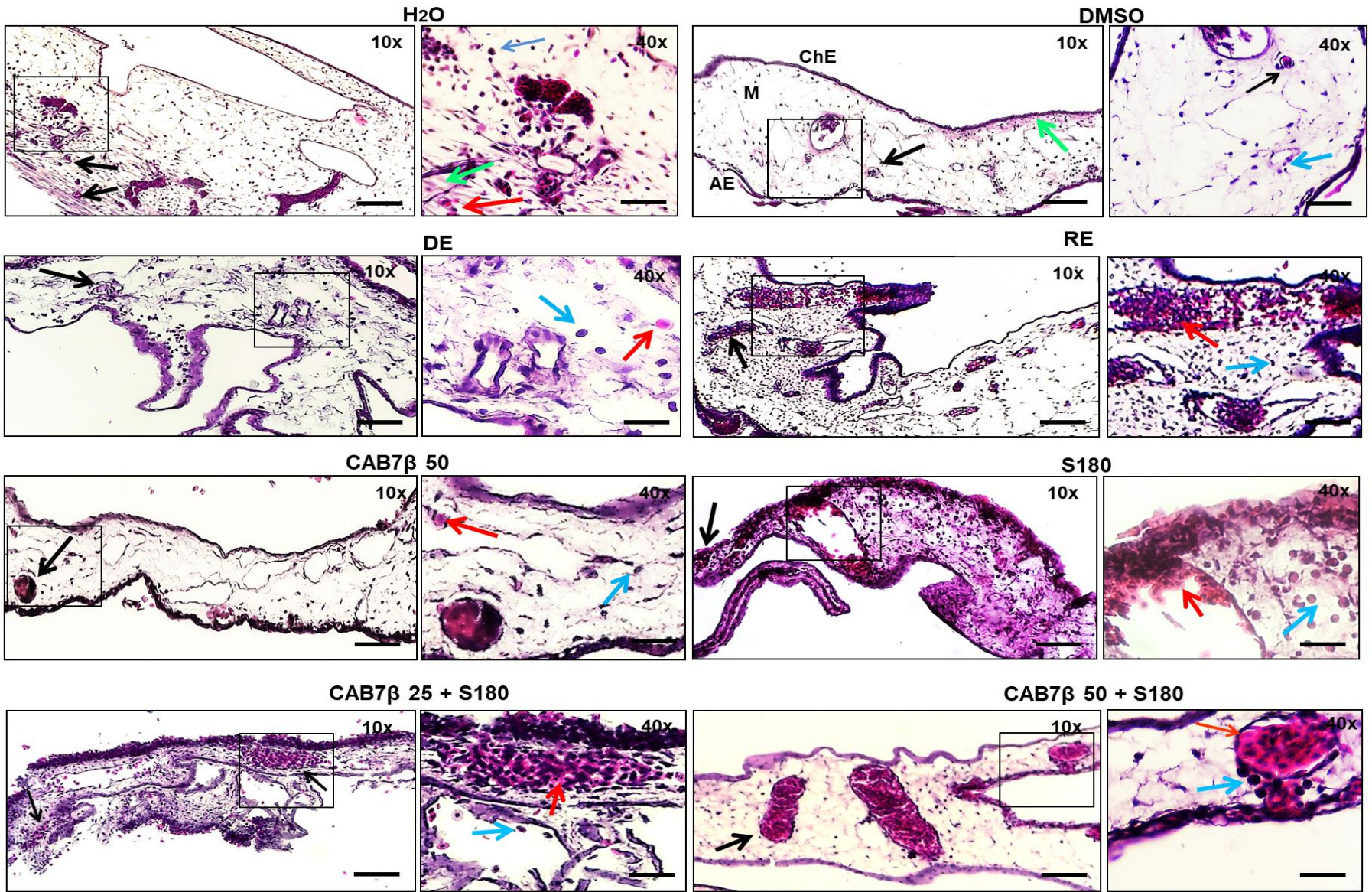


Figure 11. Micrograph of CAMs stained with hematoxylin and eosin (HE) for groups treated with H₂O (neutral control - 20 μ l), DMSO (carrier substance - 20 μ L), DE (4 μ g / μ L – angiogenesis inhibitor), RE (30 μ g / μ L – angiogenesis inducer), CAB7 β 50 (50 μ g / μ L), S180 cells (20 μ l of cells as 6×10^5), CAB7 β 25 + S180 cells and CAB7 β 50 + S180 cells. Black arrows indicate blood vessels, red arrows red blood cells, green arrows indicate fibroblasts and blue arrows inflammatory elements. AE indicates allantoic epithelium; ChE, chorionic epithelium; M, mesenchyme. (scale bar=20 μ m).

Thus, the antiangiogenic activity of CAB7 β may be associated with its anti-inflammatory potential, since there was a notable decline in inflammatory elements in both the CAMs treated with CAB7 β alone and in conjunction with sarcoma 180 cells. Additionally, the antiangiogenic properties of this compound may also be related to its structure.

It is important to underscore that proinflammatory factors such as leukocytes, macrophages, red blood cells, neutrophils, monocytes, mast cells and fibroblasts can produce a significant number of proangiogenic growth factors, including VEGF, FGF, MMP2, MMP9, TNF, IL-6 and IL-8, which stimulate angiogenesis by the proinflammatory mechanism and can favor metastasis [63-66].

Synthetic chalcones such as 3-phenyl-1-(2,4,6-tris (methoxymethoxy) phenyl) prop-2-in-1-one (16) display anti-inflammatory activity by inhibiting the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 macrophages [67]. In tests with mice, 30 mg/kg of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone administered subcutaneously over 20 days inhibited the tumor volume of Lewis lung carcinoma cells by up to 27.2%, whereas the same dose administered over 10 days reduced tumor volume by 33.7% in sarcoma 180 cells [59]. These factors may be related to the anti-inflammatory and anti-tumorigenic power of CAB7 β .

Inflammatory elements, such as monocytes, are also capable of producing large numbers of pro-angiogenic factors, including MMP2, MMP9 and TNF, which significantly stimulate angiogenesis and increase the occurrence of metastases [64-66]. Therefore, the efficiency of CAB7 β in reducing inflammatory elements suggests its application as an antiangiogenic compound in anticancer therapy.

4. Conclusions

This study analyzes the angiogenic potential and optical properties of the synthetic chalcone CAB7 β and the results obtained showed the considerable versatility of this chalcone. Experimental and theoretical results show intense absorption in the UVA and UVC regions, which demonstrate its potential for sunscreen applications. In addition, CAB7 β showed nonlinear optical properties with first hyperpolarizability and a two-photon absorption band centered at 650 nm. The CAM assay showed that sarcoma 180 cells can induce the angiogenic response. We believe this method might be useful in analyzing the phases of tumor development in different types of sarcoma. It was also observed that CAB7 β can inhibit the development of sarcoma S180 cells through its antiangiogenic and anti-inflammatory activities. In this respect, considering that therapeutic approaches using antiangiogenic agents have proved to be efficient against certain tumors, it may be a promising compound in the treatment of sarcoma 180 due to its antiangiogenic potential associated with a reduction in inflammatory elements.

Conflict of interest

All the authors of this manuscript state that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work had the assistance by experts who contributed to the experimental design used in this study and made valuable suggestions on compound selection as well as a general analysis of the data. We are indebted to acknowledge Drs. Carolina Ribeiro e Silva de Oliveira Moura and Francielly Mello.

References

- [1] B.E. Aksöz, R. Ertan, R. Spectral Properties of Chalcones II. *J. Pharm. Sci.* 37 (2012) 205-216.
- [2] R.S. Lima, C.N. Perez, C.C. Da Silva, M.J. Santana, L. H. K. Queiroz-Júnior, S. Barreto, M. O. Moraes, F. T. Martins. Structure and Cytotoxic Activity of Terpenoid-Like Chalcones. *Arab. J. Chem.* (2016) 1-12.

- [3] A. Razmi, A. Zarghi, S. Arfaee, N. Naderi, M. Faizi. Evaluation of Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Activities of Novel Chalcone Derivatives. *Iran J. Pharm. Res.* 12(Suppl) (2013) 153–159.
- [4] A. Vasconcelos, V.F. Campos, F. Nedel, F.K. Seixas, A. O. Dellagostin, K.R. Smith, C.M. de Pereira, F.M. Stefanello, T. Collares, A.G. Barschak. Cytotoxic and Apoptotic Effects of Chalcone Derivatives of 2-Acetyl Thiophene on Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Cell Bioch. Function.* 31 (2013) 289–297.
- [5] D.D. Božić, M. Milenković, B. Ivković, I. Cirković. Antibacterial Activity of Three Newly-Synthesized Chalcones & Synergism with Antibiotics Against Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian J. Med. Res.* 140 (2014) 130–137.
- [6] D. Gupta, D.K. Jain. Chalcone Derivatives as Potential Antifungal Agents: Synthesis, and Antifungal Activity. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 6 (2015) 114–117.
- [7] R. Ramirez-Tagle, C.A. Escobar, V. Romero, I. Montorfano, R. Armisen, A.V. Borg, E. Jeldes, L. Pizarro, F. Simon, C. Echeverria. Chalcone-Induced Apoptosis through Caspase-Dependent Intrinsic Pathways in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1-18.
- [8] D. Dridi, A.B. Abdelwahab, E. Bana, P. Chaimbault, F. Meganem, G. Kirsch. Synthesis and Molecular Modeling of Some New Chalcones Derived from Coumarine as CDC25 Phosphatases Inhibitors. *Med. J. Chem.* 5 (2016) 323-330.
- [9] V. Ramkumar, S. Anandhi, P. Kannana, R. Gopalakrishnan. Synthesis, single crystal growth, characterization and comparison of two new enone shifted chalcones and their NLO behavior. *Cryst Eng Comm.* 15 (2013), 2438–2449.
- [10] M. S. Kiran, B. Anand, S. S. S. Sai, G. N. Rao. Second- and third-order nonlinear optical properties of bis-chalcone derivatives. *J. Photochem. Photobiol. A* 290 (2014), 38–42
- [11] D.D. Jandial, C.A. Blair, S. Zhang, L.S. Krill, Y.B. Zhang, X. Zi. Molecular Targeted Approaches to Cancer Therapy and Prevention Using Chalcones. *Curr. Cancer Drug Targets* 2014, Vol. 14, No. 2.
- [12] D.K. Mahapatra, S. K. Bharti, V. Asati. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* 98 (2015), 69e114.

- [13] X. Zhao, W.L. Dong, Y.D. Gao, D. S. Shin, Q. Ye, L. Su, F. Jiang, B.X. Zhao, J.Y. Miao.
Novel indolyl-chalcone derivatives inhibit A549 lung cancer cell growth through activating Nrf-2/HO-1 and inducing apoptosis in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* 7 (2017), 3919.
- [14] L. Mirossay, L. Varinská, J. Mojžiš, J. Antiangiogenic Effect of Flavonoids and Chalcones: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 27.
- [15] B. Ahcene, R. Xavier, B. Jean, A. Boumendjel, X. Ronot, J. Boutonnat. Chalcones derivatives acting as cell cycle blockers: potential anti cancer drugs? *Curr. Drug Targets* 10 (2009), 363-71.
- [16] P. Singh, Amit Anand, V. Kumar. Recent developments in biological activities of chalcones. *Eur. J. Med. Chem.* 85 (2014), 758e777.
- [17] S. Ziyad, M.L. Iruela-Arispe. Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. *Genes Cancer* 2 (2011) 1085–1096.
- [18] F. Hillen, A.W. Griffioen. Tumour Vascularization: Sprouting Angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 489–502.
- [19] B. Al-Husein, M. Abdalla, M. Trepte, D.L. Deremer, P.R. Somanath. Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Pharmacotherapy.* 32 (2012), 1095-111.
- [20] N. S. Vasudev, A.R. Reynolds, Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* 17 (2014), 471–494.
- [21] P. Nowak-Sliwinska, T. Segura, M.L. Iruela-Arispe. The chicken Chorioallantoic Membrane Model in Biology, Medicine and Bioengineering. *Angiogenesis.* 17 (2014) 779-804.
- [22] N.A. Lokman, A.S.F. Elder, C. Ricciardelli, M.K. Oehler. Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an *In Vivo* Model to Study the Effect of Newly Identified Molecules on Ovarian Cancer Invasion and Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 9959–9970.
- [23] L.M. Almeida, J.F. Floriano, T.P. Ribeiro, L.N. Magno, L.S.L.S. da Mota, N. Peixoto, F. Mrué, P.R. Melo-Reis, R.S. Lino Júnior, C.F.O. Graeff, P.J. Gonçalves. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical

properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25 (2014) 2153-2162.

[24] L.A. Araújo, L.A. Assunção, N.J. Silva-Júnior, S.R. Lemes, P.R. Melo-Reis. Angiogenic Activity of Sucupira (*Pterodon emarginatus*) oil. *Sci Med.* 25 (2015) 1-7.

[25] H. Chen, C.S. Wang, M. Li, E. Sanchez, A. Bereson, E. Wirtschafter, J. Wang, J. Shen, B. Bonavida, J.R. Berenson. A Novel Angiogenesis Model for Screening Anti-Angiogenic Compounds: The Chorioallantoic Membrane/Feather Bud Assay. *Int. J. Oncol.* 37 (2010) 71-9.

[26] P. Fergelot, J.C. Bernhard, F. Soulet, W.W. Kilarski, C. Léon, N. Courtois, C. Deminiere, J.M. Helbert, P. Antkzac, F. Falciani, N. Rioux-Leciercq, J.J. Patard, Ferrière, A. Ravaud, M. Hagedorn, A. Bikfavi. The Experimental Renal Cell Carcinoma Model in the Chick Embryo. *Angiogenesis.* 16 (2013) 181–194.

[27] M. Balke , A. Neumann, C. Kersting, K. Agelopoulos, C. Gebert, G. Gosheger, et al. Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC Res Notes.* 3 (2010) 58.

[28] M. Balke , A. Neumann, K. Szuhai , K. Agelopoulos, C. August, G. Gosheger, et al. A short-term in vivo model for giant cell tumor of bone. *BMC Cancer.* 11 (2011) 241.

[29] L. Alonso, R. N. Sampaio, T.F.M. Souza, R.C. Silva, N.M. Barbosa-Neto, A.O. Ribeiro, A. Alonso, P.J. Gonçalves. Photodynamic Evaluation of Tetracarboxy-Phthalocyanines in Model Systems. *J. Photochem. Photobiol. B.* 161 (2016) 100–107.

[30] Y. Dwivedi, L. De Boni, P.J. Gonçalves, L.M. Mairink, R. Menegatti, T.L. Fonseca, S.C. Zilio. Experimental and theoretical investigation of optical nonlinearities in (nitrovinyl)-1H-pyrazole derivative. *Spectrochim. Acta A* 105 (2013) 483-487.

[31] M. Sheikbahae, A.A. Said, T.H. Wei, D.J. Hagan, E.W. Vanstryland. Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam, *IEEE J. Quantum Electron.* 26 (1990) 760–769.

- [32] L. De Boni, D.S. Correa, D.L. Silva, P.J. Gonçalves, S.C. Zilio, G.G. Parra, I.E. Borissevitch, S. Canuto, C.R. Mendonça. Experimental and theoretical study of two-photon absorption in nitrofurán derivatives: Promising compounds for photochemotherapy. *J. Chem. Phys.* 134 (2011) 014509.
- [33] J. Tomasi, B. Mennucci, E. Cancès. The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. *J. Mol. Struct.* 464 (1999) 211-226.
- [34] E. Runge, E.K.U. Gross. Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems. *Phys. Rev. Lett.* 52 (1984) 997-1000.
- [35] H. Sekino, R.J. Bartlett. Molecular Hyperpolarizabilities. *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 3022.
- [36] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, et al. Gaussian 09, rev. A. 02. Gaussian, Inc., Wallingford CT, USA, 2009.
- [37] C.S.R. Menezes, L.C.C.P. Costa, V.M.R. Avila, M.J. Ferreira, C.U. Vieira, L.A. Pavanin, W.B. Santos, E.P. Silveira-Lacerda. Analysis *in vivo* of Antitumor Activity, Cytotoxicity and Interaction Between Plasmid DNA and the *cis*-dichlorotetraammineruthenium (III) Chloride. *Chem. Biol. Interact.* 167 (2007) 116-124.
- [38] S. Debnath, S. Karan, M. Debnath, J. Dash, T.K. Chatterjee. Poly-L-Lysine Inhibits Tumor Angiogenesis and Induces Apoptosis in Ehrlich Ascites Carcinoma and in Sarcoma S-180 Tumor. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 18 (2017) 2255–2268.
- [39] P.R. Melo-Reis, L.S. Andrade, C.B. Silva, L.M.M. Araújo, M.S. Pereira, F. Mrué, L. Chen-Chen. Angiogenic Activity of *Synadenium umbellatum* Pax látex. *Braz. J. Biol.* 70 (2010) 189-194.
- [40] D.A. Chaves, S.R. Lemes, L.A. Araujo, M.A.M. Sousa, G.B. Freitas, R.S. Lino-Junior, F. Mrué, P.R. Melo-Reis. Avaliação da Atividade Angiogênica da Solução Aquosa do Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). *Rev. Bras. Pl. Med.* 18 (2016) 524-530.

- [41] A. Niemistö, V. Dunmire, O. Yli-Harja, W. Zhang, I. Shmulevich. Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. *IEEE Trans. Med. Imaging* 24 (2005) 549-553.
- [42] D. Ribatti, A. Vacca, F. Dammacco. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model For *In Vivo* Research on Angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 40 (1996) 1189-1197.
- [43] N.J. Lowe, N.A. Shaath. *Sunscreens: Development, Evaluation and Regulatory Aspects (Cosmetic Science & Technology Series)*. Eds. (1990) New York, Marcel Dekker.
- [44] F. L. Huyskens, P.L. Huyskens, A.P. Persoons, Solvent dependence of the first hyperpolarizability of p-nitroanilines: Differences between nonspecific dipole-dipole interactions and solute-solvent H-bonds. *J. Chem. Phys.* 108 (1998) 8161–8171.
- [45] P.L. Franzen, L. Misoguti, S.C. Zilio, Hyper-Rayleigh scattering with picosecond pulse trains. *Appl. Opt.* 47 (2008) 1443–1446.
- [46] E.D. D'silva, G. Krishna Podagatlapalli, S. Venugopal Rao, S.M. Dharmaprakash. Study on third-order nonlinear optical properties of 4-methylsulfanyl chalcone derivatives using picosecond pulses. *Mater. Res. Bull.* 47 (2012) 3552–3557.
- [47] Y. Yesuthangam, S. Pandian, K. Venkatesan, R. Gandhidasan, R. Murugesan. Photogeneration of reactive oxygen species and photoinduced plasmid DNA cleavage by novel synthetic chalconas. *J. Photochem. Photobiol. B* 102 (2011) 200–208.
- [48] W.C.M.A. Melo, M.B. Santos, B.C. Marques, L.O. Regasini, M.J.S.M. Gianninia, A.M.F. Almeida, Selective photoinactivation of *Histoplasma capsulatum* by water-soluble derivatives chalconas. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 18 (2017) 232–235.
- [49] L. De Boni, D. S. Correa, D. L. Silva, P. J. Gonçalves, S. C. Zilio, G. G. Parra, I. E. Borissevitch, S. Canuto, C. R. Mendonca, Experimental and theoretical study of two-photon absorption in nitrofurane derivatives: Promising compounds for photochemotherapy. *J. Chem. Phys.* 134 (2011) 014509.
- [50] X. Zhang, S. Abida, L. Shi, Z. Sun, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, F. Paula, C. O. Paul-Roth, New conjugated meso-tetrathienylporphyrin-cored derivatives as two-

photon photosensitizers for singlet oxygen generation. *Dyes Pigm.* 153 (2018) 248–255.

[51] R. Manjunathan, M. Ragunathan. Chicken chorioallantoic membrane as a Reliable Model to Evaluate Osteosarcoma - an Experimental Approach Using SaOS2 Cell Line. *Biol Proced. Online.* 17 (2015) 1-13.

[52] J.A. Nagy, S.H. Chang, A.M. Dvorak, H.F. Dvorak. Why are Tumour Blood Vessels Abnormal and Why is it Important to Know? *Br. J. Cancer* 100 (2009) 865–869.

[53] S. Jana, K. Chatterjee, A.K. Ray, P. DasMahapatra, S. Swarnakar. Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 Activity by COX-2-PGE2-pAKT Axis Promotes Angiogenesis in Endometriosis. *PLoS One* 11(2016) e0163540.

[54] H.L. Chang, R. Pieretti-Vanmarcke, F. Nicolaou, X. Li, X. Wei, D.T. MacLaughlin, P.K. Donahoe. Mullerian Inhibiting Substance Inhibits Invasion and Migration of Epithelial Cancer Cell Lines. *Gynecol. Oncol.* 120 (2011) 128–134.

[55] F.F. Lei, J.X. Zhao, X.X. Wang, B.T. Yao, K. Ding, K. Study on Depressant Effects of THPS on S180 Tumor-Bearing-Mice and its Mechanisms. *Zhong yao cai* 30 (2007) 1548-51.

[56] F. Liu, J.G. Wang, S.Y. Wang, Y. Li, Y.P. Wu, S.M. Xi. Antitumor Effect and Mechanism of *Gecko* on Human Esophageal Carcinoma Cell Lines *in vitro* and Xenografted Sarcoma 180 in Kunming Mice. *World. J. Gastroenterol.* 14 (2008) 3990–3996.

[57] A. Aikemu, A. Umar, A. Yusup, H. Upur, B. Berké, B. Bégaud, N. Moore, N. Immunomodulatory and Antitumour Effects of Abnormal Savda Munziq on S180 Tumour-Bearing Mice. *BMC Complement. Altern. Med.* 12 (2012) 157.

[58] J. Wang, S. Chen, S. Xu, X. Yu, D. Ma, X. Hu, C. Xiaolu. *In vivo* Induction of Apoptosis by Fucoxanthin, a Marine Carotenoid, Associated with Down-Regulating STAT3/EGFR Signaling in Sarcoma 180 (S180) xenografts-bearing mice. *Mar. Drugs* 10 (2012) 2055–2068.

[59] Y.S. Lee, S.S. Lim, K.H. Shin, Y.S. Kim, K. Ohuchi, S.H. Jung. Anti-angiogenic and Anti-Tumor Activities of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 1028-1031.

- [60] J.S. Lee, Y. Kang, J.T. Kim, D. Thapa, E.S. Lee, J.A. Kim. The anti-angiogenic and anti-tumor activity of synthetic phenylpropenone derivatives is mediated through the inhibition of receptor tyrosine kinases. *Eur. J. Pharmacol.* 677 (2012) 22-30.
- [61] R. Karki, Y. Kang, C.H. Kim, K. Kwak, J.A. Kim, E.S. Lee.. Hydroxychalcones as potential anti-angiogenic agent. *Bull. Korean Chem. Soc.* 33 (2012) 2925-2929.
- [62] L. Varinska, M.V. Wijhe, M. Belleri, S. Mitola, P. Periesi, M. Presta, P. Koolwijk, L. Ivanova, J. Mojzis. Anti-Angiogenic Activity of the Flavonoid Precursor 4-hydroxychalcone. *Eur. J. Pharmacol.* 69 (2012)125–33.
- [63] B. Qian, J.W. Pollard. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell.* 141 (2010) 39-51.
- [64] M. Rajaram, J. Li, M. Egeblad, R.S. Powers. System-Wide Analysis Reveals a Complex Network of Tumor-Fibroblast Interactions Involved in Tumorigenicity. *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003789.
- [65] I. Häuselmann, M. Roblek, D. Protsyuk, L. Knopfova, S. Grässle, A.T. Bauer, S.W. Schneider, L. Borsig. Monocyte Induction of E-Selectin-Mediated Endothelial Activation Releases VE-Cadherin Junctions to Promote Tumor Cell Extravasation in the Metastasis Cascade. *Cancer Res.* 76 (2016) 5302-12.
- [66] T. Shrihari. Dual Role of Inflammatory Mediators in Cancer. *Ecancermedicalscience* 11 (2017) 721.
- [67] G. Bist, N. T. Pun, T.B. Magar, A. Shrestha, H.J. Oh, A. Khakurel, P.H. Park, E.S. Lee. Inhibition of LPS-stimulated ROS production by fluorinated and hydroxylated chalcones in RAW 264.7 macrophages with structure-activity relationship study. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 1205-1209.

6.2. Manuscrito 2

Presence of antigenotoxic and anticytotoxic effects of the chalcone 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one using *in vitro* and *in vivo* assays.

Running title: Antigenotoxic and anticytotoxic effects of a new chalcone

Susy Ricardo Lemes^{1*}, Carolina Ribeiro e Silva¹, Jefferson Holanda Vêras¹, Lee Chen Chen¹, Rosa Silva Lima², Caridad Noda Perez², Maria Alice Montes de Sousa³, Paulo Roberto de Melo Reis³, Nelson Jorge da Silva Junior⁴

¹ Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás, 74001970 Goiânia, GO, Brazil

² Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74001970 Goiânia, GO, Brazil

³ Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 74605010 Goiânia, GO, Brazil

⁴ Escola de Medicina, Farmácia e Biomedicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 74605010 Goiânia, GO, Brazil

* **Corresponding author:** susynzr@gmail.com

Aceito para publicação no periódico Drug and Chemical Toxicology (Fator de impacto 1.53).

Abstract

Chalcones are chemically defined as α,β -unsaturated ketones with a 1,3-diphenyl-2-propen-1-one nucleus. These compounds occur naturally in plants and are considered precursors of flavonoids. Given that evaluating genetic toxicology tests is essential in investigating the safe use and chemopreventive potential of different natural and synthetic compounds, this study aimed to assess the genotoxic, cytotoxic, antigenotoxic and anticytotoxic activity of the chalcone 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one (CAB7 β). The CAB7 β was synthesized via Claisen Schmidt reaction. The Ames test was applied using the co-treatment model as well as a micronucleus assay of mouse bone marrow with co-, pre- and post-treatment models. Our results indicate no genotoxic effect for CAB7 β in any of the tests applied. At all the concentrations used, CAB7 β showed a significant DNA protective effect against the mutagenic action of 4-nitroquinoline-1-oxide and sodium azide according to the Ames test, and against doxorubicin in the co-, pre- and post-treatment models of the micronucleus assay. CAB7 β alone displayed cytotoxic activity in the micronucleus test. At concentrations of 12,5 and 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$, CAB7 β showed a moderate cytotoxic profile only in *S. typhimurium* strain TA98. However, an anticytotoxic effect was observed against *S. typhimurium* strain TA100 for all the concentrations tested and during co-, pre- and post-treatment in the micronucleus assay. It was concluded that CAB7 β exhibited a slightly cytotoxic effect in *S. typhimurium* strain TA98 and significant antigenotoxic and anticytotoxic effects in cells of mouse, making it a promising candidate in chemoprevention and possibly in the development of new cancer treatments.

Keywords: Ames test; Anticytotoxic; Antigenotoxic; Chalcone; Micronucleus test;

Introduction

Chalcones are chemically defined as α,β -unsaturated ketones with a 1,3-diphenyl-2-propen-1-one nucleus. These compounds occur naturally in plants and are considered precursors of flavonoids. Chalcones can be synthesized via a Claisen-Schmidt condensation reaction between benzaldehydes and acetophenones using a basic or acidic catalyst (Findik et al., 2009; Mai et al., 2014). Different biological properties have been reported for chalcones, including antibacterial, antifungal, antinociceptive, anti-inflammatory, antiangiogenic, anticancer and antioxidant activity (Jantan et al., 2014; Gupta and Jain, 2015; Ma et al., 2016, Lima et al., 2016; Eichenberger et al., 2017).

Developing new molecules and studying their pharmacological potential is important in devising treatments for a variety of diseases. In this respect, synthesizing molecules based on pharmacophoric groups of natural substances, such as chalcones, is a rational model in the production of drugs and for use in pharmacological screening. Synthesizing compounds makes it possible to identify a specific substance, analyze biological activities, obtain synthetic analogues with potential pharmacological effects, and develop new reactions and reagents (Siddiqui et al., 2012; Wilson and Roberts, 2012).

Given the importance of chalcones in developing new therapies, genetic toxicology tests must be evaluated to ensure their safe use and chemopreventive potential. Identifying genotoxic and antigenotoxic compounds and assessing their mechanisms of action deserve special attention considering their therapeutic potential in human health (Narayan et al., 2010).

Short-term genotoxicity assays are widely used to identify mutagenic substances and possible carcinogens in natural environments, as well as antimutagens and

anticancer agents. One such assay is the Ames test, used to analyze different *Salmonella typhimurium* strains and determine different types of genetic alterations, such as base substitutions and small errors in the DNA reading frame (Mortelmans and Zeiger, 2000).

Another important test is the micronucleus assay in mouse hematopoietic bone marrow, considered one of the most widely used in genotoxicity studies. It can be used to test different classes of natural compounds and chemical products, including pharmaceuticals, agricultural products and food additives (Hayashi, 2016; Lemes et al., 2017). The minimum time in which micronuclei are detected is between 10 and 24 hours and the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) is an isolable measurement of chromosomal loss and damage. In the same assay, the ratio of PCEs to normochromatic erythrocytes (PCE/NCE) is an indicator of the cytotoxic or anticytotoxic activity of a specific compound (Ribeiro, 2003).

As such, considering that chalcones exhibit different biological properties and that identifying their genotoxic and mutagenic effects is vital in establishing the safe use of a substance, this study aimed to assess the genotoxic, cytotoxic and protective effects of the chalcone 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one (CAB7 β), using a *S. typhimurium* reversed mutation assay (Ames test) and micronucleus assay in mouse bone marrow.

Materials and Methods

Synthesis of 1E, 4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6- trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one

The chalcone 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one (CAB7 β), molecular formula C₂₀H₂₃ClO, was synthesized at the Synthesis and Crystallographic Studies Laboratory of the Institute of Chemistry at the Federal University of Goiás. The ketone was synthesized and then condensed to *p*-chlorobenzaldehyde via the Claisen Schmidt reaction to obtain CAB7 β -ionone.

Methanol, β -ionone and *p*-chlorobenzaldehyde were used for this reaction, with 99% purity. Sodium hydroxide (85% pure) was used as catalyst and acetone and isopropyl alcohol as solvents.

Experimental Procedure

A sterile reactor flask containing 0.3 mL of distilled water was added with 15 mL of methanol and 3.0 mmol of sodium hydroxide. Next, 1.5 mmol of β -ionone was added to the mixture, followed by 2.5 mmol of *p*-chlorobenzaldehyde after 5 minutes, with the reaction remaining under magnetic stirring at ambient temperature (Figure 1).

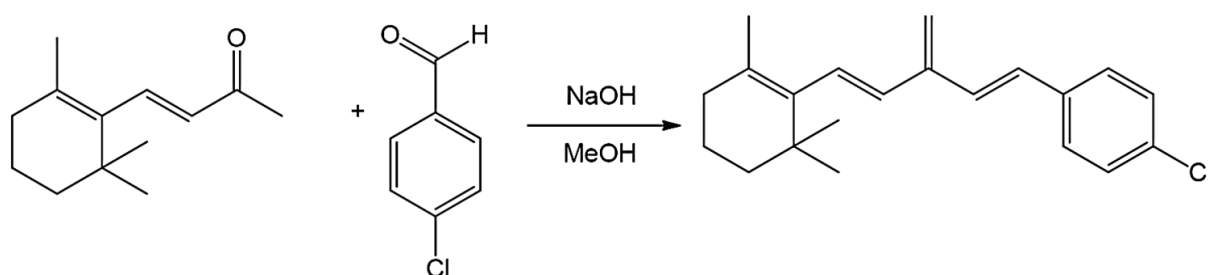


Figure 1. Diagram depicting the synthesis of 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one. The compound was previously synthesized and presented.

Ames Test

Bacterial Strains

The *S. typhimurium* strains TA98 and TA100 used in the Ames test were supplied by the Laboratory of Molecular Radiobiology of the Carlos Chagas Filho Biophysics Institute at the Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Experimental Procedure

The test was conducted according to the methodology developed by Maron and Ames (1983). For mutagenicity assessment, *S. typhimurium* strains TA98 and TA100 were incubated for 12 hours in nutrient broth at 37°C, under constant agitation and aeration in a water bath shaker until reaching steady-state growth ($1-2 \times 10^9$ cells/mL). In the analysis of mutagenic effect, 100 μ L aliquots of the cultures of each bacterial strain were incubated in triplicate test tubes with 12.5, 25 and 50 μ g/plate of CAB7 β for 25 minutes at 37°C, under constant agitation and aeration. Negative (10 μ L of DMSO) and positive controls (1.5 μ g of 4NQO per plate for TA98 and 3 μ g of sodium azide for TA100) were also included in the experiments.

The CAB7 β concentrations used were 12.5, 25 and 50 μ g / plate and each concentration was diluted in 10 μ L of DMSO (lot no. 20881, Neon Comercial®, Suzano, São Paulo, SP, Brazil). A 0.1 ml aliquot of bacterial suspension ($1-2 \times 10^9$ cells / mL) of each strain (TA98 and TA100) was incubated with different CAB7 β concentrations at 37 ° C for 25 min. A 2.0 mL aliquot of top agar (0.6% Kasvi bacteriological agar, 0.5% NaCl, 50 μ M of L-histidine and 50 uM of biotin at 45°C) was added to the test tubes and the contents poured onto Petri dishes containing a minimal agar medium (1.5% agar, 2% glucose and 2% Vogel-Bonner solution). Next, the Petri dishes were placed in a biochemical oxygen demand (BOD) incubator at 37°C for 48 hours. Each test was performed three times and did not include negative (10 μ L of DMSO) or positive controls (for TA98: 1.5 μ g/plate of 4NQO – lot

WXBC1554V, Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil, and for TA100: 3 µg/plate of sodium azide – lot no. 100GR, Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil).

In the assessment of antimutagenic activity, the different CAB7β concentrations (12.5, 25 and 50 µg/plate) were co-administered with the respective positive controls. After incubation at 37°C for 48 hours in a DBO incubator, the His+ revertant colonies were counted, considering the arithmetic mean of the results between plates.

Statistical analysis

The data obtained in mutagenicity and antimutagenicity tests of CAB7β and controls via the Ames test were tabulated and the experimental values were expressed as mean ± standard deviation (SD). ANOVA and Tukey's post hoc were used for statistical analyses. A p-value < 0.05 was considered significant. The magnitude of induced mutagenesis was determined using the mutagenic index (MI), calculated as the ratio between the number of colonies in the test substance treatment and the number in the treatment with the negative control. The inhibition percentage (IP) of mutagenicity induced by each mutagen (4-NQO or sodium azide) was calculated using the formula below (Sghaier et al., 2011).

$$IP(\%) = \left[1 - \left(\frac{\text{no. of revertants in the test plate} - SR}{\text{no. of revertants in the positive control test} - SR} \right) \right] \times 100$$

Where:

TP: number of His+ revertant colonies in test plates (plates incubated with the mutagenic compound and CAB7β);

PC: number of His+ revertant colonies in positive control plates (plates incubated with only the mutant compound);

SR: Number of spontaneous His⁺ revertant colonies in negative control plates (plates incubated without the mutagenic compound and CAB7 β).

Micronucleus assay

Animals

Seventy healthy male and female Swiss Webster mice (*Mus musculus*), aged between 45 and 60 days and weighing 30 to 40 grams, were supplied by the vivarium of the Pontifical Catholic University of Goiás. The animals were housed in 40x30x16 cm polypropylene cages lined with wood shavings, each containing 4 mice, which received Labina pellets (Presence®) and filtered water *ad libitum*. The room where the animals were housed was kept at ambient temperature (25°C), with a ventilation system and light-dark cycle (light 7:00 a.m. – 7 p.m., dark 7 p.m. - 7:00 a.m.).

Fifty-five mice were used in mutagenicity and antimutagenicity testing, as well as 15 for the positive and negative controls. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Pontifical Catholic University of Goiás, under protocol number 2831100316.

The control and experimental groups consisted of 14 groups of five mice, which were individually marked and weighed on the same day the chemical substances were administered. The groups consisted of co-treatment, pre-treatment and post-treatment. We emphasize that in all treatment models we used the doses of 12.5, 25, 50 mg / kg CAB7 β due to the availability of our compound and previous mutagenicity studies using other synthetic chalcones have also used similar doses (Yamamoto et al., 1992; Qu et al., 2014; Lima et al., 2016; Lima et al., 2017).

In co-treatment, CAB7 β was intraperitoneally (i.p.) administered to three groups of mice at doses of 12.5, 25, 50 mg/kg of body weight (bw), respectively, concomitantly

to 5 mg/kg bw of doxorubicin (DXR, lot A4150116, Glenmark®, São Paulo, SP). Another three groups received single administration i.p. of 50 mg/kg bw of CAB7 β , proportion of 0.1 ml/10g according to bw of the negative control dimethyl sulfoxide (99% DMSO, lot no. 20881, Neon Comercial®, Suzano, São Paulo, SP, Brazil) and 5 mg/kg bw of DXR (positive control), respectively.

In the pre-treatment model, three groups were treated (i.p.) with 12.5, 25 and 50 mg/kg bw of CAB7 β respectively for five days, followed by 5 mg/kg bw (i.p.) of DXR two hours after the last CAB7 β treatment. One group was administered (i.p.) only the highest CAB7 β dose (50 mg/kg bw) for five days in order to determine its mutagenic effect. Another group received (i.p.) 0.1 ml/10g of DMSO for five days and served as negative control.

In post-treatment, three groups of mice were initially treated with DXR and after 6 and 12 hours, with 12.5, 25 and 50 mg/kg bw of CAB7 β (i.p.). After, the animals were euthanized by cervical dislocation 24 hours after administration of the DXR.

Experimental Procedure

The experimental procedure was in accordance with von Ledebur and Schmid (1973). All the animals treated with DXR were euthanized by cervical dislocation 24h after administration and the mice that received only CAB7 β were euthanized 24h after receiving the compound.

Following cervical dislocation, described by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) as the fastest and most concise method, the proximal femoral epiphysis was removed and the hematopoietic bone marrow was aspirated with 1mL of fetal calf serum (FCS, lot number 60428001, Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brazil). After homogenization in serum, the marrow was centrifuged (1000

rpm x 5 min). The supernatant was partially discarded and the cell pellet was homogenized using a pipette. Next, a smear slide was made using one drop (10 µg) of the cell pellet. After 24 hours, the slides were stained by Romanowsky staining, using a Panotico kit (New Prov®, lot no. 15314E, Pinhais, Paraná, Brazil).

Three slides were prepared per animal and a total of 4.000 polychromatic erythrocytes (PCEs) were counted using a fluorescence microscope (Olympus BH-2 10x100, Tokyo, Japan) to determine the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs). The genotoxic and antigenotoxic activity of CAB7β was established based on MNPCE frequency, while the cytotoxicity and anticytotoxicity of the compound were assessed according to the PCE/NCE ratio, analyzing a total of 2000 cells for the bone marrow of each animal.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Excel 2010 and BioStat software, version 6.2.2.0, and the results were expressed as mean ± standard deviation (SD). In order to analyze the genotoxic and antigenotoxic activity of CAB7β by micronucleus testing, the MNPCE frequency of the experimental groups was compared to the results obtained in the negative controls using one-way ANOVA followed by Tukey's test. The cytotoxicity and anticytotoxicity of CAB7β were assessed by comparing the frequencies of the PCE/NCE ratios of each group using the chi-squared test. Results were considered statistically significant for $p < 0.05$.

Results

The results of the mutagenic and antimutagenic analysis of CAB7β using the Ames test, in three independent experiments, are shown in Table 1. The values recorded in

the positive (4NQO for TA98 and sodium azide for TA100) and negative controls (DMSO) were consistent with the guidelines established by Maron and Ames (1983) and Mortelmans and Zeiger (2000).

In mutagenicity assessment using TA98, a reduction was observed in the means of the number of revertants treated with CAB7 β concentrations of 12.5 and 50 μg / plate. However, there was no significant difference between this result and that obtained for the negative control ($p > 0.05$). Only a concentration of 25 μg / plate showed a slight increase in the number of His⁺ revertants, but reached MI = 1.16 and showed no significant difference in relation to the negative control ($p > 0.05$). For all three CAB7 β concentrations tested in TA100, a decline was observed in the number of revertants in relation to the negative control; however, the results were not statistically significant when compared to each other ($p > 0.05$).

In antimutagenicity analysis, the groups co-treated with 4-NQO for TA98 exhibited a concentration-response effect, with significant reductions in the number of His⁺ revertants and IP values of 62,7%, 73,5% and 82,7% for 12.5, 25 and 50 μg / plate of CAB7 β , respectively. When compared to each other, the concentration of 50 μg / plate displayed the highest IP, with a statistically significant difference in relation to 12.5 μg / plate ($p < 0.05$). For TA100, all three CAB7 β concentrations (12.5, 25 and 50 μg / plate) also prompted significant reductions in the number of revertants in relation to the positive control ($p < 0.05$), with IPs of 48,5%, 47,4% and 47,4%, respectively. When compared, none of the concentrations showed a statistically significant difference ($p > 0.05$).

Table 1. Means \pm Standard Deviation (SD) of histidine revertant colonies (obtained from three independent experiments carried out in triplicate), mutagenic index (MI)⁴, and inhibition percentage (IP) of mutagenicity for two tester strains of *Salmonella typhimurium* (TA98 and TA100), after treatment with different doses of chalcone AB7 β (CAB7 β).

Treatments	Mutagenicity ³				Antimutagenicity ³			
	TA 98		TA 100		TA 98		TA 100	
	Means \pm SD	IM	Means \pm SD	IM	Means \pm SD	PI (%)	Means \pm SD	PI (%)
Negative control ¹	33.1 \pm 6.9 ^a	1	205.2 \pm 20.6 ^a	1	24.6 \pm 7.6 ^a	–	128.4 \pm 12.6 ^a	–
Positive control ²	886.3 \pm 174.9 ^b	28.1	5.400 \pm 91.8 ^b	26.3	840.5 \pm 106.5 ^b	–	4161.2 \pm 254.2 ^b	–
CAB7 β 12.5 μ g/plate	21 \pm 4.9 ^a	0.63	115.6 \pm 5.1 ^a	0.56	329 \pm 47.5 ^c	62.7	2208.8 \pm 29.5 ^c	48.5
CAB7 β 25 μ g/plate	38.7 \pm 11.16 ^a	1.16	118.4 \pm 4.9 ^a	0.57	241.6 \pm 34.7 ^{c,d}	73.5	2252 \pm 57.6 ^c	47.4
CAB7 β 50 μ g/plate	27.2 \pm 1.15 ^a	0.82	162.8 \pm 15.3 ^a	0.79	170.7 \pm 13.6 ^d	82.7	2252.4 \pm 44.3 ^c	47.4

¹Negative control: 10 μ l dimethylsulfoxide (DMSO).

²Positive control: 0.5 μ g 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)/plate for TA98 and 1.5 μ g sodium azide/plate for TA100.

All values are means \pm SD of three independent experiments.

³Statistical analysis: one-way ANOVA and the Tukey test.

⁴MI was calculated for each concentration tested of the CAB7 β , this being the average number of revertants per plate with the test compound divided by the average number of revertants per plate with the negative control.

^{a, b, c, d} Letters in common in the same column do not exhibit a significant difference ($p > 0.05$). Different letters in the same column exhibit significant a difference ($p < 0.05$).

Table 2 shows the results of MNPCE frequencies in the bone marrow of mice co-, pre-and post-treated with CAB7 β and DXR. As expected, the negative controls (DMSO) exhibited a relatively low mean MNPCE frequency in relation to the positive control group ($p < 0.05$). These data confirm the sensitivity of the micronucleus test.

In the co-treatment model, the group treated with CAB7 β alone (50 mg / kg) showed no effect on MNPCE frequency when compared to the negative controls ($p > 0.05$), indicating the absence of genotoxic activity. In all three groups co-treated with CAB7 β (12.5, 25 and 50 mg / kg) and DXR, there was a significant decrease in MNPCE frequency in relation to positive controls ($p > 0.05$). Of these three groups, the CAB7 β dose of 50 mg / kg showed the greatest capacity to mitigate the genetic damage caused by DXR ($p < 0.05$), presenting an MNPCE frequency similar to the negative control and CAB7 β alone ($p > 0.05$).

In pre-treatment, the MNPCE frequency percentage (per 4000 PCEs) in mice only treated with the highest CAB7 β dose (50 mg / kg) for five days was similar ($p > 0.05$) to that recorded in the group that received DMSO over a five-day period, with values of 0.21% and 0.11%, respectively. Additionally, the presence of MNPCEs at the three CAB7 β doses tested (12.5, 25 and 50 mg / kg) was similar in mice treated with CAB7 β alone (50 mg / kg) and negative controls ($p > 0.05$).

In post-treatment, animals treated twice with the different CAB7 β doses (12.5, 25 and 50 mg / kg) showed a significant decline ($p < 0.05$) in MNPCE frequency when compared to positive controls.

In this treatment model, of the three CAB7 β doses analyzed, 50 mg / kg displayed the largest reduction in MNPCE frequency, with a similar mean frequency to that observed in mice treated only with CAB7 β and negative control ($p < 0.05$). A comparison of the three treatment models used indicated that CAB7 β caused

significant declines ($p < 0.05$) in the number of MNPCEs in relation to positive controls, with the highest reductions recorded primarily in the pre-treatment groups, demonstrating the genoprotective property of this compound against the genotoxic effects of DXR. Additionally, the dose-response effect was observed in the three types of treatment.

Table 2. Assessment of genotoxic and antigenotoxic activity in different treatments of 4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one (CAB7 β) based on the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in mouse bone marrow.

Treatment (mg/Kg bw i.p.)	MNPCE/2000 PCE ³					
	Co - treatment (At 24 h)		Pre - treatment (At 5 days)		Post- treatment (At 24 h)	
	(Mean \pm SD)	%	(Mean \pm SD)	%	(Mean \pm SD)	%
Negative control ¹	3.7 \pm 0.4 ^a	0.1	4.4 \pm 0.6 ^a	0.11	3.7 \pm 0.4 ^a	0.09
Positive control ²	64 \pm 9.1 ^b	1.6	64 \pm 9.1 ^b	1.6	64 \pm 9.1 ^b	1.6
CAB7 β 50	11.5 \pm 2.3 ^{a,c}	0.28	8.7 \pm 1.9 ^a	0.21	11.5 \pm 2.3 ^{a,c}	0.28
CAB7 β 12.5 + DXR	30.6 \pm 3.8 ^d	0.76	9.5 \pm 2.3 ^a	0.23	29.3 \pm 2.9 ^d	0.73
CAB7 β 25 + DXR	26.1 \pm 2.7 ^{d,e}	0.65	8.7 \pm 1.6 ^a	0.21	28.7 \pm 2.4 ^d	0.71
CAB7 β 50 + DXR	14.9 \pm 3.4 ^{a,c,e}	0.37	8.3 \pm 0.6 ^a	0.2	11.4 \pm 1.3 ^{a,c}	0.28

¹ Negative control: dimethylsulfoxide (DMSO) applied (i.p.) in the proportion of 0.1 mL/10 g body weight (b.w.).

² Positive control: Doxorubicin (DXR) 5 mg/kg. All values are mean \pm SD of five mice.

³ Statistical analysis: one-way ANOVA and Tukey's test.

^{a, b, c, d} Same letters in in the same column show no significant difference ($p > 0.05$). Different letters in the same column exhibit a significant difference ($p < 0.05$).

The results of PCE/NCE ratios, an indicator of cytotoxicity, are shown in Table 3. The PCE/NCE ratio of the group treated only with a CAB7 β at its highest dose (50 mg / kg) was different to that observed in negative controls ($p < 0.05$), demonstrating presence of cytotoxic activity for CAB7 β . Groups co-treated with 12.5, 25 and 50 mg / kg of CAB7 β exhibited higher PCE/NCE ratios of 0.65, 0.71 and 0.75, respectively. These values show a statistically significant difference ($p < 0.05$) when compared to the PCE/NCE ratio recorded in the positive control group (0.47), suggesting anticytotoxic activity for CAB7 β before the cytotoxic action caused by DXR.

The PCE/NCE ratio in the group pre-treated for five days with only 50 mg / kg of CAB7 β was 0.70, different ($p < 0.05$) to that observed in the negative controls (0.90). The groups that received three CAB7 β doses (12.5, 25 and 50 mg / kg) obtained mean PCE/NCE ratios of 0.73, 0.85 and 0.84, respectively, which were higher than those recorded in positive controls, showing a significant difference ($p < 0.05$). Among the three doses administered, 25 and 50 mg / kg achieved the highest mean PCE/NCE ratio, similar to that in the negative control group ($p > 0.05$).

In the post-treatment model, there was an increase in the mean PCE/NCE ratios for groups treated twice with doses of 12.5, 25 and 50 mg / kg, which were 0.66, 0.72 and 0.74, respectively, exhibiting a significant difference when compared to positive controls ($p < 0.05$) and similarity to the mean PCE/NCE ratio obtained in the treated group with CAB7 β alone (50 mg / kg). As such, all the doses analyzed demonstrated anticytotoxic activity for CAB7 β against the cytotoxic effects of DXR in all three treatment models.

Table 3. Assessment of cytotoxic and anticytotoxic activity in different treatments of 4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one (CAB7 β) based on the ratio of polychromatic erythrocytes to normochromatic erythrocytes (PCE / NCE) of mouse bone marrow.

Treatment (mg/Kg bw i.p.)	PCE/NCE ³		
	Co - treatment (At 24 h) (Mean \pm SD)	Pre - treatment (At 5 days) (Mean \pm SD)	Post - treatment (At 24 h) (Mean \pm SD)
Negative control ¹	0.94 \pm 0.05 ^a	0.90 \pm 0.01 ^a	0.94 \pm 0.05 ^a
Positive control ²	0.47 \pm 0.05 ^b	0.47 \pm 0.05 ^b	0.47 \pm 0.05 ^b
CAB7 β 50	0.81 \pm 0.02 ^c	0.70 \pm 0.08 ^c	0.81 \pm 0.02 ^c
CAB7 β 12.5 + DXR	0.65 \pm 0.01 ^d	0.73 \pm 0.08 ^c	0.66 \pm 0.07 ^c
CAB7 β 25 + DXR	0.71 \pm 0.03 ^d	0.85 \pm 0.05 ^{a,c}	0.72 \pm 0.08 ^c
CAB7 β 50 + DXR	0.75 \pm 0.03 ^{c,d}	0.84 \pm 0.04 ^{a,d}	0.74 \pm 0.08 ^c

¹ Negative control: dimethylsulfoxide (DMSO) 0.1 mL/10 g body weight (b.w.).

² Positive control: Doxorubicin (DXR) 5 mg/kg. All values are mean \pm SD of five mice.

All values are mean \pm SD of five mice. ³ Statistical analysis: chi-squared (χ^2) test. Mean values followed by the same letter in the column show no significant difference at 5% probability.

^{a, b, c, d} Same letters in in the same column show no significant difference ($p > 0.05$). Different letters in the same column exhibit a significant difference ($p < 0.05$).

Discussion

Chalcones are compounds with a variety of pharmaceutical applications in the treatment of diseases. As such, this study aimed to assess the genotoxicity, cytotoxicity, antigenotoxicity and anticytotoxicity of CAB7 β using the micronucleus assay of mouse bone marrow and the Ames test. Both methods are recommended by international regulatory authorities and can determine the genetic risk of different types of substances (Kang et al., 2013).

In the Ames test, CAB7 β showed cytotoxic activity in strains T98 and TA100. Sashidhara et al. (2015) also observed strong toxic activity against *Staphylococcus aureus* in chalcone-thiazole hybrids. Our compound was able to protect DNA against the harmful effects of the mutagens 4-NQO and sodium azide. The results suggest that the greater decline in the number of His⁺ revertants at the higher CAB7 β concentrations (25 and 50 μg / plate) may be due to the possible toxic effect of this compound, evident in the reduction in His⁺ revertants (TA98 and TA100) in the mutagenic assessment.

Other chalcone, sulfonamide, N- {4- [3- (4-nitrophenyl) prop-2-enoyl] phenyl} benzenesulfonamide (CPN), at concentrations of 10 to 50 μg / plate, exhibited cytotoxicity and antimutagenicity in strains TA98 and TA100, with IP between 49 and 51% for TA98 and between 13 and 20% for the TA100 strain (Silva et al., 2015).

In our study, CAB7 β which differs structurally from CNP, interestingly presented IP between 62.7 and 82.7% for TA98 strain and between 47.4 and 48.5% for TA100. Our results demonstrate that this compound has greater effectiveness as to its antimutagenic action in relation to CPN, for example.

4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO) yields three major DNA adducts, namely N-(desoxyguanosine-8-yl)-4AQO, 3- (desoxyguanosine-N2-yl)-4AQO and 3-

(deoxyadenosine- N 6-yl) -4AQO, which can bind to DNA, particularly guanine residues, causing mutations (Kanojia and Vaidya, 2006; Brüsehafer et al., 2016). Sodium azide also generates reactive metabolites that can bind to DNA and cause mutations (Al-Qurainy and Khan, 2009).

Thus, as previously described, CAB7 β may have inhibited the oxidative effect of free radicals of 4NQO and sodium azide in the Ames test. The antigenotoxic and antimutagenic properties of CAB7 β observed in this study may also be attributed to the presence of the chloro functional group. Some chalcones containing the chloro radical exhibit significant antioxidant activity by inhibiting nitric oxide induced by RAW 264.7 macrophages and microglial cells (Lee et al., 2015).

The results of the micronucleus assay allowed us to infer that a 50 mg / kg dose of CAB7 β administered in 24 h and over 5 days showed no cytotoxic activity, since the PCE/NCE ratios for these periods exhibiting significant difference in relation to negative controls.

The micronucleus assay allowed the detection of cytotoxic effects through the PCE/NCE ratio. When the proliferation of bone marrow cells is affected by a toxic agent, the number of immature erythrocytes (PCEs) declines in relation to mature erythrocytes (NCEs), reducing the PCE/NCE ratio (Carneiro et al., 2016, Melo-Reis et al., 2011).

Indeed, Wu et al. (2011) found that synthetic chalcones displayed toxicity in different human cancer cell lines (HT29 and SGC7901). Vogel et al. (2010) reported that the synthetic chalcone 3'-coumaroyl-2',4,4'-trihydroxy-6'-methoxychalcone showed the highest cytotoxic activity against HeLa cells. De Vasconcelos et al. (2013) also detected the cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetylthiophene on human colon adenocarcinoma cells.

It is important to underscore that, in the present study, CAB7 β alone displayed cytotoxicity but no genotoxic activity in the micronucleus assay in mouse bone marrow. However, in the Ames test, all the concentrations studied showed moderate cytotoxicity and no mutagenicity, with the exception of 25 μ g/plate in *S. typhimurium* strain TA98, which displayed no cytotoxicity.

In general, cytotoxic substances are recommended in different therapies, especially when they cause no damage to the DNA of normal cells (Swift and Golsteyn, 2014), which was the case for CAB7 β in the present study. Lima et al. (2016) conducted a study with CAB7 β and found that the presence of chloro in the para (p) position, which exhibits less electron loss, in addition to the cyclohexene portion present in the compound, decreases its cytotoxic effect in some cell lines (SF-295, HCT-116 and OVCAR-8) when compared to chalcones containing a nitro fraction.

In our study, CAB7 β showed antigenotoxic activity in all the treatments used. The greatest inhibition of DXR-related genotoxic action occurred in the groups of mice pre-treated for 5 days with different doses of CAB7 β , exhibiting micronucleated cell (MN) frequencies similar to those of negative controls.

DXR is a chemotherapeutic agent belonging to an anthracycline class isolated from *Streptomyces peucetius*. DXR-related damage to genetic material can occur through oxidative stress, whereby the quinone structure of DXR is oxidized to the semiquinone radical, which reacts rapidly with oxygen, generating superoxide and hydrogen peroxide and damaging DNA (Meyers, 1998).

In this respect, the antigenotoxic activity of CAB7 β may be associated with the inhibition of oxidative stress caused by DXR. It is important to note that, according to scientific reports of in vitro and in vivo experiments, some chalcones show potential to inhibit oxidative stress (Padhye et al., 2009; Zhou et al., 2015; Zhong et al., 2015).

A study found that i.p, administration of Cl-chalcone (50 µg / kg) and F-chalcone (100 µg / kg) significantly increased antioxidant enzyme levels in mice (Annapurna et al., 2012).

Research shows that DXR can also interact with DNA, likely due to the formation of hydrogen bonds between DXR and guanine, forming DNA adducts. This induces cell death independently of topoisomerase II (Swift et al., 2006; Forrest et al., 2012). Additionally, DXR can intercalate with DNA, causing torsional stress and cell death (Yang et al., 2014).

As such, considering this in DXR, a noteworthy observation in our study was the ability of CAB7β to repair DNA damage in the post-treatment model. Exposing mice to CAB7β after DRX treatment caused a significant decline in the number of MNPCs and an increase in the PCE/NCE ratio. Thus, it can be inferred that CAB7β may inhibit DXR-DNA interaction, thereby preventing the formation of adducts and torsional stress. Research indicates that natural and synthetic chalcones show weak interaction with DNA and a low risk for mutagenicity (Abu et al., 2013; Zhang et al., 2013; Rozmer and Perjési, 2014). Some clinically useful anticancer agents exhibit genotoxicity due to their interaction with amine groups in nucleic acids; chalcones may be devoid of these side effects owing to their structural flexibility, resulting in significant chemopreventive activity (Das and Manna, 2016).

Conclusion

Thus, based on the results obtained, we concluded that CAB7β did not increase the number of His⁺ revertant colonies in strains TA98 and TA100 in the Ames test, therefore indicating no in vitro mutagenic activity. The CAB7β promoted a protective effect on bacterial DNA against the mutagenic action of 4-NQO and sodium azide.

The concentration of 50 μg / plate showed highest IP in TA98 strain. In TA100 strain, the three concentrations of CAB7 β (12.5, 25 and 50 μg / plate) also promoted significant reductions in the number of revertants in relation to the positive control. Moreover, the compound displayed no genotoxic activity in the micronucleus assay, thus exhibiting significant antigenotoxic and anticytotoxic effects in cells of mouse. In this treatment models used in the micronucleus assay, of the three CAB7 β doses analyzed, 50 mg / kg displayed the largest reduction in MNPCE frequency. We believe that CAB7 β is a promising candidate for chemoprevention or the development of new cancer treatments. However, further research is needed to better clarify the chemopreventive mechanisms of this compound through the DNA repair process.

Statement of Author Contributions

Susy Ricardo Lemes designed the study and wrote the manuscript; Nelson Jorge da Silva Junior reviewed the manuscript; Paulo Roberto de Melo Reis applied this study for Research Ethics Board approval; Rosa Silva Lima and Caridad Noda Perez conducted the CAB7 β synthesis; Carolina Ribeiro e Silva, Jefferson Holanda Vêras and Lee Chen Chen conducted the ames test and statistical analysis; Susy Ricardo Lemes and Maria Alice Montes de Sousa conducted the micronucleus test in the bone marrow of mice.

References

1. Abu N, Ho WY, Yeap SK, et al. (2013). The flavokawains: uprising medicinal chalcones. *Cancer Cell Int* 13, 102.

2. Al-Qurainy F, Khan S. (2009). Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement. *World Appl Sci J* 6: 1589–1601.
3. Annapurna A, Mudagal MP, Ansari A, et al. (2012). Cardioprotective activity of chalcones in ischemia/reperfusion-induced myocardial infarction in albino rats. *Exp Clin Cardiol* 17: 110–114.
4. Brüsehafer K, Manshian BB, Doherty AT, et al. (2016). The clastogenicity of 4NQO is cell-type dependent and linked to cytotoxicity, length of exposure and p53 proficiency. *Mutagenesis* 31: 171-180.
5. Carneiro CC, Santos CS, Lino-Júnior RS, et al. (2016). Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. *Toxicol Appl Pharmacol* 310: 1-8.
6. Das M, Manna K. (2016). Chalcone Scaffold in Anticancer Armamentarium: A Molecular Insight. *J Toxicol* 2016:7651047.
7. De Vasconcelos A, Campos VF, Nedel F, et al. (2013). Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetylthiophene on human colon adenocarcinoma cells. *Cell Biochem Funct* 31: 289–297.
8. Eichenberger M, Lehka BJ, Folly C, et al. (2017). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for *de novo* production of dihydrochalcones with known antioxidant, antidiabetic, and sweet tasting properties. *Metab Eng* 39: 80-89.
9. Forrest RA, Swift LP, Rephaeli A, et al. (2012). Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochem Pharmacol* 83: 1602–1612.
10. Gupta D, Jain DK. (2015). Chalcone derivatives as potential antifungal agents: Synthesis, and antifungal activity. *J Adv Pharm Tech Res* 6: 114–117.

11. Hayashi M. (2016). The micronucleus test-most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes Environment* 38(18).
12. Jantan I, Bukhari SNA, Adekoya OA, et al. (2014). Studies of synthetic chalcone derivatives as potential inhibitors of secretory phospholipase A₂, cyclooxygenases, lipoxygenase and pro-inflammatory cytokines. *Drug Des Dev Ther* 8: 1405–1418.
13. Kang SH, Kwon JY, Lee JK, et al. (2013). Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. *J Cancer Prev* 18: 277–288.
14. Kanojia D, Vaidya MM. (2006). 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol* 42: 655–667.
15. Lee JS, Bukhari SNA, Fauzi NM. (2015). Effects of chalcone derivatives on players of the immune system. *Drug Des Dev Ther* 9:4761-4778.
16. Lemes SR, Chaves DA, Silva-Júnior NJ, et al. (2017). Antigenotoxicity protection of *Carapa guianensis* oil against mitomycin C and cyclophosphamide in mouse bone marrow. *An Acad Bras Cienc Epub* June 29.
17. Lima DC da S, do Vale CR, Véras JH, et al. (2017). Absence of genotoxic effects of the chalcone (*E*)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)-prop-2-en-1-one and its potential chemoprevention against DNA damage using *in vitro* and *in vivo* assays. *PLoS One* 12: e0171224.
18. Lima RS, Perez CN, da Silva CC, et al. (2016). Structure and cytotoxic activity of terpenoid-like chalcones. *Arab J Chem* 1-12.
19. Ma QG, Li T, Wei RR, et al. (2016). Characterization of Chalcones from *Medicago sativa* L. and Their Hypolipidemic and Antiangiogenic Activities. *J Agric Food Chem* 64: 8138-8145.

20. Mai CW, Yaeghoobi M, Abd-Rahman N, et al. (2014). Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. *Eur J Med Chem* 77: 378-87.
21. Maron DM, Ames BN. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173–215.
22. Melo-Reis PR, Bezerra LSA, Vale MAAB, et al. (2011). Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. *Braz J Biol* 71: 169-174.
23. Mortelmans K, Zeiger E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 455: 29–60.
24. Myers C. (1998). The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* 25: 10–14.
25. Narayan BH, Tatewaki N, Giridharan VV, et al. (2010). Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by squalene in Balb/cmice. *Food Funct* 1: 174–179.
26. Padhye S, Ahmad A, Oswal N, et al. (2009). Emerging role of Garcinol, the antioxidant chalcone from *Garcinia indica* Choisy and its synthetic analogs. *J Hematol Oncol* 2: 38.
27. Qu Q, Dai B, Yang B, et al. (2014). Gastric cytoprotective anti-ulcerogenic actions of hydroxychalcones in rats. *Biomed Res Int* 2014: 1–5.
28. Ribeiro LR. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. *In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. (2003). Mutagênese ambiental. Canoas: Ed. ULBRA, cap.7, p.173-200.*
29. Rozmer Z, Perjési P. (2016). Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochem Rev* 15: 87.

30. Sashidhara KV, Rao KB, Kushwaha P, et al. (2015). Novel Chalcone–Thiazole Hybrids as Potent Inhibitors of Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. ACS Med Chem Lett 6: 809–813.
31. Sghaier MB, Bhourri W, Bouhlel I, et al. (2011). Inhibitory effect of *Teucrium ramosissimum* extracts on aflatoxin B1, benzo[a]pyrene, 4-nitro-o-phenylenediamine and sodium azide induced mutagenicity: Correlation with antioxidant activity. South African J Bot 77: 730–40.
32. Siddiqui MS, Thodey K, Trenchard I, et al. (2012). Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. FEMS Yeast Res 12: 144–170.
33. Silva CR, Borges FFV, Bernardes A, et al. (2015). Genotoxic, cytotoxic, antigenotoxic, and anticytotoxic effects of sulfonamide chalcone using the Ames test and the mouse bone marrow micronucleus test. Plos One 10: e0137063.
34. Swift LH, Golsteyn RM. (2014). Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. Int J Mol Sci 15: 3403-3431.
35. Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, et al. (2006). Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. Cancer Res 66: 4863–4871.
36. Vogel S, Barbic M, Jürgenliemk G, et al. (2010). Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. Eur J Med Chem 45: 2206-2213.
37. Von Ledebur M, Schmid W. (1973). The micronucleus test methodological aspects. Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen 19: 109–17.

38. Wilson SA, Roberts SC. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J* 10: 249–268.
39. Wu J, Wang C, Cai Y, Peng J, et al. (2012). Synthesis and crystal structure of chalcones as well as on cytotoxicity and antibacterial properties. *Med Chem Res* 21: 444-452.
40. Yamamoto K, Kakegawa H, Ueda H. et al. (1992). Gastric cytoprotective anti-ulcerogenic actions of hydroxychalcones in rats. *Planta med* 58: 389–393.
41. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, et al. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1845: 84-89.
42. Zhang EH, Wang RF, Guo SZ, et al. (2013). An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:22.
43. Zhong P, Wu L, Qian Y, et al. (2015). Blockage of ROS and NF- κ B-mediated inflammation by a new chalcone L6H9 protects cardiomyocytes from hyperglycemia-induced injuries. *Biochim Biophys Acta* 1852: 1230–1241.
44. Zhou M, Liu L, Wang W, et al. (2015). Role of licochalcone C in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury of isolated rat heart via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities. *Life Sci* 132: 27–33.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Considerando os objetivos propostos e os resultados obtidos no presente estudo, concluiu-se que:

- Utilizando o modelo MCA em ovos embrionados de galinha, a CAB7 β quando administrada sozinha exibiu atividade antiangiogênica e redução de elementos inflamatórios nas MCAs, demonstrando valores inferiores aos detectados no grupo controle inibidor de angiogênese (Dexametasona).
- As células tumorais do Sarcoma S180 foram capazes de induzir o crescimento dos vasos sanguíneos, bem como a presença de elementos inflamatórios;
- A CAB7 β exibiu atividade antiangiogênica e redução de elementos inflamatórios quando associada às células S180, com a maior atividade detectada na dose mais alta (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).
- CAB7 β não induziu mutações de substituição nos pares de base e “frameshift” (mudança no quadro de leitura) nas cepas de TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, pelo teste de Ames.
- As doses de 12,5 e 50 $\mu\text{g}/\text{placa}$ da CAB7 β apresentaram um moderado perfil citotóxico na cepa TA98, porém os valores não foram estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo ($p > 0,05$).
- Ainda no teste de Ames, a CAB7 β promoveu um efeito protetor o DNA bacteriano diante da ação mutagênica da 4-NQO e azida sódica.
- No teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos, a CAB7 β não exibiu efeito mutagênico em nenhuma das doses testadas, tanto nos modelos de co, pré e pós-tratamento. Porém foi detectado um perfil citotóxico deste composto em sua maior dose (50 mg/Kg p.c.) em todos os três modelos de tratamento utilizados.
- As três doses utilizadas (12,5, 25 e 50 mg/Kg p.c.) no ensaio do micronúcleo apresentaram efeito anticitotóxico no modelos de co, pré e pós-tratamento em células da medula óssea de camundongos diante da citotoxicidade causada pelo controle positivo (Doxorrubicina – 5mg/Kg p.c.).

- Em todas as doses da CAB7 β testadas no co, pré, e pós-tratamento com a doxorrubicina houve redução significativa na frequência de MN induzida por esse agente de alquilação no DNA.
- No pré-tratamento a dose de 50 mg/Kg p.c. da CAB7 β exibiu a maior proteção contra danos no DNA induzidos pela doxorrubicina no presente estudo, demonstrando que este composto possui alta capacidade de indução no reparo do DNA.
- No método de espectroscopia de absorção UV/Vis, a absorção da CAB7 β se encontrou na região do UVA, de 250 a 400 nm, com a presença de um pico intenso bem definido centrado em 328 nm e um coeficiente de absorção molar $> 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- Na identificação da conformação de menor energia da CAB7 β em fase gasosa e em solução de DMSO através da análise de geometrias moleculares, este composto demonstrou uma intensa absorção na região do UVA, a qual está associada a uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ entre os orbitais HOMO – LUMO, com uma transferência intramolecular de carga do anel trimetilciclohexen-1-il para o anel clorofenil, indicando que esta região da molecular possui maior reatividade e pode estar associada as propriedades biológicas da CAB7 β .

Os resultados deste estudo demonstraram, portanto, a versatilidade da CAB7 β . A atividade antiangiogênica da CAB7 β aponta que este composto pode ser um alvo promissor para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer, especialmente contra o sarcoma, devido ao seu potencial antiangiogênico, causado pela inibição do crescimento de novos vasos sanguíneos, e por seus significativos efeitos antimutagênico e anticitotóxicos possivelmente associados a sua estrutura química.

Além disso, a eficiência da CAB7 β na redução dos elementos inflamatórios também sugere sua aplicação como composto antiangiogênico na terapia antineoplásica. Entretanto, novos estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação antiangiogênica, citotóxica e quimiopreventiva da CAB7 β .

Pela análise espectroscópica empregada nesta pesquisa, o espectro de absorção molar obtido pela CAB7 β indica o potencial desta substância para o desenvolvimento de filtros fotoprotetores. Além disso, a absorção de dois fótons da CAB7 β infere que esse composto pode ser considerado um candidato promissor para terapia fotodinâmica via absorção de um e dois fótons.

ANEXOS

Anexo I. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUC – GO



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da atividade mutagênica e antimutagênica da Bischalcona ab7beta sintética", protocolada sob o CEUA nº 2831100316, sob a responsabilidade de Susy Ricardo Lemes Pontes - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEUA/PUC GOIÁS) na reunião de 20/09/2016.

We certify that the proposal "Assessment of the mutagenic activity and antimutagenic of Bischalcone ab7 synthetic beta", utilizing 70 Isogenic mice (males and females), protocol number CEUA 2831100316, under the responsibility of Susy Ricardo Lemes Pontes - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Pontifical Catholic University of Goiás (CEUA/PUC GOIÁS) in the meeting of 20/09/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2016** a **07/2016**

Área: **Genética**

Origem: **Biotério central**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **45 a 60 dias**

N: **70**

Linhagem: **Mus musculus/Swiss Webster**

Peso: **30 a 40 g**

Resumo: Inúmeras substâncias foram descritas como mutagênicas e carcinogênicas. Dentre elas estão as hidrazinas, flavonoides, furocumarinas, quinonas, alcaloides de pirrolozidina, glicosídeos cardiotônicos e teobrominas (MEI et al., 2005; VARANDA, 2006). Mesmo contendo propriedades farmacológicas, muitas plantas podem apresentar compostos que promovem alterações no DNA (VARANDA, 2006). Grande parte dos compostos mutagênicos e carcinogênicos tem relação na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) as quais apresentam importante papel em processos degenerativos, lesões no DNA, mutações ligadas ou não ao câncer, problemas cardíacos e envelhecimento (AMES, 1983; ANDERSON et al., 1995). Por outro lado, existem substâncias antimutagênicas que atuam diretamente sobre os compostos mutagênicos, inativando-os de forma química ou enzimática e impedindo a ativação metabólica de pró-mutagênicos ou mesmo capturando moléculas reativas. Também, há elementos antimutagênicos que agem sobre o processo indutor de mutação, ou no reparo de lesões ocorridas no DNA (ANTUNES & ARAÚJO, 2000). As principais substâncias vegetais de propriedades antimutagênicas descritas na literatura incluem os flavonoides, carotenoides (Vitamina A), licopeno, ácido ascórbico (Vitamina C), ácido eláico, o tocoferol (Vitamina E), polifenóis, compostos sulfídricos, cálcio, fibras, etc. (MALIK et al., 2005; FAGUNDES, 2012; MARCHIORI et al., 2013). Os compostos vegetais responsáveis pela promoção do efeito de mutagenicidade, além de inúmeras outras atividades biológicas, são denominados metabólitos secundários e são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas além de favorecerem a sobrevivência e continuidade da espécie vegetal dentro do ecossistema através dos mecanismos de defesa. Vale ressaltar que os compostos vegetais primários (lipídios, proteínas, carboidratos, nucleotídeos e aminoácidos) são fundamentais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das células (FURLAN, 1999). O desenvolvimento de novas moléculas e o estudo de seus potenciais farmacológicos representa o início para o desenvolvimento de novas terapias. Através da síntese química, os compostos naturais podem ser melhorados e tal melhoramento permite que os compostos sintéticos consigam apresentar um maior efeito desejado em doses reduzidas quando comparados aos compostos naturais, além de não sofrerem, por vezes uma rápida metabolização. Uma importante classe de metabólitos secundários que tem ganhado destaque em estudos científicos é o grupo das chalconas. Trata-se de cetonas α,β -insaturadas, que possuem um núcleo 1,3-diarilprop-2-en-1-ona₂₁ e um esqueleto C6-C3-C6. Esta estrutura é considerada privilegiada na criação de fármacos. As chalconas são precursoras da biossíntese de flavonoides e são amplamente encontradas nos vegetais (DIMMOCK et al., 1999; ZUANAZZI, 2002). Estudos apontam que as chalconas apresentam inúmeras atividades farmacológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, citotóxica, anticâncer, anti-VIH, e antinociceptiva. Além disso, pesquisas revelam que os derivados de chalcona possuem propriedades anti-inflamatórias inibindo a ação da fosfolipase A2, ciclo-oxigenase (COX), lipoxigenases, produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiotaxia de neutrófilos, fagocitose e produção de espécies



Comissão de Ética no Uso de Animais

reativas de oxigênio (ROS). A ação das chalconas e seus derivados têm proporcionado novas perspectivas para estudos posteriores destes compostos visando à descoberta de potenciais agentes contra condições patológicas associadas com doenças imunes, por exemplo (MOHAMAD et al., 2010; ABDULA, 2013; KIM, 2013; RIZVI et al., 2014). Diante do exposto, este estudo visa investigar as potenciais atividade mutagênica e antimutagênica de uma chalcona sintética denominada bischalcona AB7beta, através dos ensaios do micronúcleo e Ames.


Local do experimento: Laboratório de Experimentos Biotecnológicos da Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Goiânia, 27 de setembro de 2016.

Profa. Dra. Marta Regina Magalhães
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profa. Dra. Graziela Torres Blanch
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Anexo II. Comprovante de aceite do manuscrito 1

Your Submission SAA-D-17-02988R2  Entrada x



Spectrochimica Acta Part A <eesserver@eesmail.elsevier.com>

26 de jun ☆



para mim ▾



inglês ▾



português ▾

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês](#) x

Ms. Ref. No.: SAA-D-17-02988R2

Title: Optical properties of a chalcone derivate and its antiangiogenic activity in an in vivo system using the sarcoma 180 cell line
Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

Dear Mrs. Susy Ricardo Lemes,

I am pleased to confirm that your paper "Optical properties of a chalcone derivate and its antiangiogenic activity in an in vivo system using the sarcoma 180 cell line" has been accepted for publication in Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Joel M. Bowman, Ph.D.

Editor

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

Comments from the Editors and Reviewers:

Anexo III. Comprovante de aceite do manuscrito 2

Drug and Chemical Toxicology - Decision on Manuscript ID LDCT-2017-0319.R2

Entrada x



Drug and Chemical Toxicology

para mim ▾

22 de jun ☆



inglês ▾

> português ▾

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês](#) x

22-Jun-2018

Dear Mrs Lemes:

Ref: Presence of antigenotoxic and anticytotoxic effects of the chalcone 1E,4E-1-(4-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one using in vitro and in vivo assays

Our reviewers have now considered your paper and are pleased to accept your paper in its current form for publication in the Drug and Chemical Toxicology subject to an originality check using the Crossref Similarity Check™ software. Once the originality check is complete, the paper will be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter, along with those of the editor who coordinated the review of your paper.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to Drug and Chemical Toxicology and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,
Dr Marc Williams
Editor in Chief, Drug and Chemical Toxicology
Baltimore, Maryland, United States
mawilliams888@aol.com

Reviewer(s)' Comments to Author: