



UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

TALINE CANTO TRISTÃO

**TRIAGEM PARA A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E POTENCIAL
TÓXICO DE UMA NOVA SÉRIE DE CHALCONAS SINTÉTICAS E
SEUS DERIVADOS ANÁLOGOS**

Maio – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

T738t Tristão, Taline Canto, 1984-
Triagem para atividade antimicrobiana e potencial tóxico de uma nova série de chalconas sintéticas e seus derivados analógicos [manuscrito] / Taline Canto Tristão. – 2008.
76 f.: il. Color.

Cópia de computador (Printout(s)).
Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí, Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, 2008.
“Orientador: Profº. Drº. Alexandre Bella Cruz ”.
Bibliografia: f. 68-76.

1. Chalconas. 2. Bactérias. 3. Agentes anti-infecciosos. 4. Fungos. I. Cruz, Alexandre Bella. II.

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

TALINE CANTO TRISTÃO

TRIAGEM PARA A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E POTENCIAL
TÓXICO DE UMA NOVA SÉRIE DE CHALCONAS SINTÉTICAS E
SEUS DERIVADOS ANÁLOGOS

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz

TRIAGEM PARA A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E POTENCIAL TÓXICO DE UMA NOVA SÉRIE DE CHALCONAS SINTÉTICAS E SEUS DERIVADOS ANÁLOGOS

Taline Canto Tristão

‘Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.’

Dr. Alexandre Bella Cruz
Orientador

Dr^a. Tania Mari Bellé Bresolin
Coordenadora do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Dr. Alexandre Bella Cruz
Presidente

Dr^a. Márcia Maria de Souza
Membro Interno

Dr. Ricardo José Nunes
Membro Externo

Itajaí (SC), Maio, 2008.

*Àqueles que esperaram meu nascimento
com entusiasmo, que me educaram, me ensinaram
e que lutaram para que eu hoje fosse quem sou.
Aos meus pais Vilmar e Edna.*

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por todas as dádivas alcançadas durante o transcorrer de minha vida e por mais este grande sonho realizado. “Obrigado senhor, porque nunca me desamparastes”.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz

Meus agradecimentos por ter acreditado na minha capacidade. Pelos valiosos conhecimentos a mim repassados e pelos períodos de sua atenção a mim dedicados.

A Prof^a. MSc. Rosana Cé Bella Cruz

Minha gratidão pelos ricos ensinamentos passados na prática laboratorial e pela amizade constante durante todo o caminho percorrido.

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

Que colaborou com esse trabalho, permitindo entrar na rotina de seu laboratório, disponibilizando colaboradores e materiais essenciais para a realização de parte importante dessa conquista.

Ao Prof. Dr. Clóvis Antônio Rodrigues

Por disponibilizar os equipamentos de seu laboratório, permitindo que etapas importantes desse trabalho fossem realizadas.

A Prof^a. Dr^a. Márcia Maria de Souza

Que participou da banca interna, sempre fazendo valiosas sugestões para a concretização desse estudo.

A Prof^a. Dr^a. Fátima de Campos Buzzi

Que sempre me recebeu com muita paciência, dando importantes sugestões. Pelo carinho sempre visível.

Aos meus pais Vilmar e Edna

Por guiarem os primeiros passos da minha vida com honra e dignidade; por terem

me ensinado a lutar com todo vigor pelos meus objetivos. E principalmente por lutarem para que este meu sonho se tornasse real tanto quanto o amor que senti por mim. “Amo vocês com todas as minhas forças”

À minha irmã Taciane pela amizade, pelo entusiasmo e o amor incondicional.

A meu grande amor

Que soube ter paciência e esperar a coroação deste momento, compreendendo os vários momentos de convívio que lhe roubei; sempre me oferecendo um ombro carinhoso e comemorando comigo a vitória de cada barreira ultrapassada. “Te amo”

Aos amigos

Às minhas colegas e amigas do mestrado Fernanda Mahle, Franciele Goelzer, Nadir Vier, Silvana Felício e Tânia Rosa, companheiras de caminhada, pelo apoio constante e incondicional.

Eu independentemente de onde for sempre levarei um pouco de cada uma que de sua forma soube me ajudar a atingir meus objetivos, me aceitando do jeito que sou. Minha sincera gratidão a uma das pessoas que mais colaborou para essa conquista.

À minha grande amiga Fernanda Mahle, que esteve presente em todas as etapas desse trabalho, sempre participando diretamente da cada técnica realizada. Eu sem dúvida nenhuma mereci meus inimigos, mas não acredito que tenha merecido essa minha amiga.

*“Valeu a pena?
Tudo vale a pena se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador,
tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
mas nele é que se espelhou o céu.”
Fernando Pessoa.*

TRIAGEM PARA A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E POTENCIAL TÓXICO DE UMA NOVA SÉRIE DE CHALCONAS SINTÉTICAS E SEUS DERIVADOS ANÁLOGOS

Taline Canto Tristão

Maio de 2008

Orientador: Alexandre Bella Cruz (Dr.)

Área de Concentração: Produtos Naturais e Outras Substâncias Bioativas

Números de páginas: 75

RESUMO

A resistência microbiana é atualmente considerada uma grande preocupação de saúde pública em nível global. Embora exista quantidade considerável de antimicrobianos disponíveis para uso na clínica, grande parte deles apresenta semelhante modo ação, fato que contribui para o surgimento e aumento de resistência. Neste contexto, algumas substâncias com estrutura básica de chalconas têm mostrado promissor potencial em inibir o crescimento de bactérias e fungos. No presente estudo foi realizada uma triagem para a atividade antimicrobiana e potencial tóxico de uma nova série de chalconas e seus derivados análogos ($n=23$). A atividade antibacteriana e antifúngica foi avaliada através do método da diluição em ágar. A avaliação da citotoxicidade foi realizada sobre o microcrustáceo *Artemia salina* Leach, *Saccharomyces cerevisiae* e células de fibroblastos L929 e a genotoxicidade sobre *Salmonella typhimurium* (teste Ames). Os resultados dos ensaios mostraram que algumas das chalconas testadas apresentaram atividade sobre os fungos dermatófitos *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* com concentração inibitória mínima (CIM) que variou entre 62 e 248 μM , destacando-se a chalcona **10** (*N*-{4-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enoil]fenil}acetamida) que apresentou maior potencial de atividade antifúngica sobre três dos dermatófitos com CIM equivalente a 75 μM . Nenhuma das substâncias testadas mostrou atividade contra as bactérias e fungos leveduriformes até a concentração máxima testada (250 μM). O teste de toxicidade sobre *Artemia salina*, mostrou que seis chalconas foram consideradas citotóxicas com concentração letal variando entre CL_{50} 31,25 e 98,28 $\mu\text{g/mL}$ (**1**, **2**, **3**, **8**, **9** e **10**). Na avaliação de citotoxicidade sobre *S. cerevisiae*, foi verificado que os análogos **14** e **18** apresentaram potencial citotóxico a 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, enquanto que sobre as células L929, nenhuma das chalconas e seus análogos foi citotóxica, bem como não apresentaram atividade mutagênica no teste de Ames.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, potencial tóxico, chalconas

SCREENING FOR ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND TOXICITY POTENTIAL OF A NEW SERIES OF CHALCONE SYNTHETIC AND ANALOGUES DERIVATIVES

Taline Canto Tristão

May, 2008

Supervisor: Prof. Alexandre Bella Cruz (Dr.)

Area: Microbiology

Number of pages: 75

ABSTRACT

The microbial resistance currently is considered a great concern of public health in global level. Although considerable amount of available antimicrobials for use in the clinic exists, great part of them presents same mode of action, fact that contributes for the spreading and increase of resistance. In this context, some compounds with basic structure of chalcone have shown promising potential in inhibiting the growth of bacteria and fungi. In the present study a selection for the antimicrobial activity was carried through and potential toxic of a new series of chalcone and its analogous derivatives ($n=23$). The antibacterial and antifungal activity was evaluated by agar dilution method. The cytotoxicity was evaluated carried out on the brine shrimp *Artemia salina* Leach, *Saccharomyces cerevisiae* and cells of fibroblasts L929, and the genotoxicity on *Salmonella typhimurium* (Ames test). The results showed that some chalcone presented antifungal activity against dermatophytes *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* with minimal inhibitory concentration (MIC) that it ranged between 62 and 248 μM , being distinguished it chalcone **10** (*N*{4-[(2*E*)-3-phenylprop-2-enoyl] phenyl} acetamide) that presented potential antifungal activity against three dermatophytes with MIC 75 μM equivalent. None of the tested compounds showed activity against bacteria and yeast at doses lower than 250 μM . The brine shrimp test showed that six chalcone were considered cytotoxic with lethal concentration ranging between LC_{50} 31,25 and 98,28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**1**, **2**, **3**, **8**, **9** and **10**). Through the *S. cerevisiae*, it was verified that chalcone analogous **14** and **18** presented cytotoxic potential with 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, whereas on the cells L929, none of chalcone and its analogous ones was cytotoxic, as well as was not presented mutagenic activity in the Ames test.

Key-word: Antimicrobial activity, potential toxic, chalcone.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral das chalconas	19
Figura 2: Estrutura das chalconas (a) licochalcona A e (b) licochalcona C	21
Figura 3: Chalconas isoladas da planta <i>Dalea versicolor</i>	23
Figura 4: Crotmadine, chalcona extraída das folhas e caules de <i>Crotalaria madurensis</i>	25
Figura 5: Estruturas das isobavachalconas	26
Figura 6: Estrutura da chalcona 64	27
Figura 7: Estruturas de algumas chalconas	28
Figura 8: Sítios de ação dos diferentes agentes antimicrobianos	32
Figura 9: Sítios de ação dos diferentes agentes antifúngicos	34
Figura 10: Processo ilustrativo da avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	45
Figura 11: Processo de ativação da levedura e preparação do inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
Figura 12: Processo da avaliação da citotoxicidade através da taxa de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
Figura 13: Procedimento de comprovação da pureza e carência de histidina pelas linhagens TA 97, TA 98 e TA 100 de <i>Salmonella typhimurium</i>	59
Figura 14: Processo da avaliação do índice de mutagenicidade (IM) pelo Teste Ames	52
Figura 15: Representação da estruturas químicas das chalconas com atividade citotóxica sobre <i>Artemia salina</i>	61
Figura 16: Relação da proliferação celular em UFC da levedura <i>S. cerevisiae</i> com as chalconas 14 e 18 a 1000 µg/mL, em função do tempo de exposição ..	62
Figura 17: Relação da proliferação celular em UFC da levedura <i>S. cerevisiae</i> com as chalconas 14 e 18 a 500 µg/mL, em função do tempo de exposição	62
Figura 18: Avaliação da viabilidade celular de das chalconas em células L929 após 2 horas de contato com as chalconas na concentração de 100 µg/mL em estufa 37 °C/5 % CO ₂	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Relação das chalconas sintéticas divididas por grupos químicos	38
Tabela 2: Relação dos meios e soluções utilizadas nos ensaios realizados neste estudo	40
Tabela 3: Valores de CIM e CFM para fungos filamentosos	58
Tabela 4: Valores de CL50 das chalconas frente à <i>Artemia salina</i>	60
Tabela 5: Análise estatística do Teste de Ames na avaliação do potencial de indução mutagênica sob diferentes linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- CBM - Concentração Bactericida Mínima
- CFM - Concentração Fungicida Mínima
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CL₅₀ - Concentração Letal de 50% de uma população
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- IM - Índice de Mutagenicidade
- MEM - Minimal Essecial Medium
- MRSA - *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente
- NCCLS - National Comittee for Clinical Laboratory Standards
- NIQFAR - Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas
- PBS - Tampão fosfato (Phosphate Buffered Saline)
- RNA - Ácido ribonucleico
- RNA_m - RNA mensageiro
- SFB - Soro Fetal Bovino
- UFC - Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
3 EMBASAMENTO TEÓRICO	19
3.1 Chalconas	19
3.1.1 Origem das chalconas	19
3.1.2 Atividade biológica	19
3.1.2.1 Propriedades antibacterianas	20
3.1.2.2 Propriedades antifúngicas	25
3.2 Controle Microbiano	29
3.2.1 Mecanismo de Ação dos Agentes Antibacterianos	30
3.2.2 Mecanismo de Ação dos Agentes Antifúngicos	33
3.3 Resistência Microbiana	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Material Biológico	37
4.2 Material Químico	37
4.3 Meios de cultura e soluções	39
4.4 Manutenção dos Micro-organismos	39
4.5 Manutenção das Células L929	39
4.6 Preparação do Inóculos	42
4.6.1 Bactérias	42
4.6.2 Fungos Leveduriformes	42
4.6.3 Fungos Filamentosos	43
4.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	43
4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	43
4.7.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Fungicida Mínima (CFM)	44
4.8 Avaliação da Toxicidade	45
4.8.1 Teste de citotoxicidade contra <i>Artemia salina</i>	45
4.8.2 Teste de citotoxicidade contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
4.8.3 Citotoxicidade através viabilidade celular das células L929	47
4.8.4 Teste de Genotoxicidade – Teste Ames	49
4.8.4.1 Análise estatística	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Triagem para Atividade Antibacteriana	53
5.2 Triagem para Atividade Antifúngica	55
5.3 Avaliação da Toxicidade	59

5.3.1 Teste de toxicidade através <i>Artemia salina</i>	59
5.3.2 Teste de citotoxicidade através da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
5.3.3 Citotoxicidade através da viabilidade das células L929	63
5.3.4 Teste Ames	64
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

O aumento das Infecções bacterianas e principalmente fúngicas devido ao crescimento da população de imunodeprimidos, indivíduos infectados com o HIV, pacientes transplantados e pacientes com câncer, associado ao desenvolvimento e expansão da resistência a curto período aos antimicrobianos utilizadas na clínica, compõem atualmente uma grande preocupação de saúde pública em nível global (GILBERT, MCBAIN, 2003; KARLOWSKY et al., 2006; BATOVSKA et al., 2007).

Os processos de resistência desenvolvida por tais seres pelos medicamentos é bastante grave uma vez que tornou-se freqüente e não restrita à apenas a alguns antimicrobianos específicos, mas quando atingiu outras substâncias de várias classes empregadas na medicina (NIELSEN et al., 2004; TEW et al., 2006).

Embora exista uma quantidade considerável de antimicrobianos disponíveis no mercado, eles são produzidos a partir de poucas substâncias distintas, que possuem semelhante mecanismo de ação, fato este que contribui para o aparecimento de mecanismos de resistência. Além disso, existem muitas dificuldades em desenvolver um novo e eficaz medicamento. Um dos problemas são as múltiplas barreiras celulares que dificultam o reconhecimento por parte do Biocida. Alguns tipos de resistência possuem características próprias que favorecem um reconhecimento restrito através de modificações na parede celular ou mecanismos de efluxo de substâncias estranhas à célula (SOUZA et al., 2003; RAJARAO; NEKHOTIAEVA; GOOD, 2003).

Outra dificuldade são as semelhanças estruturais celulares entre o hospedeiro e o patógeno. Para ser eficaz, um novo fármaco necessita possuir uma grande especificidade para o micro-organismo, pois o antimicrobiano ideal é aquele que atinge o sítio da infecção em concentração suficiente para inibir ou eliminar o agente patógeno com toxicidade mínima ao hospedeiro (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; RAJARAO; NEKHOTIAEVA; GOOD, 2003).

Também a pesquisa e o desenvolvimento de um novo medicamento é um processo longo e dispendioso, que pode chegar 12 a 15 anos. Apenas 0,1 % das moléculas, sintetizadas ou obtidas a partir de plantas e animais, chegam ao mercado farmacêutico (SOUZA et al., 2003; RAJARAO; NEKHOTIAEVA; GOOD, 2003).

Antimicrobianos de classes diversificadas são necessários para dificultar os

mecanismos de resistência, como também diminuir os efeitos colaterais dos medicamentos convencionais e aumentar a eficácia farmacológica (RAJARAO; NEKHOTIAEVA; GOOD, 2003; NIELSEN et al., 2004; NOWAKOWSKA, 2007).

Neste contexto, substâncias com estrutura básica de chalconas, isoladas de plantas ou produzidas sinteticamente, têm se mostrado um interessante e promissor potencial com alvos farmacológicos em inibir o crescimento de micro-organismos como bactérias e fungos (NIELSEN et al., 2004; SHAHARYAR et al., 2006).

No presente trabalho, foram analisadas as atividades antibacteriana e antifúngica, analisadas as atividades citotóxica e genotóxica das amino-chalconas e análogos, acetamido-chalconas e análogos e nitro-chalconas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Determinar a atividade antimicrobiana e o potencial tóxico através de um processo de triagem de uma nova série chalconas sintéticas e seus derivados análogos.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória (CIM) Bactericida (CBM) e Fungicida (CFM) Mínima das chalconas sintéticas e seus derivados análogos através do método de diluição em ágar;
- Analisar o potencial citotóxico das chalconas sintéticas e seus derivados análogos por meio do teste de toxicidade em *Artemia salina* Leach, pelo método de toxicidade em *Saccharomyces cerevisiae* e pelo método de toxicidade em células de fibroblastos L929;
- Analisar o potencial genotóxico das chalconas sintéticas e seus derivados análogos através do teste Ames.

3 EMBASAMENTO TEÓRICO

3.1 Chalconas

3.1.1 Origem das chalconas

Chalconas constituem uma das maiores classes de produtos naturais, sendo encontradas em plantas rasteiras e superiores, frutos, folhas e raízes, pois são substâncias precursoras intermediárias da rota biossintética de flavonóides (NOWAKOWSKA; WYRZYKIEWICZ; KEIDZIA, 2001; MONOSTORY et al., 2003; NOWAKOWSKA, 2007).

Quimicamente, as chalconas ou 1,3-difenil-2-propen-1-ona são definidas como cetonas α - β -insaturadas, onde se tem ligado tanto na carbonila quanto na porção olefínica grupamentos aromáticos, comumente designados como anel A, proveniente da acetofenona e o anel B do aldeído (RODRIGUES et al., 1998; CESARIN-SOBRINHO; NETTO-FERREIRA, 2002; NOWAKOWSKA, 2007).

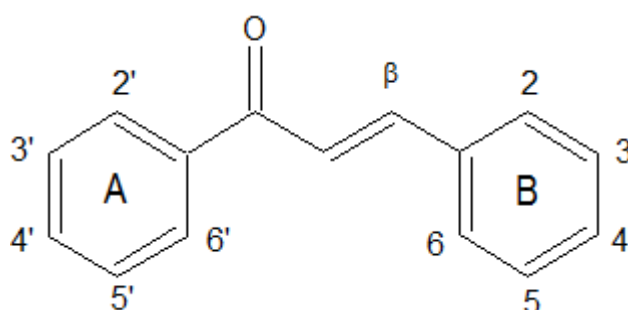


Figura 1: Estrutura geral das chalconas.

Fonte: PADARATZ, 2006

3.1.2 Atividade biológica

As chalconas foram sintetizadas em laboratório pela primeira vez em 1800; de ocorrência natural, as chalconas foram apenas isoladas em 1910 (SHIMOKORIYAMA, 1962 apud LIMING; MENG; SIKOREKI, 2004).

Segundo Liming, Meng, Sikoreki (2004) o potencial biológico das chalconas vem sendo explorado desde a década de 40, sendo então as propriedades

antibacterianas das chalconas já conhecidas nessa época. Na década de 70, Prescott B (1975) apud Coutinho; Dall'Agonol (2001) mostrou a atividade antitumoral e a atividade inibitória do *Plasmodium berguei*. A partir deste momento esta classe de substâncias tem despertado notável interesse devido às variadas propriedades biológicas mostradas em pesquisas recentes (NOWAKOWSKA, 2007).

Atualmente as chalconas têm mostrado atividade hipocolesterolêmica, atividade antinociceptivas (CAMPOS; TONINI, 2003), atividades antioxidante e antitumoral (LIMING; MENG; SIKOREKI, 2004), atividade imunomoduladora, inibidora do óxido nítrico e enzima tirosinase (BHAT et al., 2005) além de atividade antileishmaniose (BOECK et al., 2006) atividades antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral entre outras atividades biológicas (NOWAKAWSKA, 2007).

3.1.2.1 Propriedades antibacterianas

O potencial antimicrobiano das chalconas tem sido crescentemente documentado na última década, muitos grupos de pesquisa têm isolado e identificado estruturas de chalconas ou ainda sintetizado ou modificado chalconas naturais com esta importante atividade (NOWAKAWSKA, 2007).

De acordo com Nowakawska (2007), a atividade antibacteriana das chalconas é relatada como conseqüência da habilidade da cetona α - β insaturada em reagir com o grupo tiol de proteínas essenciais das bactérias.

Haraguchi (1998) isolou a partir de *Glycyrrhiza inflata*, as chalconas licochalcona A e licochacona C (Figura 2), as quais mostraram potente atividade antibacteriana especialmente sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* com valores de CIM que variaram entre 3,13 – 12,5 μ g/mL.

Holla, Akberali e Shivananda (2000) selecionaram as chalconas arilfurlipirazolinas, *N*-acetilpirazolinas e *N*-fenilpirazolinas para triagem *in vitro* da atividade antibacteriana sobre os micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A triagem indicou que as substâncias com os grupamentos *p*-nitro, *p*-bromo e *p*-cloropenilfutil respectivamente mostraram atividade inibitória similar ao Furacina sobre *E. coli*.

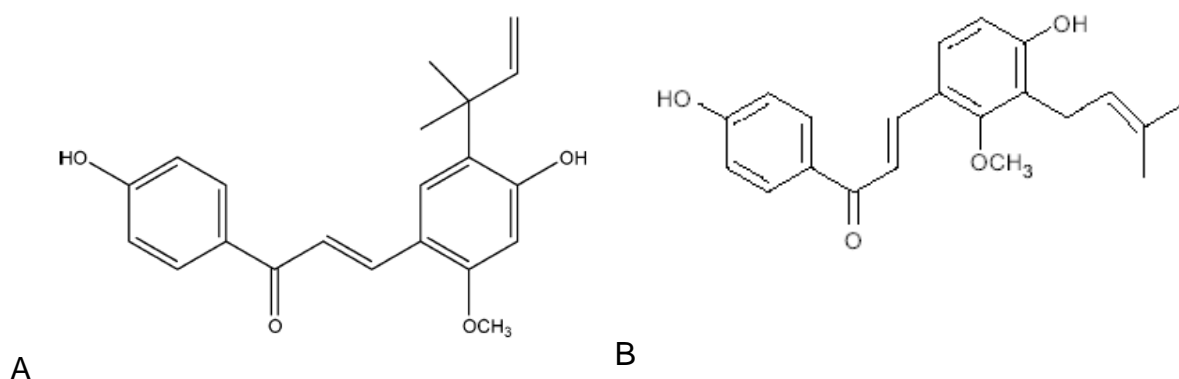


Figura 2: Estrutura das chalconas (a) licochalcona A e (b) licochalcona C.

Fonte: HARAGUCHI et al., 1998

Holla, Akberali e Shivananda (2000) selecionaram as chalconas arilfurlipirazolinas, *N*-acetilpirazolinas e *N*-fenilpirazolinas para triagem *in vitro* da atividade antibacteriana sobre os micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A triagem indicou que as substâncias com os grupamentos *p*-nitro, *p*-bromo e *p*-cloropenilfutil respectivamente mostraram atividade inibitória similar ao Furacina sobre *E. coli*.

O efeito bacteriostático de licochalcona A (Figura 2) testado por Tsukiyama et al. (2002), mostrou valores de CIM entre 2-15 µg/mL para bactérias Gram-positivas incluindo formas de esporos, tais como o gênero *Bacillus coagulans*, *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*, *Clostridium sporogenes* e ainda inibição da produção de toxinas por *B. cereus*. A licochalcona foi ainda efetiva quando testada sobre *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum*, sobre *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, e também ativa sobre *Streptococcus lactis* e *Staphylococcus mutans* com valores de CIM entre de 5 e 8 µg/mL.

Segundo Friis – Möller e colaboradores (2002), a licochalcona A inibiu o crescimento de *Legionella pneumophila*, *L. Longheacheae*, *L. wadsworthii*, *L. bozemanii*, *L. dumoffi* e *L. Feelei* com valores de CIM que oscilaram entre 1-2 µg/mL. Funkai et al. (2002) detectaram atividade inibitória sobre o crescimento de *Helicobacter pylori in vitro* (CIM = 25 µg/mL).

A triagem de di-hidrochalconas mostrou que essas substâncias possuem atividade antibacteriana muito boa sobre as bacterias Gram-positivas *S. aureus* e *B. subtilis*, e sobre a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (MUSTAFA et al., 2003).

Kromann et al. (2004) testaram análogos da licochalcona A sobre *S. aureus* e detectou que um grupo hidroxil livre na posição *para* do anel B das chalconas foi essencial para a atividade antibacteriana desses análogos. Por outro lado, não foi observado mudança no potencial de atividade quando o radical hidroxil na posição *para* do anel A das chalconas foi removido, bloqueado por grupo metil, ou substituído por um átomo de Cloro. A eliminação de ambos os grupos hidroxilas dos anéis A e B das chalconas ou a substituição de ambos por uma reação de metilação, eliminou completamente a atividade antibacteriana dos análogos. Quando o grupo lipofílico fenil foi removido houve completa queda na atividade, quando substituído pelo radical propil, observou-se moderado efeito antibacteriano. A introdução do radical hexil na posição *para* resultou na chalcona 3 que apresentou maior potencial antibacteriano que a licochacona A.

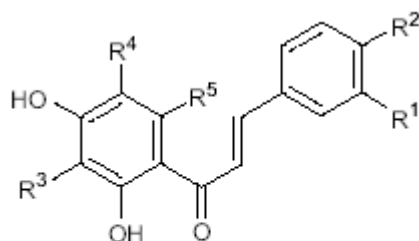
Segundo Kromann et al. (2004) quando comparado o *log P* com a atividade antibacteriana dos compostos estudados, ficou claro que a correlação entre a lipofilicidade das chalconas estudadas com o potencial de atividade demonstrado pelas mesmas. O forte caráter lipofílico das moléculas foi essencial para o maior efeito antibacteriano dessas moléculas.

Ensaio antibacterianos de soluções fenólicas para *S. aureus*, incluindo algumas cepas de β -lactâmicos resistente (MRSA), e cepas β -lactâmicos sensíveis foram examinadas por Hatano et al. (2000) e Funkai et al. (2002). A licochalcona A mostrou efeito inibitório sobre as linhagens MRSA (OM481 e OM505) com valor de CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$ (HATANO et al., 2000) e sobre as linhagens de MRSA (K3 e ST28) com CIM = 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (FUNKAI et al., 2002). E exibiu ainda atividade inibitória sobre as cepas sensíveis a meticilina (FDA 209P e Smith) com valores de CIM = 16, 3,13 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Em geral, os grupos substituintes OH e OCH₃ exerce efeitos contrários sobre quando adicionados em chalconas anti – MRSA, enquanto que halogênios como o Cloro e Flúor não modificam significativamente a atividade antibacteriana. Já o radical hidroxil tem a capacidade de induzir o aumento da atividade, entretanto o radical metoxi reduz drasticamente o potencial de atividade anti-MRSA (NOWAKAWSKA, 2007).

A chalcona 10 (Figura 3) isolada a partir da planta *Dalea versicolor* exibiu efeito antibacteriano individual e sinérgico com conhecidos antibacterianos (Berberina, Eritromicina e Tetraciclina) com atividade sobre o patógeno humano

S. aureus e sobre o micro-organismo oportunista *B. cereus*. O uso concomitante dessa chalcona em infecções causadas por essas bactérias tratadas com os antibacterianos citados acima, aumenta o potencial de atividade dos mesmos. No caso da Gram-positiva *S. aureus* o efeito foi menos expressivo, possivelmente pelo mecanismo de resistência “bomba de efluxo”, enquanto que no tratamento do *B. cereus* o efeito foi intensificado 30 vezes em relação ao tratamento com apenas os antibacterianos (BELOFSKY et al., 2004).



10 $R^1R^2 = H$ $R^3R^4 = CH_3$ $R^5 = OCH_3$

Figura 3: Chalconas isoladas da planta *Dalea versicolor*.

Fonte: Adaptado de BELOFSKY et al., 2004

A partir da Licochalcona A, Nielsen et al. (2004) sintetizaram 30 análogos através de substituições no anel A e B da mesma e investigaram duas principais alterações estruturais: (a) mudança da acidez do anel A por substituição fenólica; Estruturas das chalconas com potencial inibitório sobre o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (b) mudança de posição do grupo ácido carboxílico do anel B. A presença do átomo de Flúor na posição *para* do grupo fenol do anel A provocou aumento da acidez do mesmo, e como consequência a atividade antibacteriana foi diminuída quando comparado com o análogo que possui na posição *para* o grupo ácido carboxílico. O potencial de atividade antibacteriana dos análogos com substituições na posição *orto*, *meta* ou *para* do anel B, sofreu diferente influência de acordo com a posição do radical ácido carboxílico. As substâncias com substituição na posição *para* foram as mais potentes, devido ao aumento da lipofilicidade das mesmas. Essas chalconas, 4'-carboxi-3,5-bis-trifluorometil-chalcona e 4'-carboxy-3,5-dibromo-chalcona foram equipotentes com Ciprofloxacina e Linezolida com valores de CIM de 2 µg/mL e nenhuma

citotoxicidade significativa.

Nielsen et al. (2005) estudaram chalconas com substituições 4'-corboxi no anel A e mostrou que estas moléculas apresentaram pronunciada atividade antibacteriana. O potencial de atividade destas substâncias, assim como no estudo anterior (NIELSEN et al., 2004), foi correlacionada com a lipofilicidade das moléculas. As chalconas mais lipofílicas foram mais potentes e a medida que aumentou a polaridade dos substituintes, a atividade antibacteriana diminuiu.

A atividade antibacteriana e antifúngica das chalconas 1-(4-Metoxi-1-metil-1H-indol-5-il)-3-fenilpropenona e 1-(4-Metoxi-1-metil-1H-indol-5-il)-3-(4-metoxi-fenil)-propenone foi demonstrada sobre as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphyococcus aureus* e sobre os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida parapsilosis* com valores de CIM que variaram entre 6,25 e 50 µg/mL (YADAV et al., 2005). Os micro-organismos *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. xenophi* e *M. marinum* foram inibidos pela licochalcona A com valores de CIM ≤ 20 µg/mL (FRIIS – MÖLLER et al., 2002).

A substituição de um halogênio no anel A da 2'-hidroxichalcona conduziu para o aumento da atividade sobre o micro-organismo *Mycobacterium tuberculosis*. Substâncias com halogênios na posição *meta* demonstraram ser mais potentes que seus análogos com halogênios nas posições *orto* e *para*. Chalconas com 2'-hidroxil no anel B e 3-cloro ou 3-iodo no anel A, demonstraram forte atividade com percentagem de inibição entre 90-92 % sobre *M. tuberculosis* com valor de CIM = 12,5 µg/mL. A atividade de 2'-hidroxichalcona (61 %) foi intensificada com a inserção do grupo metóxi (78 %) ou inserção do cloro (89 %) na 4-posição do anel B das chalconas (LIN et al., 2002).

Shahar Yar e colaboradores (2006) sintetizaram 20 chalconas para a análise da sua atividade inibitória sobre *Micobacterium tuberculosis* e *Micobacterium tuberculosis* resistente. Destas chalconas mostraram grande eficácia concentração inibitória mínima 6,25 µg/mL; e outra chalcona exibiu atividade de 95 % com CIM 6,25 µg/mL sobre *M. tuberculosis*.

Nowakawska, Kedzia e Schroeder (2007) avaliaram o potencial de atividade de uma série de chalconas comparando a atividade das mesmas com os antimicrobianos cloranfenicol e anfotericina B. Duas (*E*)-4-aminoalquiltiochalconas foram ativas sobre *S. aureus* e *B. subtilis*, mostrando, respectivamente, valores de

CIM iguais a 26 e 25 μM , e uma delas inibiu o crescimento de *E. faecalis* com CIM 25 μM ; a substância (*E*)-4-aminoalquiltiochalcona e (*E*)-4-aminoalquoxichalcona com seis átomos de carbono foram muito potentes sobre *B. subtilis* com CIM de 18 e 19 μM , respectivamente; (*E*)-4-aminoalquiltiochalconas e (*E*)-4-aminoalquoxi-chalcona mostraram significativa atividade antibacteriana sobre *S. aureus* com CIM entre 24-25 μM e duas (*E*)-4-aminoalquiltiochalconas e duas (*E*)-4-aminoalquoxichalconas foram ativas sobre *E. faecalis* com valores de CIM entre 24-26 μM .

Segundo Nowakawska, Kedzia e Schroeder (2007), o caráter lipofílico das moléculas testadas foi essencial para o potencial de atividade antibacteriano. A permeabilidade na célula é um fator determinante para a atividade antibacteriana, nesse contexto a presença de grupamentos hidrofóbicos é muito importante para tal atividade.

3.1.2.2 Propriedades antifúngicas

As chalconas constituem um grupo promissor de substâncias candidatas a fármacos antifúngicos, elas têm mostrado potencial em inibir o crescimento de várias espécies de fungos filamentosos como os dermatófitos e leveduras, incluindo espécies de *Candida* (BATOVSKA et al., 2007; NOWAKAWSKA, 2007). É conhecido que o modo de ação antifúngico de algumas moléculas representantes das chalconas ocorre através da inibição da formação da parede celular (BOECK et al., 2005).

Bhakuni e Chaturvedi (1984) isolaram a partir das folhas e caule de *Crotalaria madurensis*, a chalcona Crotmadine (Figura 4), a qual exibiu atividade inibitória o fungo *T. mentagrophytes* com CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

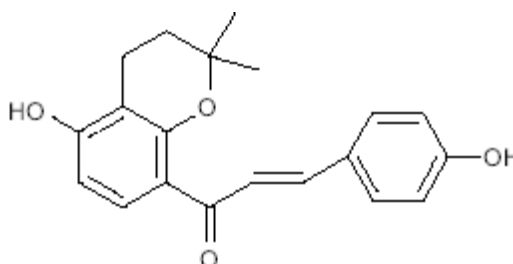


Figura 4: Crotmadine, chalcona extraída das folhas e caules de *Crotalaria madurensis*.

Fonte: BHAKUNI, CHATURVEDI, 1984

Christian, Mahabir e Hostettmann (1998) isolaram de *Piper dilatatum* uma série de nove chalconas e avaliaram a atividade inibitória sobre um patógeno de plantas, o fungo *Cladosporium cucumerinum*. As chalconas metil 3-(1'-oxo-3'metil-2'-butenil)-4-hidroxibenzoato e 2,2-dimetil-6-carboxicloroman-4-ona metil éster apresentaram CIM de 60 e 40 µg/mL, respectivamente.

Extratos das folhas da planta conhecida popularmente como Peruviam, *Psidium acutangulum*, contendo dihidrochalcona, apresentou relevante atividade antifúngica sobre *Rhizoctonia salani* e *Helimindosporium teres* (MILES et al., 1991 apud NORWAKOWSKA, 2007).

Suman et al. (1995) apud Norwakowska (2007) testaram algumas chalconas substituídas e as mesmas se mostraram ativas sobre *Rhizoctonia salani*, *Fusarium oxisporum* e linhagens de *Colletotrichum capsicum*. O estudo mostrou que α,β-dibromo-3,3'-dinitro-chalcona teve atividade inibitória sobre os três fungos testados com CIM de 6,25 µg/mL e 4,4'-dimetilchalcona mostrou atividade sobre *Colletotrichum capsicum* com valor de CIM = 6,25 µg/mL.

As chalconas 65 e 66 (isobavachalconas, Figura 5) isoladas a partir de *Maclura tinctoria* foram ativas sobre as leveduras patogênicas *Candida albicans* (IC₅₀ de 3 e 15 µg/mL, respectivamente) e *Cryptococcus neoformans* (IC₅₀ de 7 µg/mL) (ELSOHLY et al., 2001).

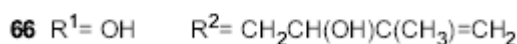
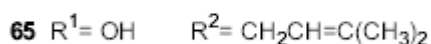
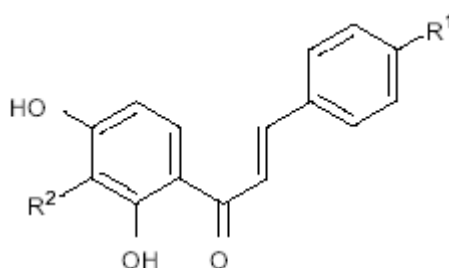


Figura 5: Estruturas das isobavachalconas.

Fonte: Adaptado de ELSOHLY et al., 2001

López et al. (2001) avaliaram a atividade inibitória de chalconas obtidas a partir de substituições no anel A e B da 1,3-difenil-2-propen-1-ona sobre fungos oportunistas patogênicos humanos, usando o método de diluição em ágar.

Respeitando a influência dos substituintes no anel A das chalconas, uma interessante correlação estrutura-atividade foi observada: (a) grupos químicos elétrons-doadores tendem a enfraquecer a atividade antifúngica; (b) grupos elétrons-sacadores na *para*-posição aumentam o potencial de atividade. Quando os grupos NO₂ e Cl estão na posição *para*, foi observada queda da atividade, sugerindo que a presença desses grupos na posição *orto* do anel A das chalconas pode introduzir importantes efeitos estéricos (efeitos que resultam a partir do tamanho dos substituintes repulsão entre eles). Considerando a correlação da atividade antifúngica das chalconas substituídas com a conformação estrutural das moléculas, um decréscimo na atividade foi observado nas chalconas com grupos volumosos na posição *orto* do anel A das chalconas. A presença adicional de *orto*-substituintes no anel B das chalconas culminou na queda total da atividade.

Lopes et al. (2001) também observaram que a chalcona que mostrou maior potencial antifúngico foi a chalcona **64** (Figura 6). Essa chalcona apresentou uma forte atividade antifúngica contra os micro-organismos *Microsporium canis* (CIM = 25 µg/mL), *Microsporium gypseum* (CIM = 1,5 µg/mL), *Trichophyton mentagrophytes* (3 µg/mL), *Trichophyton rubrum* (3 µg/mL) e *Epidermophyton floccosum* (0,5 µg/mL) (LÓPEZ et al., 2001).

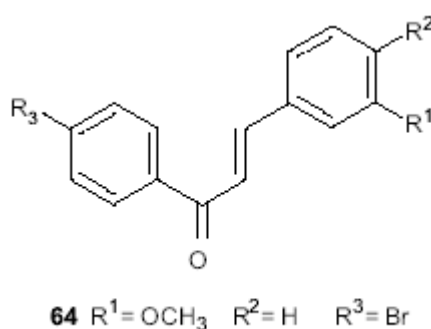


Figura 6: Estrutura da chalcona 64.

Fonte: Adaptado de LÓPEZ et al., 2001

Chalconas isoladas a partir de *Astocarpus nobilis* por Jayasinghe e colaboradores (2004) mostraram boa atividade fungicida sobre *Cladosporium clodosporioides* com valores de CIM entre 2 -15 µg/mL.

O extrato metanólico de *Zaccagnia punctata* contendo 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona e 2',4'-dihidroxichalcona mostraram boa atividade (CIM = 6,25 e

3,12 µg/mL) sobre *Phomopsis longicolla* Hobbs CE117, e (CIM = 6,25 µg/mL) sobre *Colletotrichum truncatum* CE175, respectivamente (SVETAZ et al., 2004 apud NORWAKOWSKA, 2007).

Segundo Boeck et al. (2005) a chalcona 2-cloro-2'-hidroxi-4',6'-dimethoxichalcona mostrou a menor CIM contra *T. rubrum* (12,5 µg/mL). O potencial antifúngico das chalconas 1-(4-Metoxi-1-metil-1H-indol-5-il)-3-fenilpropenona, 1-(4-Metoxi-1-metil-1H-indol-5-yl)-3-(4-metoxi-fenil)-propenona, 1-(Hidroxienzo[b]tiofen-5-il)-3-fenilpropenona, 3-Hidroxi-1-(4-metoxi-benzo[b]tiofen-5-il)-3-phenil-propenona-4-oxo-4-tiofen-2-il-butirico ácido, 7-Metil-2-fenil-7H-pirano[2,3-e]indol-4-ona e 7-Hidroxi-8-fenil-9-oxa-3-tia-ciclopenta[a]-naftalen-6-ona, representadas pelos números 12, 13, 14, 19, 22 e 26, respectivamente na Figura 7 foi demonstrado sobre os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida parapsilosis* com valores de CIM que variaram entre 6,25 e 50 µg/mL (YADAV et al., 2005).

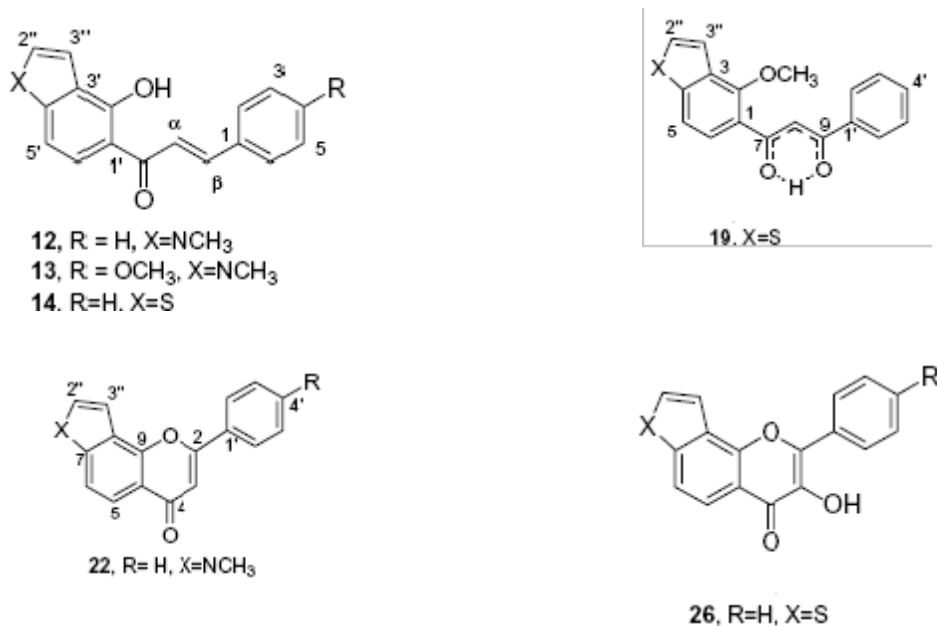


Figura 7: Estruturas de algumas chalconas

Fonte: Yadav et al., 2005

Nowakawska, Kedzia e Schroeder (2007) avaliaram *in vitro* a atividade antifúngica de uma série de chalconas substituídas derivada da (*E*)-4-mercaptochalcona e (*E*)-4-hidroxi-chalcona. A molécula mais ativa foi a (*E*)-4-(4'-

metilpiperidino)N-hexilchalcona com valor de CIM igual a 123 μM sobre o fungo *M. gypseum*, as demais chalconas apresentaram valores de CIM que variaram entre 184-265 μM .

Batovska et al. (2007) sintetizaram uma série de chalconas com diversas substituições nos anéis aromáticos, principalmente no anel B e analisaram os efeitos eletrônicos provocados por esses substituintes sobre *C. albicans*. O resultado desse estudo mostrou que a potência das chalconas sobre *C. albicans* depende da habilidade dessas substâncias em interagir com grupos sulfidrilas das células leveduriformes. Essa conclusão foi baseada na influência dos efeitos eletrônicos na atividade antifúngica. As hidróxichalconas foram as mais ativas, com CIM entre 32,25 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$. A atividade antifúngica dessas substâncias foi correlacionada com a localização do grupo hidroxil no anel B das chalconas. A posição *orto* foi mais favorável à reação de tiol alquilação dessas chalconas.

3.2 Controle Microbiano

Substâncias com poder antimicrobiano podem ser classificadas de duas formas: *Microbicidas* ou *Microbiostáticas*. Substância *Bactericida* ou *Fungicida* é aquela que provoca um dano irreversível e irreparável na estrutura e nas funções vitais da célula, evoluindo para a morte celular; o termo *Bacteriostático* ou *Fungistático* se refere aquela substância que paralisa o metabolismo celular, impedindo o crescimento e reprodução de micro-organismos, essa forma de ação pode ser reversível quando a ação bacteriostática/fungistática é neutralizada (KONEMAN, 2001; SOUZA et al., 2003).

Devido às significativas diferenças estruturais das células fúngicas e bacterianas, os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos são particulares para cada micro-organismo alvo (Figuras 11 e 12) (KONEMAN, 2001; SOUZA et al., 2003; TRABULSI et al., 2005).

As bactérias são organismos unicelulares, seu material genético (ácidos nucléicos – DNA e RNA) está disperso no citoplasma, não possuem uma delimitação, uma membrana que separe o núcleo das outras estruturas celulares. Assim são denominados micro-organismos procariontes. Enquanto que os fungos são organismos com espécies unicelulares (fungos leveduriformes) e espécies

pluricelulares (fungos filamentos), mas que possuem uma membrana que delimita o material genético, membrana nuclear, a qual fornece proteção extra ao DNA e RNA, assim denominados de organismos eucariontes (TRABULSI et al., 2005).

3.2.1 Mecanismo de Ação dos Agentes Antibacterianos

Quanto ao modo de ação, os agentes antibacterianos podem ser classificados da seguinte forma:

I. *Inibição da síntese da parede celular*: Para sintetizar a camada de peptidoglicano, a célula precisa utilizar componentes citoplasmáticos para construir essa estrutura insolúvel. Para fazer isso, é necessário transportar os componentes, que são sintetizados no interior da célula e que são individualmente hidrofílicos, gradativamente através da membrana hidrofóbica. Esse processo complexo pode ser interrompido em vários estágios. Por atuarem em sítios que não são encontrados em células humanas, a classe de antibacterianos inibidores da parede, é considerada segura e amplamente empregada. Por exemplo, os β -lactâmicos que inibem a ligação dos tetrapeptídeos do peptidoglicano, através da ligação uma enzima responsável por esse processo, ocasionando perda da rigidez da parede celular, e provocando a lise celular (SOUZA et al., 2003; GERMAN-FATTAL, 2005; RANG et al., 2004).

II. *Inibição das funções da membrana celular*: Esses agentes desorganizam a estrutura da membrana celular por atuarem como detergentes com afinidade por radicais fosfato nela existentes (hidrofóbicos) ou alteram a permeabilidade da membrana por modificação na distribuição íons ou nos sistemas ativos de permeação (ionofóbicos). Uma vez modificada a estrutura e permeabilidade da membrana, altera-se a função de barreira osmótica com a conseqüente liberação de bases nitrogenadas e a entrada de substâncias nocivas para a célula. Por atuarem em estruturas comuns a todos os tipos de células, esses agentes são tóxicos para o micro-organismo patogênico bem como para o hospedeiro, sendo empregados na clínica de forma limitada (TAVARES, 1999; FONSECA, 1999).

III. *Inibição da respiração e/ou fosforilação oxidativa*: pertencem a esta classe

os antimicrobianos que inibem a respiração celular e provocam queda na produção de energia para a célula. Atuam num processo comum a todos os tipos de célula, assim são igualmente tóxico para o micro-organismo patogênico quanto para o hospedeiro, por isso não são empregados na clínica (TAVARES, 1999; SOUZA et al., 2003; YONEYAMA; KATSUMATA, 2006).

IV. Inibição da síntese do DNA/RNA: são antimicrobianos que impedem a replicação da informação genética. A inibição da síntese pode ser conseguida por ação direta sobre a molécula de DNA ou impedindo a ação da DNA-polimerase. Esse mecanismo de ação é letal para célula, pois atua em estruturas vitais para a multiplicação e desenvolvimento celular. Possuem pouca toxicidade seletiva, sendo empregados comumente na terapia anticancerígena. Mas alguns são usados por via sistêmica como antibacteriano e antifúngico (SOUZA et al., 2003; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

V. Inibição da síntese de proteínas: a síntese de proteínas depende da tradução do DNA, mas esse processo não é efetuado diretamente do DNA, é necessário um intermediário – o RNAm. Ao que parece, esses antimicrobianos atuam nas unidades ribossômica 30S e 50S dos procarióticos e nas unidades 40S e 50S dos eucarióticos, impedindo o alongamento da cadeia peptídica e o movimento do ribossomo ao longo do RNAm. Os inibidores da síntese de proteínas possuem capacidade de provocar toxicidade ao hospedeiro (TAVARES, 1999; FONSECA, 1999; SOUZA et al., 2003; RANG, 2004).

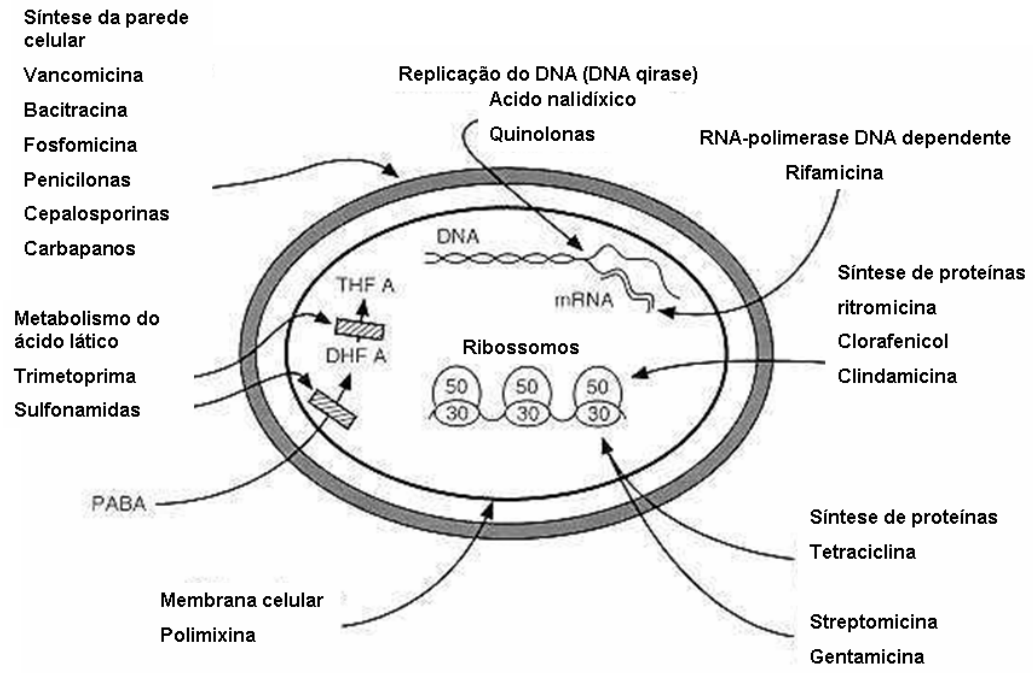


Figura 8: Sítios de ação dos diferentes agentes antimicrobianos.

Fonte: adaptado BARON, 1996.

3.2.2 Mecanismo de Ação dos Agentes Antifúngicos

Quanto ao mecanismo de ação, os agentes antifúngicos podem ser classificados da seguinte forma:

I. *Inibidores da formação da parede celular fúngica*: A parede celular fúngica é uma barreira física que lhe confere proteção osmótica e da forma, além de ser essencial para o crescimento dos fungos. A parede celular é formada por muitos componentes dentre os quais se destaca a quitina, β -glicanos e manoproteínas. Uma vez sintetizados eles se entrelaçam em ligações cruzadas formando a parede. A inibição das enzimas catalizadoras da síntese desses componentes constitui um dos principais alvos de interesse clínico para os antifúngicos (Figura 9). Pelo fato de que as células dos mamíferos não possuem parede celular, esses antifúngicos tornam-se específicos e seguros para o emprego na clínica, constituindo assim um campo de grande interesse dos cientistas pela busca de novos antifúngicos que atuem neste sítio (ZACCHINO, 2001; ODDS; BROWN; GOW, 2003; SOUZA et al., 2003).

II. *Inibidores dos esteróides da membrana celular*: tanto a membrana celular dos mamíferos como dos fungos, é composta por vários esteróides, mas no caso dos fungos o esteróide encontrado é o ergosterol, em vez do colesterol que é encontrado nas células dos mamíferos. O Ergosterol tem a função de modular a fluidez da membrana e evitar suas alterações em função das oscilações ambientais, além de regular o crescimento e proliferação celular. Os antifúngicos que interferem na síntese do ergosterol o fazem por formação de um complexo com o dito esteróide ou interferem em alguma etapa da síntese do mesmo (Figura 9) (ZACCHINO, 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

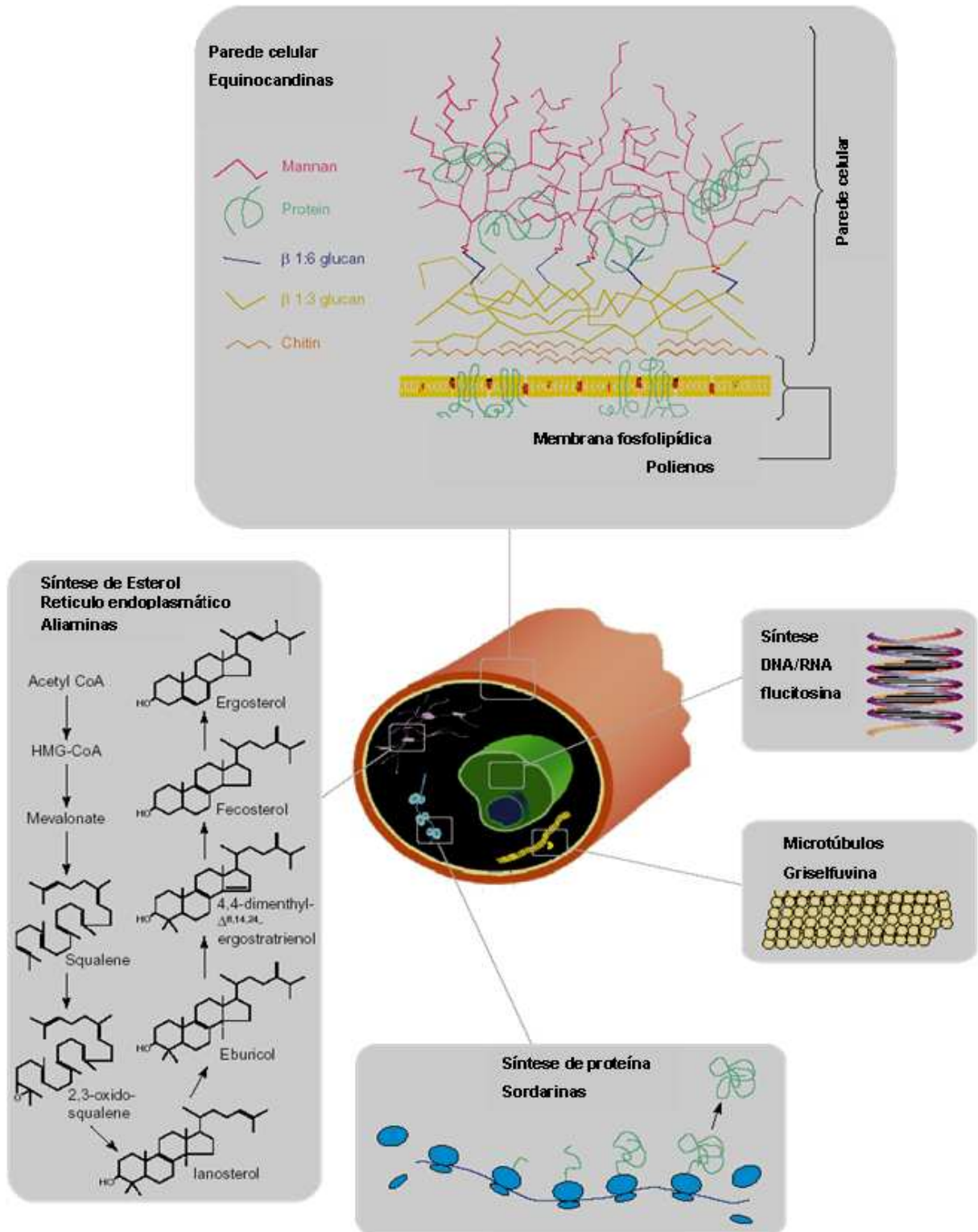


Figura 9: Sítios de ação dos diferentes agentes antifúngicos.

Fonte: adaptado de ODDS et al., 2003

III. *Inibidores da síntese do DNA/RNA*: interferem por diferentes vias no metabolismo das pirimidinas, impedindo a síntese do DNA/RNA e conseqüentemente de proteínas da célula fúngica (Figura 9). Por atuarem em estruturas que participam desse complexo, mas que não estão presentes nas células dos mamíferos, são consideravelmente seguros (ZACCHINO, 2001; SOUZA et al., 2003).

IV. *Inibidores da topoisomerase*: o DNA cromossomal e/ou plasmídial se encontram como um círculo fechado covalentemente e que pode se apresentar de duas formas topológicas, relaxado ou condensado. As *DNA-topoisomerases* são enzimas que catalisam a interconversão entre as duas formas do DNA, permitindo que o mesmo realize suas funções de transcrição, tradução e recombinação. As *DNA-topoisomerases* constituem alvos moleculares importantes (Figura 9), uma vez que estão presentes em abundância nas células fúngicas e são suficientemente diferenciadas das células dos mamíferos, principalmente a *topoisomerase I* (ZACCHINO, 2001; ODDS; BROWN; GOW, 2003; SOUZA et al., 2003).

3.3 Resistência Microbiana

A resistência microbiana é a insusceptibilidade temporária ou permanente de um micro-organismo a ação de uma determinada substância sob determinadas circunstâncias. A resistência é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no micro-organismo, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos agentes antimicrobianos (ANDERSON, 2005; COURA, 2005).

Para os agentes antimicrobianos, a resistência microbiana é geralmente quantificada a partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM) requerida para exercer um efeito inibitório no crescimento em uma população de células. Na clínica, os resultados de testes de susceptibilidade a antimicrobianos são necessários para prever o sucesso da terapia. Onde há uma mudança na susceptibilidade que resulta na ineficiência do antimicrobiano e a uma infecção, o micro-organismo é denominado então como resistente (GILBERT; MCBAIN, 2003; SANGLARDI, 2003; ANDERSON, 2005).

Em 1967 foi publicado o primeiro estudo de pneumococos resistentes à

penicilina (ALÓS; CARNICERO, 1997). Em 1977, as primeiras cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina foram descritas e em 1986 já eram multirresistentes (GOBERNADO, 2003).

A resistência pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica genética da espécie. Alguns organismos pela virtude da ausência de locais críticos do alvo ou de uma inabilidade dos agentes em se acumular naqueles alvos são intrinsecamente resistentes. Todas as amostras dessa espécie são resistentes à ação de um determinado biocida independente do local de isolamento (GERMAN-FATTAL, 2005; GOBERNADO, 2003; TRABULSI et al., 2005).

A resistência adquirida se produz por evolução vertical, mutação espontânea no seu cromossomo que é transmitida as seus descendentes. Na resistência adquirida somente alguns representantes são resistentes, com proporção variável a determinadas condições. O micro-organismo *Escherichia coli* é naturalmente resistente a benzilpenicilina e de resistência adquirida manifestada por alguns representantes desta bactéria em presença da ampicilina. A proporção destes últimos depende da intensidade do uso da ampicilina (GOBERNADO, 2003; GERMAN-FATTAL, 2005; TRABULSI et al., 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Para os testes microbiológicos foram utilizados os micro-organismos: Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030); Bactérias Gram-positivas: *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Bacillus subtilis* (ATCC 23858), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 35552); fungos leveduriformes: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 7349), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32264), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), fornecidos pela "Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello", Campinas, SP, fungos filamentosos: *Aspergillus niger* (ATCC 9092), *Rhizopus* sp (CL 35), *Microsporum canis* (C112), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9972) e *Trichophyton rubrum* (C137), fornecidos pelo Centro de Referencia Micológica (CEREMIC), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Suipacha, Rosario, Argentina.

Para os testes de toxicidade foram empregados ovos do microcrustáceo *Artemia salina* Leach (Maremar) obtidos no comércio local e cepas da bactéria Gram-negativa *Salmonella typhimurium* (TA 97, TA 98, TA 100).

Para os testes de toxicidade celular foram utilizadas as células L929 (Fibroblastos – culturas secundárias do tecido conectivo de adipócitos de camundongos). Todas as células utilizadas foram adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.2 Material Químico

As chalconas e seus análogos sintéticos (Tabela 1) foram sintetizados no Núcleo de Investigação Químico - Farmacêutico (NIQFAR) situado no Centro Ciências de Saúde (CCS) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), através de condensação aldólica de Claisen-Schmidt e cedidas por Pamela Padaratz sob a orientação da professora Dr^a. Fátima de Campos Buzzi e o professor Dr. Rogério

Corrêa.

Tabela 1: Relação das chalconas sintéticas divididas por grupos químicos.

Chalcona	Código
Amino-chalconas	
(2E)-1-(4-aminofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	1
(2E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-metóxfenil)prop-2-en-1-ona	2
(2E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-metilfenil)prop-2-en-1-ona	3
(2E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona	4
(2E)-1-(4-aminofenil)-3-(3, 4-diclorofenil)prop-2-en-1-ona	5
(2E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona	6
(2E)-1-(4-aminofenil)-3-[4-(dimetilamino)fenil]prop-2-en-1-ona	7
Análogos das Amino-chalconas	
(2E)-1-(4-aminofenil)-3-(2-furil)prop-2-en-1-ona	8
(2E)-1-(4-aminofenil)-3-tien-2-ilprop-2-en-1-ona	9
Acetamido-chalconas	
N-{4-[(2E)-3-fenilprop-2-enoil]fenil}acetamida	10
N-{4-[(2E)-3-(4-metoxifenil)prop-2-enoil]fenil}acetamida	11
N-{4-[(2E)-3-(4-metilfenil)prop-2-enoil]fenil}acetamida	12
N-{4-[(2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enoil]fenil}acetamida	13
N-{4-[(2E)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enoil]fenil}acetamida	14
N-{4-[(2E)-3-(4-nitrofenil)prop-2-enoil]fenil}acetamida	15
N-(4-{(2E)-3-[4-(dimetilamino)fenil]prop-2-enoil}fenil)acetamida	16
Análogos das acetamido-chalconas	
N-{4-[(2E)-3-(2-furil)prop-2-enoil]fenil}acetamida	17
N-{4-[(2E)-3-(2-tienil)prop-2-enoil]fenil}acetamida	18
Nitro-chalconas	
(2E)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	19
(2E)-1-(4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	20
(2E)-1-(4-metilfenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	21
(2E)-1-(3,4-diclorofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	22
(2E)-1-(4-fluorfenil)-3-fenilprop-2-em-1-ona	23

4.3 Meios de Cultura e Soluções

Para a realização dos ensaios realizados no presente estudo, foram utilizados meios de cultura e soluções. Usou-se meios comercializados prontos para a conservação e ativação dos micro-organismos testados e os meios e soluções que foram preparados especificamente para os experimentos de toxicidade conforme descritos por diferentes autores (Tabela 2).

4.4 Manutenção dos Micro-organismos

As bactérias foram mantidas em ágar nutriente e conservadas sob refrigeração (4 °C) no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do curso de Farmácia da UNIVALI, sendo repicadas em intervalos de 15 a 30 dias para manter as colônias viáveis (NCCLS, 1993).

Os fungos (leveduriformes e filamentosos) foram mantidos em ágar Sabouraud dextrosado, mantidos à temperatura ambiente na micoteca do Laboratório de Microbiologia da UNIVALI, sendo replicados em intervalos de 15 a 30 dias, para prevenir transformações pleomórficas. As leveduras foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do curso de Farmácia da UNIVALI, sendo repicadas em intervalos de 15 a 30 dias para manter as colônias viáveis (NCCLS, 1993).

4.5 Manutenção da Células L929

As células L929 foram mantidas em meio MEM - (Gibco-BRL) suplementado com 10 % soro fetal bovino (Sigma), 5 mg/mL penicilina, 5 mg/mL estreptomicina, 10 mg/mL neomicina (GIBCO) e 10 mM de L-glutamina (Ajinomotto) e 1 % de aminoácidos não-essenciais. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂. Para as células B16F10, o pH do meio foi de 7,1 e para as células L929 e Hela, o pH foi de 7,4. Para as células L929, o pH foi de 7,1.

As amostras foram solubilizadas em meio de cultura MEM suplementado com L-glutamina e esterilizadas por filtração em membrana (0,22 µm).

Tabela 2a: Relação dos meios e soluções utilizadas nos ensaios realizados neste estudo.

Meio Cultivo / Solução	Composição	Finalidade	Referência
Água marinha sintética	Sal marinho 4 % Água destilada	Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	Meyer et al., 1982
Meio completo	Glicose 2 % Extrato de Levedura 1 % Peptona 0,5 % Ágar 1,5 % Água destilada	Ativação do <i>S. cerevisiae</i>	Invittox, 1994
Caldo completo	Idem Meio completo sem Agar	Preparo do inoculo do <i>S. cerevisiae</i>	Invittox, 1994
Meio NB Oxoid CM 67	Extrato de levedura 0,2 % Extrato de carne 0,1 % Peptona de carne 0,5 % Cloreto de sódio 0,5 % Ágar 1,2 % Água destilada.	Ativação das cepas da <i>S. typhimurium</i>	Maron; Ames, 1983
Caldo NB Oxoid CM 67	Idem Meio NB sem ágar 1,2 % 0,315 % de solução de Ampicilina	Preparação do inóculo da <i>S. typhimurium</i>	Maron; Ames, 1983
Ágar de superfície	NaCl 0,5 % Ágar 0,66 % Água destilada	Incubação da <i>S. typhimurium</i>	Maron; Ames, 1983

Legenda: *S. typhimurium* (*Salmonella typhimurium*), *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*)

Tabela 2b: Relação dos meios e soluções utilizadas nos ensaios realizados neste estudo.

Meio Cultivo / Solução	Composição	Finalidade	Referência
Meio Davis	Sulfato de Mg 0,01 % Citrato de Na 0,05 % Potássio bibásico 0,7 % Potássio monobásico 0,3 % Sulfato de NH ₄ 0,1 % Glicose 0,2 % (esterilizada separadamente) Água destilada	Incubação de <i>S. typhimurium</i>	Maron; Ames, 1983
Ágar Mueller-Hinton	Infusão de carne 5% Caseína hidrolisada 17,5 % Amido 1.5 % Ágar 12,5 %	Manutenção e ativação de bactérias	
Ágar Sabouraud	Peptona 1 % Glicose 2 % Extrato de levedura 0,5 % Ágar 1,5 %	Manutenção e ativação de fungos	
Tampão PBS	KCl 0,2 % NaHPO ₄ 12H ₂ O 2,85 % KH ₂ PO ₄ 0,2 % Água destilada	Ensaio de citotoxicidade	
Meio MEM	Sais orgânicos, aminoácidos, vitaminas, glicose e vermelho de fenol	Ensaio de citotoxicidade	Invitox, n. 64, 2007

Legenda: *S. typhimurium* (*Salmonella typhimurium*).

4.6 Preparação dos Inóculos

4.6.1 Bactérias

Cada espécie de bactéria, exceto as diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA 97, TA 98, TA 100), foi transferida do meio de manutenção para um tubo contendo caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (MERCK), e incubada em estufa a 37 °C até adquirir turbidez satisfatória durante período de aproximadamente 3 horas). Após este período, cada bactéria foi transferida para placa de Petri contendo o meio ágar Mueller-Hinton (MERCK) e incubada a 37 °C por 18-24 horas, para a ativação da respectiva cultura (NCCLS, 1993).

Para o preparo do inóculo, selecionou-se de 4 a 5 colônias da bactéria ativada em ágar Mueller-Hinton e transferiu-se para um tubo de ensaio com 5 mL de solução de NaCl 0,86 % estéril, seguido de homogeneização em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada por espectrofotometria a 520 nm, por comparação com a escala 0,5 de McFarland, obtendo-se dessa forma um inóculo com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL (NCCLS, 1993).

4.6.2 Fungos Leveduriformes

Antes da preparação do inóculo, cada levedura foi cultivada em ágar

Sabouraud dextrosado, pelo menos duas vezes, para assegurar viabilidade das culturas jovens entre 24 e 48 horas a 25 °C.

Para o preparo do inóculo selecionou-se 4 a 5 colônias da levedura, com aproximadamente 1 mm de diâmetro, que foram suspensas em 5 mL de NaCl 0,85 % estéril e homogeneizadas em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada, por espectrofotometria a 520 nm para a obtenção de transmitância entre a 74 a 78 %, obtendo-se concentração final entre $1-5 \times 10^6$ células/mL (ESPINEL-INGROFF; PFALLER, 1995).

4.6.3 Fungos Filamentosos

Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio com ágar Sabouraud dextrosado à temperatura ambiente por 7 a 10 dias para obtenção de culturas jovens. Os respectivos inóculos foram preparados removendo-se os esporos de cada fungo a partir de cultura jovem, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, transferidos para tubo com água estéril (10 mL), e homogeneizado em agitador de tubos. A suspensão conidial foi então filtrada, com auxílio de gaze estéril, para remoção das hifas. A suspensão foi então homogeneizada e ajustada para $1,4 \times 10^6$ células/mL pela adição de salina, e utilizando câmara de Neubauer para a determinação do número de células (LLOP et al., 2000).

4.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Este tem por objetivo determinar qual é concentração mínima de uma substância (em $\mu\text{g/mL}$), que inibe o crescimento bacteriano. O método consiste em se preparar diluições seriadas da amostra a ser testada (chalconas sintéticas e seus análogos), em meios de cultura sólidos, semear a bactéria ou fungo em estudo, e após incubação, verificar a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do micro-organismo utilizado no ensaio (NCCLS, 1993; ESPINEL-INGROFF; PFALLER, 1995).

As chalconas sintéticas foram dissolvidas em solução de dimetilsufóxido (DMSO) e água destilada (4:6), devido a alta lipofilicidade das mesmas, e adicionadas em séries de 10 frascos com capacidade para 5 mL em diferentes concentrações (25 a 250 μM). Em seguida, a cada frasco foi adicionado 1 mL de meio ágar Mueller-Hinton para as bactérias e 1 mL de ágar Sabouraud dextrosado para as leveduras e fungos filamentosos, seguido de imediata homogeneização da mistura. Após a solidificação dos respectivos meios de cultura, os micro-organismos, previamente ativados, foram inoculados com alça calibrada de 1 μL , sendo então, incubados a 37 °C por 18 a 24 horas para as bactérias, e 25 °C por 24 a 48 horas para os fungos leveduriformes, e 25 °C por período de 5 a 15 dias para os fungos filamentosos. A concentração final de DMSO nos ensaios não excedeu 2%.

Após o período de incubação, efetuou-se a leituras da concentração inibitória mínima através da observação da presença ou não de crescimento visível. Para interpretação dos resultados foi considerada como concentração inibitória mínima aquela que inibir totalmente o crescimento microbiano.

Como controle positivo empregou-se frascos com os micro-organismos inoculados sem a presença das substâncias teste. A leitura dos resultados foi considerada válida somente quando houvesse crescimento microbiano nos controles. Utilizou-se também como controle negativo os antibacterianos Amoxicilina (Sigma A-8523) e Vancomicina (Sigma V-2002), e o antifúngico Cetoconazol (Sigma K-1003). Os ensaios foram repetidos por quatro vezes.

4.7.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Fungicida Mínima (CFM)

O objetivo desde foi determinar a concentração mínima necessária para um substância inviabilizar as células. Para determinar a concentração bactericida mínima ou fungicida mínima, foram selecionadas as culturas que apresentaram resultado positivo para a CIM como descrito no item 4.7.1. Adicionou-se 200 µL de solução salina estéril e realizada suas respectivas subculturas (ágar Mueller-Hinton para as bactérias e ágar Sabouraud dextrosado para os fungos leveduriformes) isento das chalconas e incubadas (bactérias a 37 °C por 18 a 24 horas, fungos leveduriformes em temperatura ambiente por 24 a 48 horas, e fungos filamentosos a temperatura ambiente por 5 a 15 dias). Após a incubação as culturas foram inspecionadas para a verificação visual do crescimento microbiano.

Para a interpretação dos resultados considerou-se que a concentração que inibiu no ensaio de CIM e crescimento do micro-organismo na subcultura (CBM ou CFM) foi bacteriostática ou fungistática e a ausência de crescimento na subcultura foi a concentração bactericida ou fungicida (EUCAST, 2000).

4.8 Avaliação da Toxicidade

4.8.1 Teste de citotoxicidade contra *Artemia salina*

Para realizar esse ensaio de citotoxicidade utilizou-se o microcrustáceo *Artemia salina* Leach. Os ensaios foram realizados conforme o método descrito por Meyer et al. (1982), adaptado às condições de nosso Laboratório, onde uma solução de cada chalcona foi preparada com DMSO, sendo que a concentração final do solvente durante o ensaio não ultrapassou a 1 % (v/v).

Os ovos de *Artemia salina* foram colocados em um frasco contendo água marinha sintética (conforme descrito na Tabela 2) e incubados em banho-maria por 48 horas, com temperatura entre 27 e 30 °C, com 24 horas de iluminação e 1 hora de oxigenação para eclodirem conforme esquema explicativo na Figura 15. Após este período, em microplacas (200 µL), foi acrescentado diferentes concentrações das chalconas (31,25 µg/mL a 1000 µg/mL) e a cada uma delas adicionado entre 6 a 12 larvas do microcrustáceo, e novamente incubado em temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) por 24 horas.

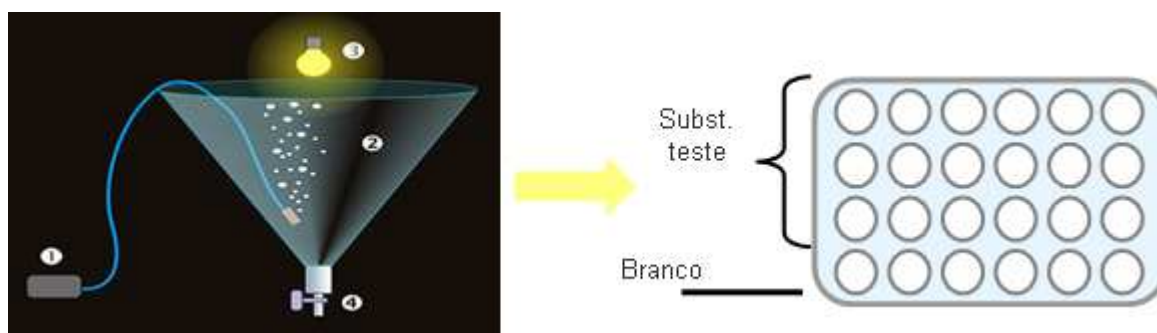


Figura 10: Processo ilustrativo da avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*.

Legenda: 1: Oxigênio, 2: Banho-maria, 3: iluminação e 4: Válvula de liberação das larvas.

O resultado foi obtido através da contagem do número de indivíduos vivos e mortos de *Artemia salina* para cada concentração. O ensaio foi realizado por três vezes. Como controle positivo, foi utilizada uma solução de dicromato de potássio com concentrações de 400, 600 e 800 µg/mL, e como controle negativo 200 µL de água marinha sintética. Para o cálculo final da CL₅₀ e seu respectivo intervalo de segurança foi utilizado o método de Próbitos de análise. Para a classificação de

toxicidade foi considerada altamente tóxica a substância com valor de $CL_{50} < 80$ $\mu\text{g/mL}$; moderadamente tóxica quando a CL_{50} variou entre 80 e 250 $\mu\text{g/mL}$, e foi considerado com baixa toxicidade ou não tóxica quando a concentração da substância em análise apresentou $CL_{50} > 250$ $\mu\text{g/mL}$ (Lopes, 2002).

4.8.2 Teste de citotoxicidade contra *Saccharomyces cerevisiae*

Para realizar esse ensaio foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Toda a técnica empregada foi adaptada do procedimento escrito por Invittox (1994). As chalconas sintetizadas foram diluídas em água e DMSO (4:6) para aumento da solubilidade. A primeira etapa deste ensaio foi ativação do micro-organismo e preparação do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, como segue na Figura 11.

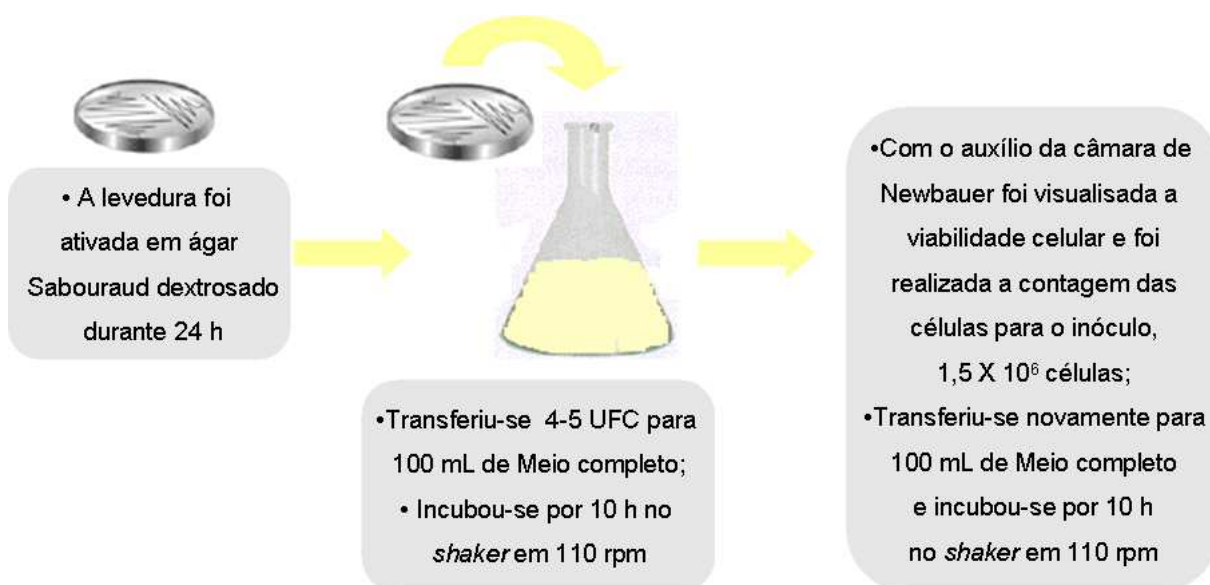


Figura 11: Processo de ativação da levedura e preparação do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Após o preparo do inóculo, transferiu-se para um tubo de ensaio, uma alíquota de 25 μL do mesmo, 125 μL da substância teste (40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sendo que as concentrações das substâncias em análise foram diminuindo conforme o nível de toxicidade apresentada pelas mesmas, sendo 20 μg , 10 μg , 5 μg e 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e o volume final foi alcançado através da adição de quantidade suficiente para 5 mL com meio completo. Desta forma as concentrações correspondentes foram 1000, 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Então, o tubo de ensaio foi vedado e deixado no *shaker*, sob

temperatura de 30 °C. Após este procedimento, nos tempos 0, 1, 2, 8 e 24 horas, foi retirado uma alçada de 1 µL, o qual era diluído em 10 mL de água destilada. Então foi retirado 50 µL dessa solução, com o auxílio de uma micropipeta e posteriormente, semeado em placas com o meio completo, (utilizando-se alça de Drigalski) vertidas e incubadas durante 24 horas sob temperatura ambiente (Figura 12).

Todo o teste foi repetido por três vezes, e em paralelo ao teste com a série de chalconas e seus análogos sintéticos, foi feito um tubo (denominado branco) padrão que demonstrou a proliferação normal da levedura nas condições do método em estudo.

Após determinada a concentração tóxica, uma curva foi obtida da relação da proliferação celular em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) *versus* o tempo de exposição às diferentes concentrações das chalconas.

4.8.3 Citotoxicidade através viabilidade celular das células L929

A determinação do potencial de citotoxicidade sobre as células L929 das chalconas e seus derivados análogos foi realizada através do ensaio Vermelho Neutro (VN). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Farmacologia *in vitro* da UNIVALI sob orientação do Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas.

O ensaio Vermelho Neutro, determina a sensibilidade/viabilidade das células à exposição de uma determinada substância, baseado na habilidade das células viáveis em incorporar o vermelho neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenzaine hidrocloreto) por difusão, acumulando-se intracelularmente e no interior dos lisossomos dessas células. Alterações na superfície celular ou sensibilidade das membranas dos lisossomos geram gradualmente danos irreversíveis para a célula, evoluindo para a morte das mesmas (ZEBET, 2001; INVITTOX, 2007). Dessa forma o valor de absorvância determinado será proporcional ao número de células viáveis restantes.

Para o ensaio de citotoxicidade sobre as células L929, foram avaliadas as chalconas que preliminarmente apresentaram toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina* e contra a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo então testadas as substâncias **1, 3, 8, 9, 10, 14 e 18** (na concentração de 50 µg/µL).

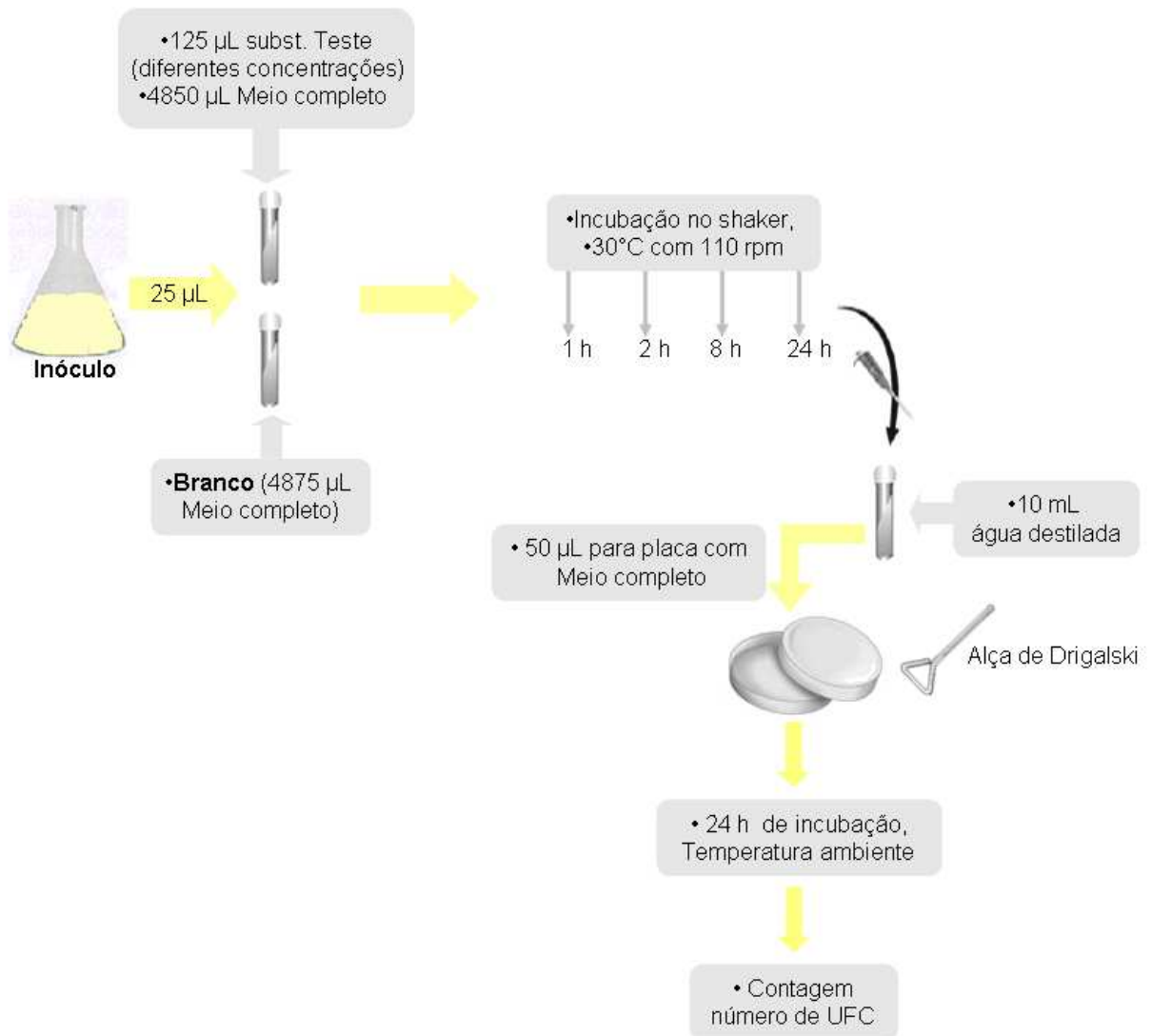


Figura 12: Processo da avaliação da citotoxicidade através da taxa de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*.

As células L929 foram plaqueadas, em placas de 96 poços, a 2×10^4 células/poço e incubadas com 200 μL de meio MEM suplementado com soro fetal bovino a 10 % (SFB) por 24 h a 37 °C em 5 % CO_2 .

A fim de manter todas as células em um mesmo estágio da divisão celular (Go), o meio MEM com SFB foi substituído por 180 μL de meio MEM sem SFB e foram adicionadas 20 μL das substâncias testes na concentração de 1000 μg , controle positivo (*Tween* 20) e do controle negativo (meio MEM sem SFB contendo 1 % PBS), incubadas por 24 h a 37 °C em 5 % CO_2 .

Após a incubação foi retirado o meio e adicionado 200 μL de MEM com solução de Vermelho Neutro (1 %) e incubadas por 4 h a 37 °C em 5 % CO_2 .

O meio juntamente com o vermelho neutro foi retirado e os cristais insolúveis foram dissolvidos em 200 μL de solução dessorvente, composta pelos seguintes reagentes e proporções: 1 % de ácido acético glacial, 50 % de álcool etílico e 49 % de água destilada.

O resultado foi obtido através da determinação da absorbância da cada poço (poços com as substâncias teste, poços com controle positivo e negativo) em leitor de microplacas a 570 nm. Os testes foram repetidos oito vezes.

4.8.4 Teste de Genotoxicidade - Teste de Ames

O teste de Ames caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *Salmonella typhimurium*, sensíveis a substâncias capazes de induzir mutações. Na presença de agentes com capacidade mutagênica, estas linhagens reverterem seu caráter auxotrófico do aminoácido histidina e passam a formar colônias em um meio desprovido deste aminoácido. Desta forma, é possível estabelecer o potencial de indução mutagênica da substância teste em função de sua concentração, através da contagem de colônias revertentes na placa (MARON; AMES, 1983; MOREIRA et al., 2002; GENOTOX - ALAC, 2004).

Para a realização desse ensaio de mutagenicidade foram utilizadas três diferentes linhagens da bactéria Gram-negativa *Salmonella typhimurium*, cada uma delas com um tipo diferente de mutação no *operon* da histidina - TA97 e TA98 com defasagem no quadro de leitura; TA100 com substituição de pares de bases, sendo todas as cepas dependentes de histidina. Essas linhagens carregam ainda a mutação *rfa*, que acarreta na perda parcial da barra de polissacarídeos da parede

bacteriana, aumentando sua sensibilidade, também possuem ainda um plasmídeo pKM101 que confere resistência a ampicilina. Assim se torna possível a detecção de agentes mutagênicos (MARON; AMES, 1983; MOREIRA et al., 2002; GENOTTOX-ALAC, 2004).

Todo o procedimento foi seguido de acordo com o método descrito por Invitox, (2004) adaptado às condições de nosso Laboratório.

Durante toda a fase de pesquisa desse estudo, as três linhagens da *Salmonella typhimurium* (TA 97, TA 98 e TA 100) foram armazenadas no meio NB Oxoid CM 67, em temperatura de 4 °C e foram rotineiramente testadas para a sua característica de dependência do aminoácido histidina como na ilustração que segue (Figura 13).

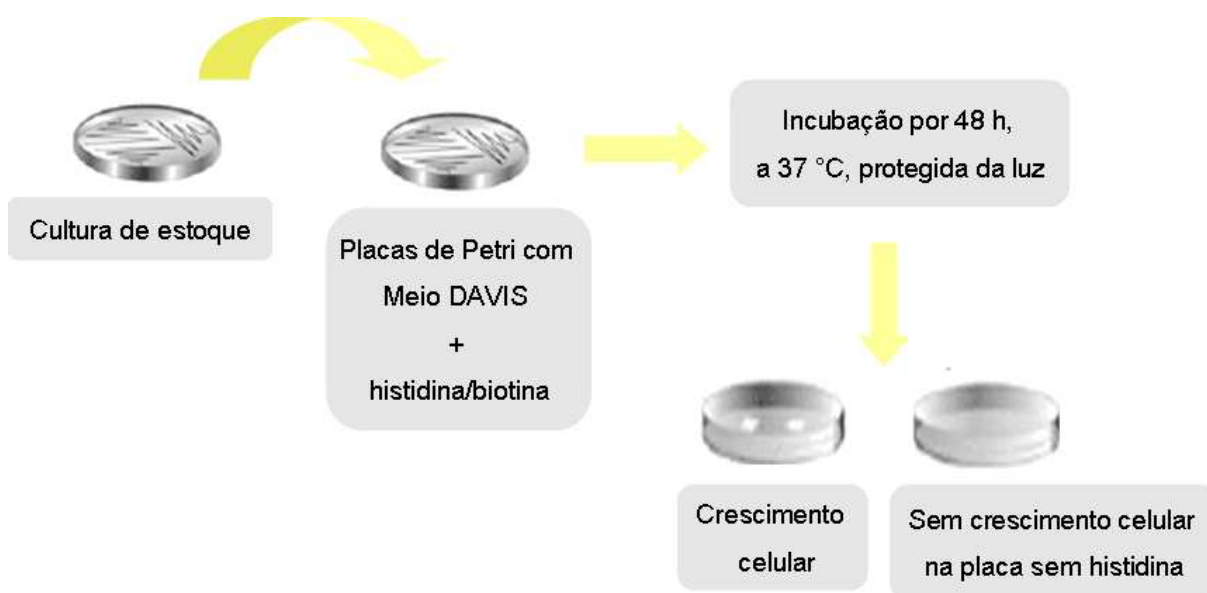


Figura 13: Procedimento de comprovação da pureza e carência de histidina pelas linhagens TA 97, TA 98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium*.

A primeira etapa deste ensaio consistiu em ativar as linhagens utilizadas e preparar o inóculo das mesmas. Para tanto, entre 4 e 5 colônias da placa de conservação foram transferidas com auxílio de uma alça de platina para um tubo de ensaio com caldo NB e ampicilina, e incubado em *skaker* por 10 horas, a temperatura de 37 °C e a 110 rpm. Após esse período se obteve o inóculo, ajustando-se o número de células entre 1 e 2×10^9 células/mL através do espectrofotômetro a 520 nm. Do inóculo, alíquotas de 100 µL foram adicionadas em uma série de tubos de ensaio com 10 µL das substâncias à diferentes concentrações

(diluídos em água e DMSO 4:6). As concentrações finais para cada substância foram equivalentes a 5000, 2500, 100, 500 e 80 µg/mL). Posteriormente os tubos foram pré-incubados entre 20 e 30 minutos em banho-maria, à temperatura de 37 °C, protegidos da luz. Em seguida, no próximo passo foi adicionado aos tubos, 2 mL de ágar de Superfície, homogeneizado e vertido numa placa com meio Davis e incubado por 48 horas, a 37 °C, protegida da luz (Figura 14). Depois efetuou-se a contagem das UFC revertentes para a determinação do Índice de Mutagenicidade, que foi obtido através da seguinte equação:

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de revertentes induzidos}}{\text{Número de revertentes espontâneos do controle negativo}}$$

De acordo com Borgo, Rosa e Vargas (2004) e Jayaprakasha, Negi e Jena (2006), o IM = 1,0 ou muito próximo, indica que não houve indução de revertentes; IM entre <0,6 e 0,7 pode ser indicativo de toxicidade, e IM > 1,0 pode indicar indução de revertentes e com um IM ≥ 2,0 a substância é considerada mutagênica.

Todo o ensaio foi realizado por três vezes, na presença de controle negativo (Dimetilsulfóxido 10 µL) e positivo (Azida sódica 1 µg), a fim de confirmar a capacidade de resposta das linhagens.

4.8.4.1 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do Teste de Dunnett com o objetivo de obter a variância do número de revertentes induzidos pelas chalconas e seus análogos sintéticos contra o número de revertentes induzidos pelo controle negativo (DMSO).

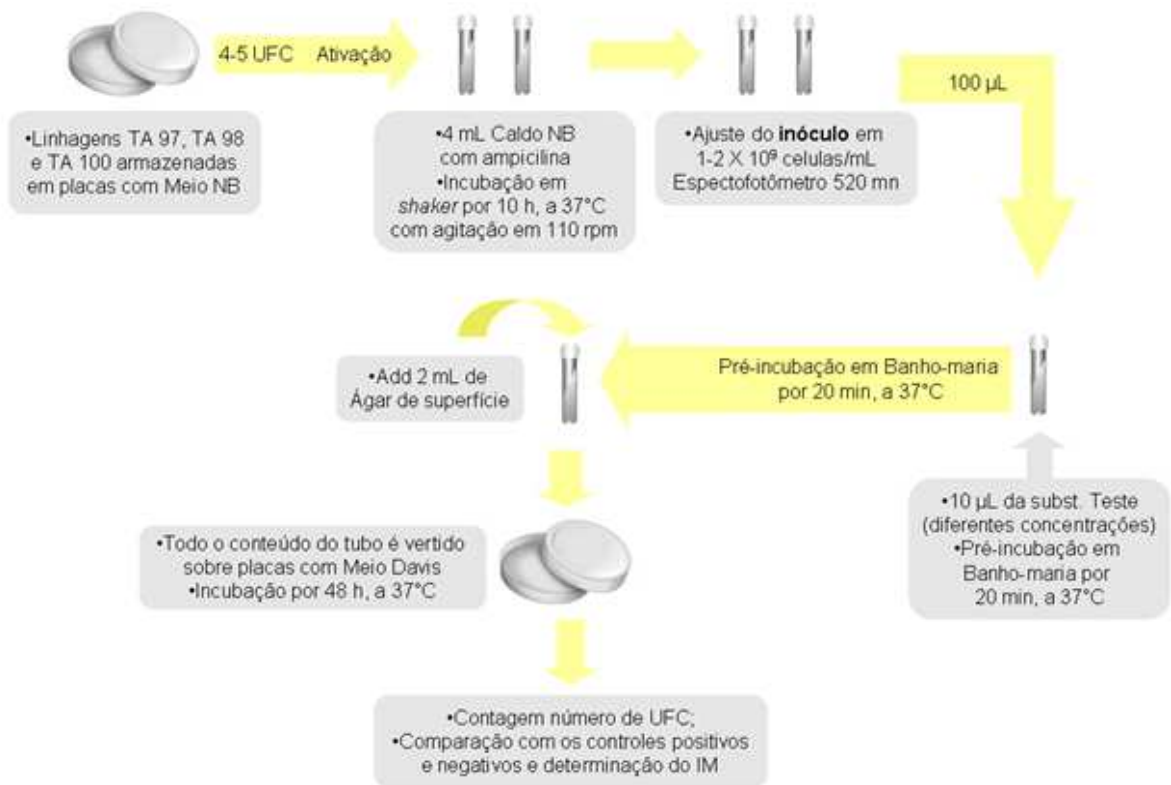


Figura 14: Processo da avaliação do índice de mutagenicidade (IM) pelo Teste Ames.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o fato que a maioria dos antimicrobianos de uso clínico são ativos a um nível de 10 µg/mL, e que se uma substância não apresente atividade até 100 µg/mL é pouco provável que ela seja uma candidata ao uso terapêutico (MITSCHER et al., 1972; RIOS; RECIO, 2005), e que outros autores consideram que a concentração CL₅₀ deve ser de 25 µM como critério de boa atividade (COS et al., 2006). Foi determinado como parâmetro na triagem realizada foi: valores de CIM ≤ 25 µM, boa atividade; 25 µM < CIM ≤ 250 µM, moderada atividade e valores de CIM > 250 µM, inativa.

O parâmetro acima descrito foi adotado, com o objetivo de identificar as moléculas com potencial de atividade antibacteriana e antifúngica. Mesmo quando consideradas com atividade moderada as moléculas podem vir a delinear modificações estruturais com o objetivo do aumento da atividade e diminuição da toxicidade se for o caso.

5.1 Triagem de Atividade Antibacteriana

Para todas as espécies bacterianas testadas Gram-negativas e Gram-positivas a CIM dos análogos sintéticos testados foi maior que 250 µM, portanto sendo considerados inativos até a concentração máxima testada (250 µM), contrariando algumas pesquisas recentes.

Vários autores descrevem atividade antibacteriana de chalconas sintéticas e isoladas de plantas. Segundo Nielsen et al. (2004), as chalconas 4'-carboxi-3,5-bis-trifluorometil-chalcona e 4'-carboxi-3,5-dibromo-chalcona apresentaram atividade com CIM de 2 µM sobre *Staphylococcus aureus*, que pode ser considerado muito bom.

Tsukiyama et al. (2002), demonstrou atividade da Licochalcona A sobre várias espécies Gram-positivas e negativas, com destaque para *S. aureus* e *Streptococcus mutans* com CIM de 3 e 5 µg/mL respectivamente e *Bacillus coagulans* e *Bacillus subtilis* com 2 µg/mL.

A atividade antibacteriana de chalconas descrita por Tsukiyama et al. (2002) e Nielsen et al. (2004) sugere que a ausência de atividade das chalconas sintéticas estudadas nesse trabalho se deva, principalmente, a efeitos provocados pelos radicais adicionados aos dois anéis da estrutura geral das chalconas, ao anel da carbonila denominado de anel A e anel B da porção olefínica.

Nielsen et al. (2004; 2005) e Nowakowska et al. (2007), observaram que dois parâmetros químicos modularam a atividade antibacteriana da série de chalconas testadas pelos mesmos. (I) O caráter lipofílico dos substituintes do anel B das chalconas, expressada por $\log P$ associado ao efeito sacador de elétrons dos substituintes parece ser essencial para o potencial antibacteriano, sendo que as chalconas com maior lipofilicidade obtiveram maior atividade antibacteriana; (II) A posição dos substituintes no anel B das chalconas é um fator modulador do potencial de atividade das chalconas, sendo que substituições na posição *orto* (*o*) é ideal para a inibição do crescimento bacteriano, e quando dispostos nas posições *meta* (*m*) e *para* (*p*) têm a atividade diminuída ou totalmente inexistente.

Os valores de $\log P$ das chalconas testadas se encontram dentro da escala de Lipinski, que diz que os fármacos necessitam para boa permeação celular, $\log P$ entre 0 e 5, indicando moléculas com lipofilicidade adequada para interação com a membrana e parede bacterianas, já que são constituídas basicamente substâncias hidrofóbicas e apolares (SCHAECHTER et al., 2002; LIPINSKI et al., 2001; TRABULSI, 2005). Entretanto, os substituintes dos dois anéis das chalconas A e B estão dispostos na posição *para*, sugerindo que esse é o principal fator responsável pela ausência de atividade das mesmas.

Outro fator a ser considerado é a resistência natural das bactérias. Existem muitos mecanismos de resistência natural (I) Presença no espaço periplasmático de enzimas que inativam o agente antimicrobiano (FLUIT; VISSER, SCHMITZ, 2001; TRABULSI, 2005); (II) Modificação do alvo celular, por exemplo, algumas Gram-positivas e anaeróbias, onde o agente antimicrobiano não consegue atingir o interior celular em concentração suficiente para causar um dano fatal (GERMAN-FATTAL, 1998; VAN BAMBAKE et al., 2003); (III) Redução da permeabilidade do agente antimicrobiano por falta de afinidade química, por exemplo, bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa* têm dificuldade de difundir para o interior de suas células, moléculas hidrofóbicas com grande peso molecular, devido à polaridade da parte externa da membrana e moléculas hidrofílicas devido a

constituição lipofílica da parede celular (KUMAR; SCHWEIZER, 2005; TRABULSI, 2005); (IV) Outro mecanismo natural de resistência é a “Bomba de efluxo”, comum para ambas as bactérias Gram-negativas e positivas, e que dá a esses microorganismos a habilidade de limitar o acesso do agente antimicrobiano no seu alvo celular (VAN BAMBEKE; BALZI; TULKES, 2000). Esse sistema expulsa por difusão, moléculas anfifílicas do espaço periplasmático, evitando a permeação para o citoplasma pelas mesmas em concentração suficiente para exercer uma atividade letal à célula (VAN BAMBEKE; MICHOT; TULKENS, 2003; HOGAN; KOLTER, 2002; VAN BAMBEKE et al., 2003).

No caso das bactérias Gram-negativas, sua resistência tem sido associada, principalmente, à existência de uma segunda membrana composta por lipopolisacarídeos (comumente denominada de “membrana externa”) que recobre a camada de peptidoglicano, fornecendo proteção extra à célula. Substâncias hidrofóbicas têm dificuldade de penetrarem no interior da célula devido à polaridade da porção externa da membrana, em contrapartida substâncias hidrofílicas também têm dificuldade de difusão devido ao caráter apolar da parte interna da membrana (SCHAECHTER et al., 2002; KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

5.2 Triagem de Atividade Antifúngica

Em relação aos fungos leveduriformes nenhuma das chalconas e seus análogos testados apresentou potencial inibitório, sendo o valor identificado de CIM maior que 250 μM .

Batovska et al. (2007) e Nowakowska et al. (2007) estudaram os efeitos dos substituintes do anel A e B das chalconas sobre *Candida albicans* e observaram que os substituintes do anel A, não provocaram influência no potencial de atividade, sendo os substituintes do anel B das chalconas que modulam a atividade sobre a *C. albicans*. Segundo Batovska et al. (2007) a atividade antifúngica está correlacionada com a posição do substituinte hidroxil no anel B da chalcona, sendo a posição *orto* a mais favorável, as CIM das substâncias oscilaram entre 31,0 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

Batovska et al. (2007) observaram que a potência das chalconas sobre *Candida albicans* é dependente da habilidade da molécula em interagir com o grupo

sulfidril de proteínas formadoras da membrana celular.

Assim sugere-se que a ausência de atividade dos grupos amino, acetamido e nitro-chalconas testadas nesse estudo se deva principalmente aos efeitos eletrônicos dos substituintes ou a impedimentos estéricos dos mesmos provocados pelos substituintes do anel B das chalconas na posição *para*.

Embora a nova série de chalconas e seus derivados análogos não tenham apresentado atividade contras às leveduras testadas, apresentaram atividade inibitória interessante sobre o crescimento dos fungos dermatófitos. Os resultados estão dispostos na Tabela 3.

Conforme pode ser observado na Tabela 3, dentre as cinco espécies de fungos filamentosos testadas, as chalconas apresentaram ação antifúngica contra quatro delas, sendo que apenas para o gênero *Rhizopus* foi resistente.

Observou-se que as chalconas **8**, **14** e **21** apresentaram atividade antifúngica contra o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, com valores de CIM iguais a 187,59; 239,38 e 248,34 μM , respectivamente. É importante ressaltar que *Aspergillus* sp. é considerado um gênero causador de infecções invasivas que ocorrem predominantemente em pacientes imunodeprimidos. Devido a inalação dos conídios, esses pacientes podem vir a desenvolver infecções que atingem principalmente o sistema respiratório com índices de mortalidade superior a 50% (SHAO, HUANG, HSUEH, 2007).

As chalconas e seus derivados análogos apresentaram também atividade inibitória contra os fungos filamentosos dermatófitos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*. Os dermatófitos compõem um grupo taxonomicamente relacionados com a capacidade de invadir o extrato córneo da pele e outros tecidos queratinizados (pele, pêlo e unha) dos homens e animais produzindo infecções denominadas dermatofitoses. Esses tipos de Infecções se tornam um problemas de saúde complexo a medida que crescem em escala global (COSTA et al., 2002; PAKSHIR; HASHEMI, 2006).

O dematófito *M. canis* teve seu crescimento inibido pelas chalcona **10** com CIM igual a 75 μM e pelo análogo **18**, que apresentou CIM a e 147,24 μM . Esse fungo pode causar uma infecção capilar denominada de *Kerion Celsi*, que acomete geralmente crianças de forma casual (MELLO-MONTEIRO et al., 2003).

Com relação ao gênero *Trichophyton*, ambas as espécies *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, sofreram ação inibitória das chalconas. As chalconas **2** e **10**,

apresentaram atividade inibitória sobre *T. mentagrophytes* com CIM de 158,1 e 75 μM , respectivamente. O fungo *T. rubrum* sofreu inibição das chalconas **4**, **10**, **20** e **21** com valores de CIM respectivamente iguais a 84,2; 75; 141,2 e 62,08 μM .

É válido mencionar que os dermatófitos crescem exclusivamente no extrato córneo, pele, unhas ou fios de cabelo, e que produzem enzimas hidrolíticas que degradam e lesionam os tecidos queratinizados requerendo tratamentos longos (MURAY et al., 2002; ZAUGG et al., 2007).

Analisando a Tabela 3 observam-se algumas correlações entre as chalconas e seus derivados análogos que mostraram atividade antifúngica. Considerando influência dos radicais substituintes nas modificações no anel A das chalconas, sugere-se que as diferenças entre os radicais adicionados à estrutura geral das chalconas não exercem importantes efeitos no potencial de atividade em toda a série de chalconas testadas nesse estudo (**1 - 9** e **10 - 17**).

Considerando a influência dos radicais substituintes dos anéis A e B das chalconas, interessantes correlações estrutura-atividade puderam ser observadas:

I. Decréscimo da atividade foi observada com a inserção de radical na posição *meta* do anel B, como observado na substância **5** (CIM > 250 μM) comparada com **4** (CIM = 77,6 μM sobre *T. rubrum*), sugerindo que um radical nessa posição pode gerar algum efeito estérico à molécula.

II. Grupos doadores de elétrons no anel A, tendem a diminuir a atividade antifúngica, como pode ser observado na Tabela 3. Salvo uma exceção, a chalcona **2** (CIM = 158,1 μM sobre *T. mentagrophytes*) que comparada ao seu análogo (**11**) apresentou aumento da atividade com a inserção do grupo doador de elétrons, o radical amino, na posição *para* do anel A das chalconas.

Tabela 3: Valores de CIM e CFM para fungos filamentosos.

Substância	Log P	Substituinte		CIM / CFM (µM)				
		R'	R	A. n	M. c	T. m	T. r	R. sp
1	3,26 ± 0,37	4-NH ₂	H	>250	> 250	> 250	> 250	> 250
2	3,20 ± 0,38	4-NH ₂	4-CH ₃ O	> 250	> 250	158,1/236,8	> 250	> 250
3	3,72 ± 0,38	4-NH ₂	4-CH ₃	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
4	3,78 ± 0,39	4-NH ₂	4-Cl	> 250	200	77,6/232,8	232,8/349,2	> 250
5	4,26 ± 0,41	4-NH ₂	3,4-Cl	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
6	3,03 ± 0,41	4-NH ₂	4-NO ₂	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
7	3,76 ± 0,46	4-NH ₂	4-N(CH ₃) ₂	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
8	2,88 ± 0,39	4-NH ₂	Furil	187,5/281,3	> 250	> 250	> 250	> 250
9	3,07 ± 0,56	4-NH ₂	Tienil	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
10	3,31 ± 0,37	4-NHCOCH ₃	H	> 250	75	75	75	> 250
11	3,26 ± 0,38	4-NHCOCH ₃	4-CH ₃ O	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
12	3,77 ± 0,38	4-NHCOCH ₃	4-CH ₃	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
13	3,84 ± 0,39	4-NHCOCH ₃	4-Cl	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
14	4,32 ± 0,41	4-NHCOCH ₃	3,4-Cl	239,3/299,2	> 250	> 250	> 250	> 250
15	3,09 ± 0,41	4-NHCOCH ₃	4-NO ₂	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
16	3,82 ± 0,46	4-NHCOCH ₃	4-N(CH ₃) ₂	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
17	2,93 ± 0,39	4-NHCOCH ₃	Tienil	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
18	3,13 ± 0,56	4-NHCOCH ₃	Furil	> 250	147,2/221,1	> 250	> 250	> 250
19	3,79 ± 0,40	H	4-NO ₂	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
20	3,96 ± 0,41	4-CH ₃ O	4-NO ₂	> 250	> 250	> 250	141,2/211,8	> 250
21	5,23 ± 0,42	4-CH ₃	4-NO ₂	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
22	4,25 ± 0,40	3,4-Cl	4-NO ₂	248,3/310,4	> 250	> 250	62,08	> 250
23	4,01 ± 0,47	4-F	4-NO ₂	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250

Legenda: A. n.: *Aspergillus niger*; M. c.; *Microsporium canis*, T. m.: *Trichophyton mentagrophytes*; T. r.: *Trichophyton rubrum*; R. sp.: *Rhizopus* sp.

III. A inserção de halogênio na posição *meta* do anel A, aumentou a atividade, sugerindo que esse efeito seja conseqüente do aumento do *log P* promovido pela presença do átomo de cloro nessa posição. Segundo Korolkovas e Burckhalter (1988) e Thomas (2003), radicais halogênicos, facilitam a interação da molécula com biomembranas por aumentar sua lipofilicidade.

Comportamento semelhante ao descrito anteriormente, foi observado por Lopes et al. (2001) que avaliaram a atividade de chalconas obtidas a partir de substituições nos anéis A e B da 1,3-difenil-2-propen-1-ona sobre fungos oportunistas. Nesse estudo os autores observaram que grupos químicos elétrons-doadores tendem a enfraquecer a atividade antifúngica; e que grupos elétrons-sacadores na posição *para*, aumentam o potencial de atividade.

Considerando os resultados encontrados em nosso trabalho e baseado na literatura, sugerem-se outras adições de radicais nas moléculas das chalconas que apresentaram potencial de atividade antifúngica, especificamente na posição *orto* e *meta* dos anéis A e B, a fim de aumentar sua atividade e diminuir o potencial tóxico das mesmas.

5.3 Avaliação de Toxicidade

5.3.1 Teste de toxicidade através *Artemia salina*

A comunidade científica tem se preocupado com questões éticas e morais que envolvem o uso de animais em algumas pesquisas científicas. Dessa forma, métodos alternativos que empregam outros vertebrados, como os crustáceos têm sido crescentemente utilizados e aceitos (PELKA et al., 2000). Para ensaios de atividade farmacológica e toxicidade de novos fármacos desenvolvidos, larvas do microcrustáceo *Artemia salina* têm sido comumente usadas (NIVEA MORENO et al., 2005; QUIROGA et al., 2006; SOBERA et al., 2007). A dose tóxica para *Artemia salina* está em intervalo de 10 -100 vezes mais elevados em comparação com métodos de culturas celulares humanos e de outros animais (CARBALLO et al., 2002).

Para a avaliação da citotoxicidade da nova série de chalconas e seus derivados análogos, através do emprego de larvas do microcrustáceo *Artemia salina*,

as concentrações das substâncias variaram entre 31,25 µg/mL e 1000 µg/mL. Para obtenção da CL₅₀ e seus respectivos intervalos de confiança foi utilizado o método de Próbitos.

Tabela 4: Valores de CL₅₀ das chalconas frente à *Artemia salina*.

Substância	Tipo de Chalcona	CL ₅₀ (µg/mL)
1	4'-amino	31,25 (12,65 – 49,35)
2	4'-amino	31,25 (12,65 – 49,35)
3	4'-amino	31,25 (12,65 – 49,35)
8	4'-amino	62,94 (20,85 – 82,85)
9	4'-amino	62,94 (20,85 – 82,85)
10	4'-acetamido	98,28 (61,04 – 143,26)
17	4'-acetamido	795,49 (153,14 – 1437,85)
18	4'-acetamido	888,09 (349,86 – 1417,69)

Como pode ser observado na Tabela 4, as chalconas que apresentaram toxicidade elevada foram aquelas com valores de CL₅₀ de 31,25 µg/mL (**1**, **2** e **3**) e 62,94 µg/mL (**8** e **9**). A chalcona **10** com valor de CL₅₀ de 98,28 µg/mL foi considerada toxicidade moderada, seguida das demais (**17** e **18**) com CL₅₀ maiores que 795,49 µg/mL CL₅₀ foram consideradas de baixa toxicidade.

As amino-chalconas apresentaram maior toxicidade quando comparado com as acetamido-chalconas. Praticamente todas as amino-chalconas com grupo doador de elétron na posição *para* do anel B, bem como aquele sem substituinte foram considerados muito tóxicos.

A citotoxicidade de algumas das chalconas testadas é um dado a ser avaliado com cuidado, pois apesar de serem consideradas tóxicas, poderiam ser avaliadas quanto à capacidade de inibição do crescimento de células tumorais. Muitas chalconas têm apresentado capacidade de inibir a proliferação de células tumorais e outros modelos celulares (DIMMOCK et al., 2003; MONOSTORY et al., 2003). Dimmock e seus colaboradores (2003), analisaram o efeito citotóxico de 4'-amino-chalconas e substâncias relacionadas, onde encontrou potencial de inibição com valores menores que 10 µM. Ainda, segundo os mesmos autores, a inserção de um grupo amino primário no anel A das chalconas, aumentou o potencial inibitório das chalconas testadas.

Analisando as estruturas das chalconas (Figura 19) observa-se que todas possuem na posição *para* do anel A um grupo amino, elétron doador, com exceção da chalcona **10**, que possui um grupo relativamente neutro (acetamido).

Entre os radicais substituintes do anel B não se encontra homogeneidade de características, aparentemente as diferenças de lipofilicidade e efeito eletrônico não influenciaram a atividade do grupo farmacofórico, entretanto com a inserção dos radicais Furil (**8**) e Tienil (**9**) houve diminuição do potencial tóxico.

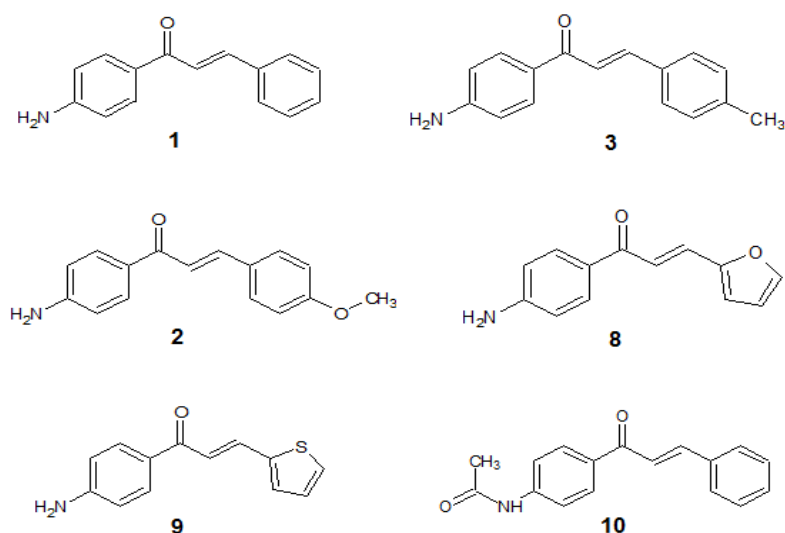


Figura 15: Representação da estruturas químicas das chalconas com atividade citotóxica sobre *Artemia salina*.

5.3.2 Teste de citotoxicidade através da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Outro método empregado para analisar a toxicidade de novas substâncias é avaliar o potencial de inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo Schmitt, Gellert e Lichtenberg-Frate (2005) existe uma boa correlação de pontos finais comparando com outros sistemas teste *in vivo* como peixes, *Daphnia* e algas.

Para determinar o potencial de toxicidade da série de chalconas testadas sobre o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, realizou-se inicialmente uma triagem com concentração máxima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ da substância teste (Figura 16). As chalconas que apresentaram atividade inibitória sobre a proliferação da levedura com a concentração máxima, também foram avaliadas até 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

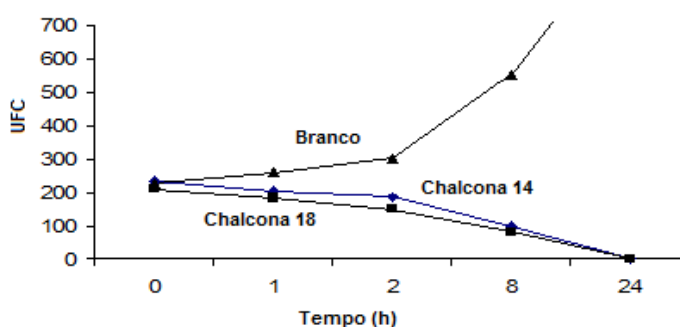


Figura 16: Relação da proliferação celular em UFC da levedura *S. cerevisiae* com as chalconas 14 e 18 a 1000 µg/mL, em função do tempo de exposição.

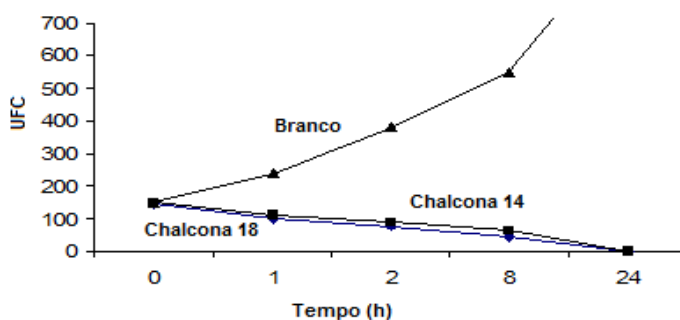


Figura 17: Relação da proliferação celular em UFC da levedura *S. cerevisiae* com as chalconas 14 e 18 a 500 µg/mL, em função do tempo de exposição.

De acordo com as Figuras 16 e 17, pode-se observar que após 24 horas de exposição, as chalconas **14** e **18** apresentaram um potencial de inibição do crescimento da *S. cerevisiae* com 1000 e 500 µg/mL, no entanto as demais chalconas (dados não mostrados) não provocaram nenhuma alteração no crescimento da levedura em nenhuma das concentrações testadas durante todo o tempo de exposição do micro-organismo as mesmas.

Considerando os resultados dos ensaios de toxicidade realizados com as chalconas e seus análogos (teste de toxicidade sobre a *Artemia salina* e sobre *Saccharomyces cerevisiae*) se sugere a avaliação da atividade anticarcinogênica, a fim de avaliar o potencial de inibição da proliferação celular sobre células tumorais.

5.3.3 Citotoxicidade através da viabilidade das células L929

Considerando os índices de absorvância obtidos (entre 1,0 e 2,0) e confrontados com o índice de absorvância do controle positivo (*Tween* 20 = 1,0) (Figura 18), nenhuma das chalconas testadas apresentou potencial de citotoxicidade, uma vez que os valores de absorvância foram estatisticamente ($p < 0,05$) diferentes do *Tween* 20.

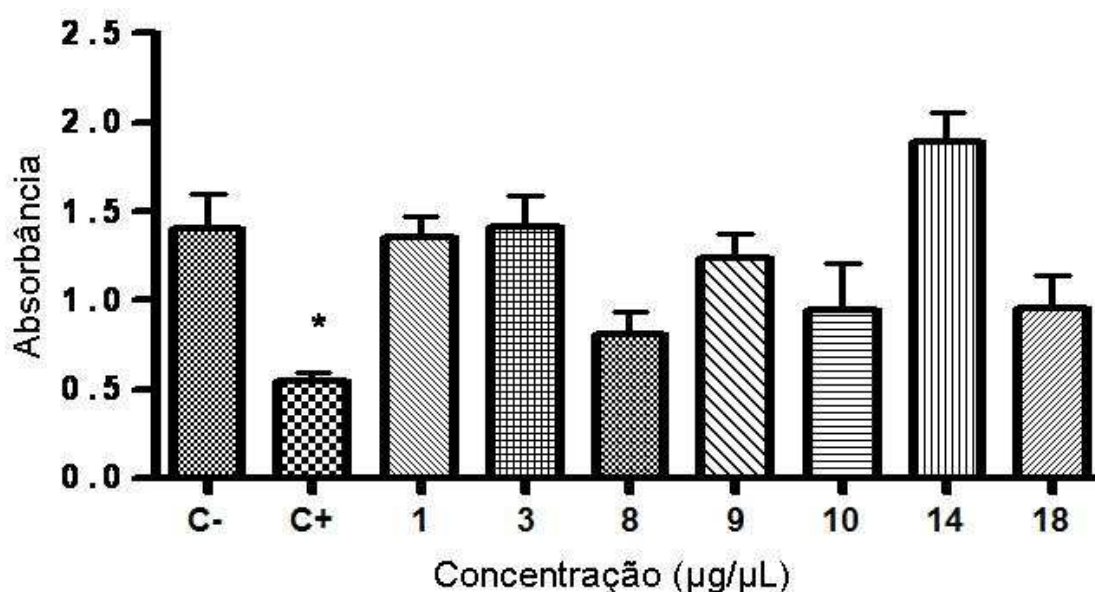


Figura 18: Avaliação da viabilidade celular de das chalconas em células L929 após 2 horas de contato com as chalconas na concentração de 100 µg/mL em estufa 37 °C/5 % CO₂.

Legenda: C-: controle negativo (PBS); C+: controle positivo (*Tween* 20); ANOVA * $p < 0,05$).

A ausência de atividade citotóxica das chalconas testadas sobre as células L929 é um dado importante, pois estimula a continuação de pesquisas com esse grupo químico. Também esse resultado não descarta a possibilidade de atividade inibitória das mesmas sobre outros modelos celulares, como por exemplo, células tumorais.

Das vinte e quatro chalconas testadas, nenhuma apresentou potencial de indução de mutagenicidade até a concentração máxima testada (5000 µg/mL) sobre as linhagens testadas (TA 97, TA 98 e TA 100) da *Salmonella typhimurium*, uma vez que não houve indução de revertentes, com valores do IM que variaram entre 0,85 e 1,0.

Segundo a análise estatística, o valor de $p > 0,05$ (Tabela 4), mostrando que não há diferença estatística entre as médias das chalconas e do controle negativo.

Embora os resultados mostrem que as chalconas estudadas não apresentaram indução mutagênica, o que é considerado importante para a obtenção de fármacos mais seguros, ainda são necessários estudos de genotoxicidade com ativador S9 (preparado de enzimas microsomal e citossólica de fígado de rato), pois Rashid e colaboradores (1986) testaram diversas substâncias e entre elas a nitro-chalcona **19** que apresentou forte indução mutagênica na concentração de 1000 µg/mL quando na presença de S9.

5.3.4 Teste de Genotoxicidade - Teste de Ames

Das vinte e quatro chalconas testadas, nenhuma apresentou potencial de indução de mutagenicidade até a concentração máxima testada (5000 µg/mL) sobre as linhagens testadas (TA 97, TA 98 e TA 100) da *Salmonella typhimurium*, uma vez que não houve indução de revertentes, com valores do IM que variaram entre 0,85 e 1,0.

Segundo a análise estatística, o valor de $p > 0,05$ (Tabela 4), mostrando que não há diferença estatística entre as médias das chalconas e do controle negativo.

Embora os resultados mostrem que as chalconas estudadas não apresentaram indução mutagênica, o que é considerado importante para a obtenção de fármacos mais seguros, ainda são necessários estudos de genotoxicidade com ativador S9 (preparado de enzimas microsomal e citossólica de fígado de rato), pois Rashid e colaboradores (1986) testaram diversas substâncias e entre elas a nitro-chalcona **19** que apresentou forte indução mutagênica na concentração de 1000 µg/mL quando na presença de S9.

Tabela 5: Análise estatística do Teste de Ames na avaliação do potencial de indução mutagênica sob diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*.

Substância	Revertentes induzidos / <i>S. typhimurium</i> (UFC)		
	TA 97	TA 98	TA 100
1	153 ± 2,15	40 ± 3,215	153 ± 4,0
2	153 ± 3,055	42 ± 2,0	150 ± 2, 309
3	152 ± 3,0	41 ± 3,055	151 ± 2,517
4	150 ± 2,082	42 ± 1,528	150 ± 3,606
5	152 ± 3,0	41 ± 2,0	153 ± 3,464
6	152 ± 3,055	42 ± 1,528	149 ± 3,512
7	152 ± 3,055	40 ± 1,528	151 ± 2,082
8	155 ± 2,646	40 ± 1,528	153 ± 4, 041
9	150 ± 3,215	42 ± 2,517	150 ± 2,517
10	153 ± 3,055	40 ± 1,0	152 ± 1,528
11	153 ± 4,0	43 ± 3,055	154 ± 3,215
12	153 ± 3,512	41 ± 2,082	152 ± ,215
13	152 ± 2,517	41 ± 2,0	150 ± 2,517
14	153 ± 2,517	41 ± 2,082	153 ± 3,0
15	150 ± 3,215	40 ± 2,082	154 ± 1,528
16	155 ± 3,055	41 ± 2,082	152 ± 4,3
17	155 ± 2,517	42 ± 2,0	153 ± 3,786
18	152 ± 3,0	40 ± 3,215	157 ± 3,055
19	154 ± 3,512	40 ± 1,528	156 ± 3,612
20	152 ± 2,082	40 ± 3,055	153 ± 3,055
21	153 ± 1,0	41 ± 3,055	154 ± 1,528
22	153 ± 1,15	42 ± 1,0	151± 3.512
23	153 ± 3,6008	41 ± 2,0	152 ± 3,512
Controle	150 ± 3,215	42 ± 2,517	151 ± 3,055

Legenda: UFC (Unidades Formadoras de Colônias) Controle, (Controle negativo, DMSO)

6 CONCLUSÃO

- Para todas as espécies bacterianas testadas (Gram-negativas e Gram-positivas) e para os fungos leveduriformes, as vinte e quatro chalconas e seus derivados análogos, não apresentaram atividade inibitória até a concentração máxima testada (250 µM);
- Através da diluição em ágar, as chalconas **8**, **14** e **22** apresentaram atividade contra o fungo *Aspergillus niger*. Os análogos **1**, **10** e **16** apresentaram potencial inibitório sobre *Microsporum canis*. Para *Trichophyton mentagrophytes* as chalconas ativas foram **2**, **3** e **10**, e para o fungo *Trichophyton rubrum*, as substâncias ativas foram **3**, **10**, **20** e **21**;
- A chalcona **10** (*N*-{4-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enoil]fenil}acetamida) foi a que apresentou maior potencial de atividade antifúngica que apresentou atividade inibitória sobre os fungos *M. canis*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* com CIM equivalente a 75 µM;
- O fungo mais sensível foi o *Trichophyton rubrum*, que teve seu crescimento inibido por quatro chalconas (**4**, **10**, **20** e **21**) com valores de CIM equivalentes a 84, 285, 75, 141,2 e 62,06 µM, respectivamente;
- No teste de citotoxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*, as chalconas **1**, **2**, **3**, **8** e **9** foram consideradas altamente tóxicas uma vez que apresentaram CL₅₀ entre 31,25 e 62,94 µg/mL, seguidas pela substância **10** com CL₅₀ 98,28 µg/mL, sendo considerada toxicidade moderada;
- Na avaliação de citotoxicidade sobre *Saccharomyces cerevisiae*, os análogos **14** e **18** apresentaram potencial tóxico com 40 µg/µL;
- No teste de citotoxicidade com as células L929, nenhuma das chalconas e seus análogos apresentaram potencial de citotoxicidade;
- Nenhuma das vinte e quatro chalconas estudadas apresentou capacidade de

indução mutagênica no teste Ames.

REFERÊNCIAS

ALÓS, J. I.; CARNICERO, M. Consumo de Antibióticos y Resistência a los Antibióticos: Algo que te Concieme. **Medicinal Clinical**, v. 7, n. 109, p.264-270, 1997.

ANDERSON, J. B. Evolution of Antifungal Drug Resistance: Mechanisms and Pathogen fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 547-556, 2005.

BARON, S. **Medical microbiology**. 4th ed. The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed>>

BATOVSKA, D.; PARUSHEV, S. T.; SLAVOVA, A.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; NINOVA, M.; NAJDENSKI, H. Study on the Substituents Effects of a Series of Synthetic Chalcones Against the Yeast *Candida Albicans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 87-92, 2007.

BELOFSKY, G.; PERCIVILL, D.; LEWIS, K.; TEGOS, G. P.; EKART, J. Phenolic Metabolites of *Dalea Versicolor* That Enhance Antibiotic Activity Against Model Pathogenic Bacteria. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 481 -484, 2004.

BHAKUNI, D. S.; CHATURVEDI, R. Chemical Constituents of *Crotolaria Madurensis*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 4, p. 585-591, 1984.

BHAT, B. A.; DHAR, K. L.; PURI, S. C.; SAXENA, A. K.; SHANMUGAVEL, M.; QAZI, G. N. Synthesis and Biological of Chalcones an Their Derived Pyrazoles as Potential Cytotoxic Agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n.12, p. 3177-3180, 2005.

BOECK, P.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; LOPEZ, S.; SORTINO, M.; ESCALANTE, A.; FURLAN, R. E. L.; ZACCHINO, S. Antifungal Activity and Studies on Mode of Action of Novel Xanthoxylone-derived Chalcones. **Archiv der Pharmazie**, v. 338, n. 2-3, p. 87-95, 2005.

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; TORESSANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of Chalcone Analogues with Increased Antileishmanial Activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 5, p. 1538-1545, 2006.

BRESOLIN, T. M. B., CECHINEL FILHO, V. **Ciências farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2003. 109-166.

CAMPOS, J. P.; TONINI, P. P. **Avaliação da atividade antinociceptiva de chalconas sintéticas: análise da relação estrutura-atividade**. 2003. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Farmácia, Universidade do vale do Itajaí, Itajaí, 2003.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L. H.; PÉREZ, P., GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A Comparison Between two Brine Shrimp Assays to Detect *in vitro* Cytotoxicity in Marine Natural Products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 17, p. 1-5, 2002.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2005. 1132 p.

CESARIN-SOBRINHO, D.; NETTO-FERREIRA, J. C. Fitoquímica de Chalconas Fluoradas na Estado Sólido. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 62-68, 2002.

CHRISTIAN, M. S.; DIENER, R. M. Soaps and Detergents – Alternatives to Animal Eye Irritation Tests. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 15, p. 1-44, 1996.

CHRISTIAN, T.; MAHABIR, P. G.; HOSTETTMANN, K. Antifungal Benzoic Acid Derivatives from *Piper dilatatum*, **Phytochemistry**, v. 38, n.1, p. 350-353, 1998.

COS, P.; VLIOTINCK, A. J.; BERGHU, D. V.; MAES, L. Anti-infective of Natural Products: How to Develop a Stronger *in vitro* “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290 – 302, 2006

COSTA, M.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; MIRANDA, A. T. B.; LEMOS, J. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G.; SILVA, M. R. R. Epidemiologia e Etiologia das Dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 1. Uberaba Jan./Feb. 2002.

COUTINHO, C.; DALL’AGONOL, R. **Avaliação da ação de chalconas sintetizadas no NIQFAR sobre os níveis séricos de colesterol em animais de laboratório**. 2001. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2001.

DIMMOCK, J. R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M. Bioactivities of Chalconas, **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 1125-49, 1999.

DIMMOCK, J. R.; JÁ, A.; ZELLO, G. A.; ALLEN, T. M.; SANTOS, C. L.; BALZARINI, J.; DE CLERCO, E.; MANAVATHU, E. K.; STABLES, J. P. Cytotoxic 4’aminochalcones and Related Compounds. **Pharmazie**, v. 58, p. 227-232, 2003.

ESPINEL-INGROF, A.; PFALLER, M.A. Antifungal Agents and Susceptibility Testing. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 6 ed. Washington: ASM, 1995.

ELSOHLY, H. N.; JOSHI, A. S.; NIMROD, A. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Antifungal Chalcones from *Maclura tinctoria*. **Planta Medica**, v. 67, n.1, p. 87-89, 2001.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST). Definitive document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. 9, p. 503-508, 2000.

FONSECA, A. L. **Antibióticos na clínica diária**. 6ª Edição. Rio de Janeiro: EPUB, EPUME, 1999. 468p.

FLUIT, A. D. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FRIIS-MÖLLER A.; CHEN, M.; FUURSTED, K.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, A. *In vitro* Antimycobacterial and Antilegionella Activity of licochalcone A from Chinese Licorice Roots. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 416-419, 2002.

GERMAN-FATTAL, M. Bacterial Resistance; Changing Clinical Practice. Editorial. Publ. Univ. de Pharmacie; Paris XI, 2005. Gómez LR 1998.

FUKAI, T.; MARUMO, A.; KAITOU, K.; KANDA, T.; TERADA, S.; NOMURA, T. Anti-Helicobacter Pylori Flavonoids from Licorice Extrat. **Life Sciences**, v. 71, n. 12, p. 1449-1463, 2002.

GENOTOX – ALAC, **Bacterial Reverse Mutation Test**, n. 471, 2004

GERMAN-FATTAL, M. Bacterial Resistance: Changing Clinical Praticce. Paris: Editorial Publ. Univ. de Pharmacie, 2005.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J. Potencial Impact of Increased Use de Bicidas in Consumer Products on Prevalence of Atibiotic Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 189-208, 2003.

GOBERNADO, M. Reflexiones sobre Resistencia Bacteriana. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, v. 12, n. 2, p. 158-160, 2003.

HARAGUCHI, H.; TANIMOTO, K.; TAMURA, Y.; MIZUTAN, K.; KINOSHITA, T. Mode of Antibacterial Action of Retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 125-129, 1998.

HATANO, T.; TANIMOTO, K.; TAMURA, Y.; MIZUTAN, K.; KINOSHITA, T. Mode Antibacterial Action of Retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 125-129, 1998.

HOLLA, B. S.; AKBERALI, P. M.; SHIVANANDA, M. K. Studies on Arylfuran Derivatives Part X. Synthesis and Antibacterial Properties of Arylfuryl-2-pyrazolines. **Il Farmaco**, v. 55, n. 4, p. 256-263, 2000.

INVITTOX, ERGA, T.T.; FRAME. **Yeast Growth Rate Cytotoxicity Test**, Protocol p.33, 1994.

INVITTOX. **Neutral Red Cytotoxicity Assay**, protocol n. 64, 2007.

KARLOWSKY, J. A.; HOBAN, D. J.; ZHANEL, G. G.; GOLDSTEIN, B. P. In Vitro Interactions of Anidulafungin with Azole Antifungals, Amphotericin B and 5-Fluorocytosine Against *Candida* Species. **Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 2, p. 174 – 177. 2006.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 783 p.

KROMANN, H.; LARSEN, M.; BOESEN, T.; SCHØNNING, K.; NIELSEN, S. F. Synthesis of Prenylated Benzaldehydes and Their Use in the Synthesis of Analogues of Licochalcona A. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 993–1000, 2004.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial Resistance to Antibiotics: Active efflux and Reduced Uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 486– 1513, 2005.

NI, L.; MENG, C. Q.; SIKORSKI, J. A. Recent Advance in Therapeutic Chalcones. **Ashley Publications**, v. 14, n. 12, p. 1669-1691, 2004.

LIN, Y. M.; ZHOU, Y.; FLAVIN, M. T.; ZHOU, L. M.; NIE, W.; CHEN, F. C. Chalcones and Flavonoids as Anti-tuberculosis Agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 2795-802, 2002.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3-26, 2001.

LLOP, C.; PUJOL, I.; AGUILAR, C.; SALA, J.; RIBA, D.; GUARRO, J. Comparison of Tree Methods of Determining MICs for Filamentous Fungi Using Different end Point Criteria and Incubation Periods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 239-242, 2000.

LÓPEZ, S. N.; CASTELLI, M. V.; ZACCHINO, S. A.; DOMINGUEZ, J. N.; LOBO, G.; CHARRIS-CHARRIS, J.; CORTÉS, J.C G.; RIBAS, J. C.; DEVIA, C.; RODRIGUEZ, A. M.; ENRIZ, R. D. *In vitro* Antifungal Evaluation and Structure-Activity Relationships of a New Series of Chalcones Derivatives and Synthesis Analogues, with Inhibitory Properties Against Polymers of the Fungal Cell Wall **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 1999-2013, 2001.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. **Mutation Research**, v.113, p.173-215, 1983.

MCBAIN, A. J.; GILBERT, P. Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n. 2, p. 199-208, 2003.

MELO-MONTEIRO, C.; MARTINS, C. J.; MONTEIRO, C. S.; PAIVA, M. B. M.; FAGUNDES, R. O. *Kerion Celsi* por *Microsporium gypseum*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 3, p. 319-321. 2003.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E. J.; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MITSCHER, L. A.; LEU, R. P.; BATHALA, M. S.; WU, W.; BEAL, J. L.; WHITE, R. Antimicrobial Agents From Higher Plants. **Lodhia**, v. 35, n. 2, p. 157-156, 1972.

MONOSTORY, K.; TAMÁSI, V.; VERECZKEY, L.; PERJÉSI, P. A study on CYP1A Inhibitory Action of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone and Cyclic Chalcone Analogues. **Toxicology**, v. 184, n. 2-3, p. 203-210, 2003.

MOREIRA, R. R. P.; SANTOS, L. E.; VARELLA, S. D.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W. Avaliação do Atividade Mutagênica do Extrato Etanólico Bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos Compostos 7-metoxilados Relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 11-19, 2002.

MURRAY, P.; KOBAYASHI, G.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. **Microbiologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2002.

MUSTAFA, K. A.; KJAERGAARD, H. G.; PERRY, N. B.; WEAVERSA, R. T. Hydrogen-bonded Rotamers of 20, 40, 60-Trihydroxy-30-formyldihydrochalcone, an Intermediate in the Synthesis of a Dihydrochalcone from *Leptospermum recurvum*. **Tetrahedron**, v. 59, p. 6113–6120, 2003.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically**. M7-A3. NCCLS, Villanova, PA, 1993.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial Chalcones – Bioisosteric Replacement of the 4'-Hydroxy Group. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n.11, p. 3047-3054, 2004.

NIELSEN, S. F.; LARSEN, M.; BOESEN, T.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Cationic Chalcone Antibiotics Design, Synthesis and Mechanisms of Action. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 48, n.7, p. 2667-2677, 2005.

NIEVA MORENO, M. I.; ZAMPINI, I. C.; ORDA, R. M.; JAIME, G.S.; VATTUONE, M.A.; ISLA, M.I. Evaluation of the Cytotoxicity, Genotoxicity, Mutagenicity, and Antimutagenicity of Propolis from Tucuman, Argentina. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 8957-62, 2005.

NOWAKOWSKA, Z. A review of Anti-infective and Anti-inflammatory Chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.

NOWAKOWSKA, Z.; KEDZIA, B.; SCHOERDER, G. Synthesis, Physicochemical Properties and Antimicrobial Evaluation of New (E)-chalcones. **Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 4, p.707 - 713, 2007.

NOWAKOWSKA, Z.; WYRZYKIEWICZ, E.; KEDZIA, B. Synthesis and Antimicrobial Properties of N-substituted Derivatives of (E)-azachalcones. **II Farmaco**, v. 56, p. 325-329, 2007.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal Agents Mechanisms of Action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, 2003

PADARATZ, P. **Síntese de Chalconas com Potencial Analgésico**. 2006. 65 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

PAKSHIR, H. Dermatophytosis in Karaj, Iran. **Indian Journal of Dermatology**, v.51, p. 262-264, 2006.

PELKA, M.; DANZL, C.; DISTLER, W.; PETSCHERT, A. A New Screening Test for Toxicitytesting of Dental Materials. **Journal of Dentistry**, v. 28, p. 341–345, 2000.

PRESCOTT, B. Thiosemicarbazones and Hydrazones of Alpha-methylchalcone as Potential Chemotherapeutic Agents. **International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy**, v. 11, n.4, p. 332-335, 1975.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, D. A.; SOBERA, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; VATTUONE, M. A. Propolis from the Northwest of Argentina as a Source of Antifungal Principles. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 103-110, 2006.

RAJARAO, G. K.; NEKHOTIAEVA, N.; GOOD, L. The Signal Peptide NPFSD Fused to Ricin A Chain Enhances cll Uptake and Cytotoxicity in *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 302, p. 529-534, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

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

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal Plants and Antimicrobial Activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RODRIGUES, A. T.; PEREIRA, M. A. S.; BUFFON, D. E.; CORREA, R.; CECHINEL FILHO, V.; SANTOS, A. R. S.; ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J. **Síntese e Ação Antinociceptiva de Chalconas Substituídas**. In: XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1998, Poços de Caldas-MG. XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1998. v. SA016.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Racteriana – Interpretando o Antibiograma**. São Paulo: Atheneu, p.118, 2005.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c2002. 642 p.

SCHMITT, M.; GELLERT, G.; LICHTENBERG-FRATÉ, H. The Toxic Potential of an Industrial Effluent Determined with the *Saccharomyces cerevisiae*-Based Assay. **Water Research**, v. 39, n. 14, p. 3211-3218, 2005

SHAHARYAR, M.; SIDDIQUI, A. A.; ALI, M. A.; SRIRAM, D.; YOGEE SWARI, P. Synthesis and *in vitro* Antimycobacterial Activity of N1-nicotinoyl(4'-hidroxy-3'-metyl phenyl)-5-[(sub)phenyl]-2-pyrazolines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 15, p. 3947 – 3949, 2006.

SHAO, P.; HUANG, L.; HSUEH, P. Recent Advances and Challenge in the Treatment of Invasive Fungal Infections. **International Journal of Microbiology Agents**, v. 30, p. 487-495, 2007.

SOBERA, N. J.R.; SGARIGLIA, M. A; SAMPIETRO D. A.; QUIROGA E. N.; VATTUONE M. A. Antibacterial Activity of Plant Extracts from Northwestern Argentina. **Journal of Applied of Microbiology**, v. 102, p. 1450-61, 2007.

SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B.; SCHUMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. **Métodos de Avaliação de Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos**. In: BRESOLIN, T. M. B., CECHINEL FILHO, V. Ciências farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2003. 109-166.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos**. Rio de Janiro: Atheneu, 1999.

TEW, G. N.; CLEMENTS, D.; TANG, H. ARNT, L.; SCOTT, R. W. Antimicrobial Activity of an Abiotic Host Defense Peptide Mimic. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1758, n.9, p.1387-1392, 2006.

THOMAS, G. **Química Medicinal: Uma Introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 413, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TSUKYAMA, R.; KATSURA, H.; TOKURIKI, N.; KOBAYASHI M. Antibacterial Activity of Licochalcone A Against Spore-forming Factéria. **Antibacterial Activity and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1226-1230, 2002.

VAN BAMBEKE, F.; BALZI, E.; TULKES, P. M. Antibiotic Efflux Pumps. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 457-470, 2000.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; TULKENS, P. M. Antibiotic Efflux Pumps in Eukaryotic Cells: Occurrence and Impact on Antibiotic Cellular Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Toxicodynamics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1067-1077, 2003.

VAN BAMBEKE, F.; GLUPCZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P.; PECHÈRE, J. C.; TULKENS, PM. Antibiotic Efflux Pumps in Prokaryotic Cells: Occurrence, Impact on Resistance and Strategies for the Future of Antimicrobial Therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1055-1065, 2003.

YADAV, P. P.; GUPTA, P.; CHATURVEDI, A. K.; SHUKLA, P. K.; RAKESH MAURYA, R. Synthesis of 4-Hydroxy-1-methylindole and Benzo[b]thiophen-4-ol Based Unnatural Flavonoids as New Class of Antimicrobial Agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1497-1505, 2005.

YONEYAMA, H.; KATSUMATA, R. Antibiotic Resistance in Bacteria and its Future for Novel Antibiotic Development. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 5, p. 1060-1075, 2006.

ZACCHINO, S. A. Estratégias para a Descoberta de Novos Agentes Antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, João Batista. **Plantas Medicinais: Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523p.

ZAUGG, C.; JOUSSON, O.; LÉCHENNE, B.; STAIB, P.; MONOD, M. *Trichophyton rubrum* Secreted and Membrane-Associated Carboxypeptidases. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, n. 7-8, p.669-682, 2008

ZEBET – Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz – und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch. **The Neutral Red Uptake (NRU) Cytotoxicity Assay for the *in vitro* Assessment of the eye Irritation Potential of Chemical Substances**. Protocol n. 26, 2001.