

MARCOS RODRIGO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE FORMULAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE UM DERIVADO SINTÉTICO DE DIBENZOILMETANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Oliveira, Marcos Rodrigo de, 1976-
O48a Avaliação da atividade antimelanoma de formulação
2017 transdérmica de um derivado sintético de dibenzoilmetano /
Marcos Rodrigo de Oliveira. – Viçosa, MG, 2017.
xvi, 98f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Melanoma. 2. Pele - Câncer. 3. Dibenzoilmetanos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em
Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 616.994

MARCOS RODRIGO DE OLIVEIRA

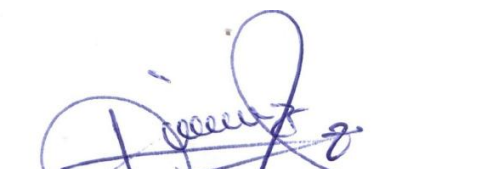
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE FORMULAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE UM DERIVADO SINTÉTICO DE DIBENZOILMETANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de junho de 2017.



Anésia Aparecida dos Santos
(Coorientadora)



Gaspar Díaz Muñoz
(Coorientador)



Sérgio Luis Pinto da Matta



Olavo dos Santos Pereira Júnior



Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

*Ao meu pai **Juca** (in memoriam), minha mãe **Ana**;
Aos meus irmãos **Marcelo** e **Sérgio** (in memoriam);
A minha esposa **Luciana** e minhas filhas, **Clarice** e **Susana**.*

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** por intermédio do **Departamento de Bioquímica**, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao programa de **Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada**, pela oportunidade de cursar o doutorado;

Ao **Sistema Único de Saúde (SUS)**, por acreditar e financiar essa pesquisa, FAPEMIG, CNPq e CAPES.

A minha orientadora **Professora Doutora Marisa Alves Nogueira Diaz**, pela sua dedicação à Universidade, exemplo de comprometimento, uma mãe carinhosa, uma guerreira!

Aos meus coorientadores **Professores Doutores Anésia, Sergio Luis Pinto da Matta, Gaspar Diaz Muñoz**, fundamentais para o conhecimento das bases da pesquisa científica.

A professora, **Mariella Bontempo Duca de Freitas**, pela disponibilização do Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, do Departamento de Biologia Animal para a realização das análises de estresse oxidativo.

Aos membros da banca examinadora: **Professora Anésia, Professores Sergio Luis Pinto da Matta, Gaspar Diaz Muñoz e Olavo dos Santos Pereira Júnior**, pela disponibilidade e essenciais sugestões.

Ao **Wagner Miranda Barbosa**, pelas valiosas sugestões.

À professora Cláudia Martins Carneiro (Claudinha) e Leo. Pela disponibilidade e apoio na UFOP.

Aos **Professores** que tive durante o doutorado, por todo conhecimento compartilhado.

Ao Jeferson pelo apoio no Biofármacos.

Aos meus colegas de laboratório Bionat, **Kamylla, Fernanda, Gislaine, Júlia, Mayra, Fábio, Vikor e Leandro**, sem essa equipe, eu nada faria.

Às colegas **Idelvânia, Nathália, Maíra e Lenilda, Leandro e Ana** valiosa ajuda nos experimentos.

Ao **Carlos Cardoso**, grande colega de disciplinas e apoio técnico.

Ao **Departamento de Medicina e Enfermagem**, por apoio meus estudos.

À **Divisão de Saúde**, pelo apoio de todos os servidores, em especial aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas.

Ao Mestre Raumsol, pela sua dedicação à obra **Logosófica**.

À **República Vira Saia - UFOP**, meu maior aprendizado! Obrigado aos irmãos Virassaianos!

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos...

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS.....	6

CAPÍTULO 1

β -dicetonas: propriedades químicas e biológicas

Resumo.....	10
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Síntese e características estruturais.....	12
Atividades biológicas.....	16
Considerações finais.....	30
Referências.....	31

CAPÍTULO 2

Síntese e caracterização do composto DBPOH

Resumo.....	35
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	42
Considerações finais.....	61
Referências.....	62

CAPÍTULO 3

Avaliação da atividade antimelanoma do composto DBPOH, de uso tópico

Resumo.....	63
Abstract.....	65
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	68
Resultados.....	74
Discussão.....	81
Considerações finais.....	89
Referências.....	90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Compostos que apresentaram maior absorvância em UVA/UVB.....	18
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Testes <i>in vitro</i> nas linhagens Melan-A e B16F10.....	75
Tabela 2. Dosagens bioquímicas de camundongos C57BL.....	76
Tabela 3. Atividade antioxidante nos tumores de camundongos de C57BL; tratados com o composto DBPOH (n=6).....	77
Tabela 4. Atividade antioxidante nos fígados de camundongos C57BL; tratados com o composto DBPOH, (n = 6).....	77
Tabela 5. Peso corporal e dos órgãos dos camundongos C57BL, tratados com o composto DBPOH, (n = 6).....	79

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Fig. 1. Estrutura geral das β -dicetonas, os substituintes de R1, R2 são diferentes de hidrogênio e R3 podem ser hidrogênios ou outros substituintes.....	12
Fig. 2. Equilíbrio ceto-enólico em compostos monocarbonílicos, favorecendo a forma cetônica.....	13
Fig. 3. Equilíbrio ceto-enólico em compostos dicarbonílicos, favorecendo a forma aldólica.....	13
Fig. 4. β -dicetonas com substituintes alifáticos.....	14
Fig. 5. β -dicetona aromáticas e heterocíclicas.....	14
Fig. 6. 1,3-Difenilpropano-1,3-diona (DBM) e 1,7-Difenil-1,6-heptadieno-3,5-diona (DFM - diferoilmetano).....	15
Fig. 7. Exemplos de β -dicetonas de origem natural.....	16
Fig. 8. β -dicetona TMDMB.....	17
Fig. 9. Derivado 4- <i>tert</i> -butil-4'-metoxidibenzoilmetano (BM-DBM), o 1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-2-decanil-3-(4-metoxifenil)-propano-1,3-diona.....	17
Fig. 10. 7,12-dimetilbenz[a]antracene (DBMA).....	19
Fig. 11. Análogo X mais potente contra linhagens células câncer de ovário (1A9) e Câncer de osso (HOS),3.....	21
Fig. 12. β -dicetonas BD2, BD13 e BD17 atuam pela indução de mecanismos apoptóticos, como a ativação de caspases.....	22
Fig. 13. β -dicetonas DBM, HDB e HMDB inibiram a migração celular através da inativação das vias PKC δ e PI3K.....	23
Fig. 14. Hidroxidibenzoilmetano (HDBM).....	24
Fig. 15. β -dicetonas com atividade antinecrótica.....	25

Fig. 16. Derivados de dibenzoilmetanos que apresentaram atividade antioxidante impedido a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	26
Fig. 17. Complexo DBM-Ru- <i>p</i> -cimeno, mais ativo para linhagens celulares de mieloma múltiplo humano U266 e RPMI.....	27
Fig. 18. Complexo DBM-Ru-benzeno, mais ativo para atividade antioxidante.....	27
Fig. 19. Complexos β -dicetonas oxovanádio (IV).....	28

CAPÍTULO 2

Fig. 1. Cromatografia de camada delgada (CCD) da primeira etapa da síntese (alquilação do dibenzoilmetano). P: dibenzoilmetano; $\emptyset$ composto alquilado.....	42
Fig. 2. Cromatografia de camada delgada (CCD) da segunda etapa da síntese (redução do produto alquilado na primeira etapa). DBM: dibenzoilmetano; $\emptyset$ 77 composto alquilado; H30: composto reduzido.....	43
Fig. 3. Cromatografia de camada delgada (CCD) da DBPOH na formulação transdérmica. V: veículo, 2,0: compostos DBPOH; $\emptyset$: composto alquilado; H: composto reduzido.....	43
Fig. 4. Cromatograma do composto DBPOH purificado por CLAE.....	44
Fig. 5. Perfil do plasma controle.....	45
Fig. 6. Perfil do plasma contendo DBPOH concentração 0,25mg/g.....	45
Fig. 7. Perfil do plasma contendo DBPOH concentração 1,00g/g, com detecção da fragmentação de m/z 274.....	46
Fig. 8. Perfil do padrão contendo DBPOH concentração 1,00 mg/mL, com detecção da fragmentação de m/z 274.....	46

Fig. 9. Perfil do plasma contendo DBPOH concentração 0,25mg/g, com detecção da fragmentação de m/z 274.....	47
Fig. 10. Perfil do plasma contendo DBPOH concentração 1,00 mg/g, com detecção da fragmentação de m/z 274.....	47
Fig. 11. Perfil da fragmentação do composto DBPOH.....	48
Fig. 12. Proposta de fragmentação do composto DBPOH.....	49
Fig. 13. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃).....	51
Fig. 14. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) expansão.....	52
Fig. 15. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) expansão.....	53
Fig. 16. Espectro de RMN RMN ¹ H (400 MHz, D ₂ O).....	54
Fig. 17. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, D ₂ O) expansão, observa-se a ausência da absorção em δ 3,4 referente ao H da hidroxila.....	55
Fig. 18. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃)-CCD.....	56
Fig. 19. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃).....	57
Fig. 20. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) expansão.....	58
Fig. 21. Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl ₃).....	59
Fig. 22. Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl ₃) expansão.....	60

CAPÍTULO 3

Fig. 1. Indução da apoptose pelo composto DBPOH em células B16F10. (A) controle; (B) células tratadas com 12uM do composto DBPOH.....	76
Fig. 2. Volume dos tumores dos camundongos, não tratados (veículo) e tratados com o composto DBPOH nas concentrações 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00mg/g e 2,00 mg/g, n=6.....	79

Fig. 3. Secções histológicas de amostras do tumor, de camundongos não tratados e tratado como o composto DBPOH na concentração de 1,00mg/g. OH.....	81
Fig. 4. Secções histológicas de amostras do fígado, de camundongos não tratados (veículo) e tratados como o composto DBPOH nas concentrações 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00mg/g e 2,00 mg/g.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AUS	Ácido úrico sérico
BM-DBM	4-tert-Butil-4'-metoxidibenzoilmetano
C10-DBM	1-(4-tert-Butilfenil)-2-decanil-3-(4'-metoxifenil)-propano-1,3-diona
C2C12	Músculo esquelético de rato
CAT	Catalase
CCC	Cromatografia em coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada.
CCP	Cromatografia em camada preparativa.
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase 2A
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DBM	1,3-Difenilpropano-1,3-diona
DBM	Dibenzoilmetano
DBM ME	Dibenzoilmetano microemulsionado
DBMA	7,12-dimetilbenz[a]antraceno
DBPO2	1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona
DBPOH	1,3-Difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona
DETS	3,5-dihydroxy-4-ethyl-trans-stilbene
DFM	Diferoilmetano
DMSO	Dimetilsulfóxido
ER	Retículo endoplasmático
ESI	Electrospray Ionisation
Fabs	Fração absorvida
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GST	Glutathione S-transferase
HeLa	Câncer cervical humano
IC50	Concentração inibitória de 50%
IC90	Concentração inibitória de 90%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDA	Malondialdeído

MMP	Metaloproteinase de matriz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazo-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
ODC	Ornitina descarboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PEITC	Phenethyl isothiocyanate
PI3K	Fosfatidilinosítido 3-quinase
PMA	13-acetato de forbol-12-miristato
QR	Quinona redutase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFN	Sulforaphane
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	(ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico, e HCl)
TGI	Trato gastrointestinal
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAMP	Transgênicos para câncer de próstata
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
VO	Oxovanádio

RESUMO

OLIVEIRA, Marcos Rodrigo de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2017. **Avaliação da atividade antimelanoma de formulação transdérmica de um derivado sintético de dibenzoilmetano.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Gaspar Diaz Muñoz, Anésia Aparecida dos Santos, Márcio Santos Rocha e Gustavo Costa Bressan.

O câncer (neoplasia maligna ou tumor maligno) pode ser conceituado como uma massa de tecido cujo crescimento excede ao crescimento dos tecidos saudáveis e que persiste mesmo depois da interrupção dos estímulos que o desencadeou. O melanoma se destaca entre os tipos de câncer mais agressivos, com cerca de 1.500 mortes ao ano no Brasil. O estresse oxidativo pode ter um papel importante no melanoma. Células de melanoma revelam um elevado nível de ácidos graxos poli-insaturados, os quais são alvos sensíveis à peroxidação lipídica, a qual leva a formação de aldeídos α,β -insaturados, como o malondialdeído (MDA). Na constante busca por novas terapias eficazes para o tratamento do melanoma, os derivados de dibenzoilmetano se tornaram foco do estudo devido à suas propriedades fotoprotetoras, antitumorais e antimicrobiana. O dibenzoilmetano (DBM) (1,3-Difenilpropano-1,3-propanodiona) e seus derivados são substâncias pertencentes à classe dos flavonoides, raramente encontrados na natureza e têm sido isolados de algumas espécies de *Lonchocarpus*, além de poderem ser obtidos através de síntese orgânica. Dessa forma, com o objetivo de sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antimelanoma do composto inédito na literatura, 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH), foi realizada a síntese, purificação por HPLC e caracterização através de RMN H^1 e RMN C^{13} do composto. Foram realizados testes *in vitro*, *in vivo*, de uma formulação transdérmica em células B16F10 e camundongos C57BL, respectivamente. A síntese realizada em duas etapas teve o rendimento de 78% na primeira e de 48% na segunda etapa. O composto foi detectado no plasma de camundongos após a aplicação de uma formulação transdérmica, através de LC-MS. Após o teste de citotoxicidade realizado com MTT, a IC_{50} foi 10,5 $\mu\text{g/mL}$ para as células da linhagem melan-A, de 3,8 $\mu\text{g/mL}$ para a B16F10, respectivamente, com índice de seletividade (IS) de 2,7. O tratamento em células B16F10 por 16 horas com o composto DBPOH induziu a morte

majoritariamente por apoptose na concentração 13,903 $\mu\text{g/mL}$ (44 μM) (Anexina V-FITC⁺/PI⁻ e Anexina V FITC⁺/PI⁺). Nessa concentração, o composto induziu em torno de 94% de apoptose nessas células. Não houve alteração nos valores de ambas as transaminases ALT e AST. Os valores de creatinina sérica também não foram diferentes significativamente ($p>0,05$) entre os tratamentos. Foi verificado que na dosagem do ácido úrico sérico, houve uma diminuição de 48%, 50%, 50% e 76%, nos tratamentos com as concentrações: 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00 mg/g e 2,00 mg/g, respectivamente ($p<0,05$). O composto DBPOH reduziu a atividade da Glutathione S Transferase em 27% e 16% nas concentrações 0,50mg/g e 1,00 mg/g, respectivamente, nos tumores. Com relação ao tecido hepático, foram observadas alterações nas concentrações de malondialdeído em todos os tratamentos, com diminuições de 72%, 65%, 79% e 88%, nas concentrações 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00mg/g e 2,00 mg/g, respectivamente. Com relação à catalase, somente o tratamento com 2,00mg/g, reduziu sua atividade, cerca de 40%. Os dados obtidos indicam que o composto DBPOH pode ser um candidato a medicamento para o tratamento do melanoma, mais estudos complementares são necessários para garantir a segurança com relação à toxicidade e para verificar o mecanismo de ação e a farmacocinética do composto.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Marcos Rodrigo de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2017. **Evaluation of the antimelanoma activity of a transdermal formulation of a synthetic derivative of dibenzoylmethane.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Gaspar Diaz Muñoz, Anésia Aparecida dos Santos, Márcio Santos Rocha and Gustavo Costa Bressan.

Cancer (malignant neoplasm or malignant tumor) can be conceptualized as a mass of tissue whose growth exceeds the growth of healthy tissues and that persists even after the interruption of the stimuli that triggered it. Melanoma stands out among the most aggressive types of cancer, with around 1,500 deaths a year in Brazil. Oxidative stress may play an important role in melanoma. Melanoma cells reveal a high level of polyunsaturated fatty acids, which are targets sensitive to lipid peroxidation, which leads to the formation of α , β -unsaturated aldehydes, such as malondialdehyde (MDA). In the constant search for new effective therapies for the treatment of melanoma, the dibenzoylmethane derivatives became the focus of this study due to their photoprotective, antitumor and antimicrobial properties. Dibenzoylmethane (DBM) (1,3-Diphenylpropane-1,3-propanedione) and its derivatives are substances belonging to the class of flavonoids, rarely found in nature, which have been isolated from some *Lonchocarpus* species, and can be obtained through Organic synthesis. Thus, in order to synthesize, characterize and evaluate the antimelanoma activity of the novel compound in the literature – 1,3-diphenyl-2-benzyl-3-hydroxy-1-propanone (DBPOH) – the synthesis, purification by HPLC, and characterization by means of ^1H NMR and ^{13}C NMR of the compound were executed. In vitro and in vivo tests of a transdermal formulation were carried out on B16F10 cells and on C57BL mice, respectively. The synthesis performed in two steps yielded 78% in the first and 48% in the second stage. The compound was detected in the plasma of mice after application of a transdermal formulation via LC-MS. After the MTT cytotoxicity test, the IC_{50} was 10.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for the melan-A cell line, from 3.8 $\mu\text{g} / \text{mL}$ to B16F10, respectively, with a selectivity index (IS) of 2,7. Treatment in B16F10 cells for 16 hours with compound DBPOH induced death mainly by apoptosis in the concentration of 13,903 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (44 μM) (Annexin V-FITC + / PI- and Annexin V FITC + / PI +). At this concentration, the compound induced around 94% apoptosis in

these cells. There was no change in the values of both ALT and AST transaminases. Serum creatinine values were also not significantly different ($p > 0.05$) between treatments. Serum uric acid levels were decreased by 48%, 50%, 50% and 76% in the treatments with concentrations 0.25 mg/g, 0.50 mg/g, 1.00 mg/G and 2.00 mg /g, respectively ($p < 0.05$). The DBPOH compound reduced the activity of Glutathione S Transferase in the tumors by 27% and 16% at concentrations of 0.50 mg / g and 1.00 mg/g, respectively. In relation to hepatic tissue, changes in malondialdehyde concentrations were observed in all treatments, with decreases of 72%, 65%, 79% and 88%, at concentrations of 0.25 mg/g, 0.50 mg/g, 1.00 mg/g and 2.00 mg/g, respectively. Regarding catalase, only the treatment with 2.00mg / g reduced its activity by about 40%. The data obtained indicate that the compound DBPOH may be a drug candidate for the treatment of melanoma. Further studies are needed to ensure safety with respect to toxicity and to verify the mechanism of action and pharmacokinetics of the compound.

INTRODUÇÃO GERAL

O câncer (neoplasia maligna ou tumor maligno) pode ser conceituado como uma massa de tecido cujo crescimento excede ao crescimento dos tecidos saudáveis e que persiste mesmo depois da interrupção dos estímulos que o desencadeou. É um crescimento autônomo que compete com o organismo hospedeiro pelo seu suprimento nutricional e energético. Devido ao crescimento incontrolável, os tumores malignos tendem a ser muito agressivos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo (COTRAN et al., 2004; MCGEE et al., 1992; WILLIS, 1952).

No Brasil, é estimada para os anos de 2016/2017, uma média de 596.070 novos casos de câncer. Entre esses, são 5.670 casos de câncer de pele tipo melanoma que, embora apresente baixa incidência, possui alta letalidade, com cerca de 1.500 mortes ao ano (INCA, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS – World Health Organization – WHO), são esperados para o ano de 2025, mais de 20 milhões de novos casos de câncer e o número de mortes causadas pela doença deve superar a estimativa de 8,2 para 13 milhões anuais. A OMS também alerta para a alta incidência, especialmente entre os países em desenvolvimento. A estimativa mundial, realizada em 2012, apontou que mais de 60% de novos casos ocorreram em países em desenvolvimento. Para a mortalidade, a situação agrava-se quando se constata que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países (INCA, 2016). No Brasil, a incidência de melanoma ainda é baixa, representando anualmente cerca de 1% de novos casos.

Os tipos mais comuns de câncer são os de pele, próstata, mama feminina, pulmão, cólon e reto, sendo o primeiro aquele de maior incidência no Brasil e de menor letalidade, com exceção do melanoma (INCA, 2016).

O melanoma é um dos tipos de câncer humano mais agressivo e resistente ao tratamento, tendo aumentado radicalmente em todo o mundo durante as últimas décadas. Existem algumas características gerais morfológicas do melanoma que são usadas para o seu diagnóstico como: tamanho, ulceração, necrose, simetria, delimitação lateral, melanização (VERONESE et. al, 2004). Seu crescimento ocorre em duas fases: a primeira é a fase radial, em que o melanoma

cresce no interior da epiderme e derme superficial; a segunda é a etapa de crescimento vertical, em que o melanoma se expande em direção às camadas mais internas da derme (KUMAR et al., 2005), e a transição da primeira para a segunda etapa é considerada o evento mais crítico da progressão deste tipo de tumor, pois envolve o escape do controle de crescimento realizado pelos queratinócitos (TARAPORE, 2013). Apesar de agrupamentos de casos de melanoma sucederem em uma família devido a padrões comuns de exposição solar, até o presente já foram identificados, também, alguns fatores genéticos associados. Estima-se que, em média, 10% dos melanomas sejam causados por mutações germinativas em genes de suscetibilidade, sendo hereditárias. Até o momento, os dois principais genes de suscetibilidade associados ao melanoma familiar são *CDKN2A* e *CDK4* (CARVALHO et al., 2004; LAW et al., 2012). As mutações no primeiro gene são observadas em 10% das famílias que apresentam dois casos de melanoma e em até 40% das famílias com três ou mais casos. As mutações no gene *CDK4* são raras e menos significativas (LAW et al., 2012).

Estudos propõem que a exposição aos raios ultravioleta seja responsável pela maior parte dos cânceres cutâneos do tipo não melanoma e possivelmente dos melanomas (BAKOS, 2006). Raios UVB (ultravioleta B) são estimuladores de inflamação e formação de fotolesões do DNA, como os dímeros de timina (SKLAR et al., 2013; PFEIFER et al., 2005), enquanto os raios UVA (ultravioleta A) são menos ativos, mas possuem uma potente ação dirigida para a formação de radicais livres, causando danos ao DNA e macromoléculas (TYRRELL 1995; SANDER et al., 2004; BURKE, 2010). Além da exposição em excesso à radiação solar, a utilização de fontes artificiais de radiação aumenta ainda mais o risco de desenvolvimento do melanoma, como no bronzamento artificial utilizando as câmaras de bronzamento. Argumentava-se que essa seria uma opção segura, pois as lâmpadas que são utilizadas só emitem os raios UVA, que são os de comprimento longo, entretanto, recentes estudos mostram que os raios UVA são os principais causadores do melanoma.

O bronzamento artificial (bronzamento com lâmpada ultravioleta) tem aumentado nos últimos 20 anos, sendo utilizado com frequência entre adolescentes e adultos de pele mais clara. Estudos vêm demonstrando, nos últimos 15 anos, um maior risco do desenvolvimento do melanoma pelas pessoas que utilizam a câmara

de bronzeamento, sendo que há evidências que esse risco aumenta ainda mais quando o uso se inicia antes dos 30 anos de idade (BAKOS, 2006).

O estresse oxidativo pode ter um papel importante no melanoma. Células de melanoma revelam elevado nível de ácidos graxos poli-insaturados (PICARDO et al. 1996), os quais são alvos sensíveis à peroxidação lipídica, a qual leva a formação de aldeídos α,β -insaturados, como o malondialdeído (MDA), que já foi demonstrado ser mutagênico e carcinogênico (MARNETT, 1999). Já foi demonstrado elevados níveis de MDA na área do melanoma, além disso, altos níveis de MDA também foram encontrados não só em células do melanoma, mas também na área do entorno dos queratinócitos, indicando um severo dano oxidativo nessa região (SANDER et al. 2003).

Há cerca de 15 anos, poucos tratamentos estavam disponíveis para o melanoma metastático e nenhum era particularmente efetivo. Pacientes com melanoma avançado, com metástases nos nodos linfáticos ou outros órgãos tinham uma média de vida entre 8 e 9 meses e somente 15% sobreviviam mais de 3 anos (KAUFMAN et al., 2013). A quimioterapia convencional com Dacarbazina sozinha estava associada com uma taxa de resposta objetiva de 15% e, além disso, parte dessa resposta era parcial (LUI et al., 2007). Em 2002, pesquisadores descobriram que dois terços dos melanomas tinham uma única mudança na codificação da proteína serino-quinase BRAF, a troca de um resíduo de aminoácido tornava a sinalização celular descontrolada em direção à proliferação celular (DAVIES et al., 2002). Esse foi um importante marco no tratamento do melanoma em seu estágio avançado. Pela primeira vez, uma droga para o tratamento do melanoma, poderia atuar em uma via conhecida e os resultados eram animadores. O primeiro inibidor de BRAF, Vemurafenib, numa triagem de fase I mostrou a completa remissão do tumor em 25 de 32 pacientes (FLAHERT et al., 2010). Um estudo de fase III mostrou que depois de três meses de terapia com Vemurafenib, 74% dos pacientes com mutação BRAF (V600E), sobreviviam mais que os pacientes que recebiam o tratamento padrão (CHAPMAN et al., 2011) e 48% viam o crescimento de seus tumores diminuir ou pararem. Mas, apesar da inovação e o início dos tratamentos terem sido muito promissores, o melanoma descobriu outra rota para progredir em seu desenvolvimento. Assim, muitos pacientes estavam resistentes ao tratamento seis meses após o início do mesmo (VILLANUEVA, 2010; POULIKAKOS, 2010;

PARAISO, 2010). Rapidamente, outras proteínas da via de sinalização mais importante no melanoma, MAPK (mitogen-activated protein kinase), estavam sendo pesquisadas (TRUNZER et al., 2013). Dentre as proteínas pesquisadas, MEK1 também integrante da via das MAPK, tem sido estudada como alvo de inibição, sozinha e em associação com inibidores de BRAF mutantes. Além disso, esses tratamentos mais específicos como inibidores de vias específicas e interferon são muito onerosos, tanto para o Sistema Único de Saúde (SUS) quanto para unidades particulares. Uma pesquisa feita entre os anos de 2000 e 2007 mostra que, só no estado de São Paulo, o custo nos estágios mais avançados do melanoma, onde o uso de medicamentos é majoritário, passou de mais de 66 mil e 130 mil reais por paciente no SUS e convênios, respectivamente (SOUZA, 2009).

O câncer é um problema de saúde pública mundial, despertando o interesse na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral e também novos processos de diagnósticos, que identifique os tumores precocemente, com maior eficiência (BOGO, 2012). Atualmente, o tratamento da neoplasia pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de um procedimento (INCA, 2016).

Na constante busca por novas terapias eficazes para o tratamento do melanoma, os derivados de dibenzoilmetano se tornaram foco de estudo, devido às suas propriedades fotoprotetoras, antitumorais e antimicrobianas (NOGUEIRA et al., 2003; HUBAUD et al., 2008; ZAWADIAK; MRZYCZEK, 2012). O dibenzoilmetano (DBM) (1,3-Difenilpropano-1,3-diona) e seus derivados são substâncias pertencentes à classe dos flavonoides, raramente encontrados na natureza, e têm sido isolados de algumas espécies de *Lonchocarpus* (MAGALHÃES et al., 1996, 1997; NOGUEIRA et al., 2003). Na natureza, os DBMs são encontrados em famílias como Annonaceae, Asteraceae, Menispermaceae, Rosaceae, Salicaceae e, especialmente, Fabaceae (gêneros *Glycyrrhiza* e *Lonchocarpus*). Os derivados de DBM também podem ser obtidos por meio de síntese orgânica (MAGALHÃES et al., 1997). Estudos anteriores demonstram que a inibição do crescimento de células do câncer de mama, melanoma e pulmão pelo dibenzoilmetano sintético 1,3-difenil-2-alil-1,3-propanodiona (NOGUEIRA et. al., 2003). Huang e colaboradores (1998) verificaram que ao administrar uma dieta de

DBM a 1%, em ratas Sencar, conseguiu-se inibir em 97% o tumor mamário, induzido por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DBMA). A incidência de linfomas/leucemias também foi induzida pelo DBMA e completamente inibida. Estudos têm relacionado a atividade do DBM a mecanismos celulares variados como supressão da progressão do ciclo celular, inibição da mutagenicidade, indução da apoptose (WANG et al., 2011) e atividade antioxidante (HEGEDÜS et al., 2013).

Ressalta-se que a biodisponibilidade oral desses compostos permanece como uma barreira a ser superada. Muito importante também são os cuidados especiais com substâncias novas, para que as mesmas não possam causar danos ao organismo. Com o objetivo de avaliar a atividade antimelanoma na redução do tumor, avaliação do estresse oxidativo e impactos nos parâmetros bioquímicos do 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH), foram realizados testes *in vitro*, *in vivo*, de uma formulação transdérmica em células de melanoma murino B16F10 e camundongos C57BL, respectivamente. Essa tese foi dividida em três capítulos, em formatos de artigos. No primeiro capítulo, foi feita uma revisão sobre as β -dicetonas; no segundo, foi abordada a parte da síntese e caracterização do derivado do dibenzoilmetano, uma substância inédita na literatura. E no terceiro capítulo, foram abordados os experimentos *in vitro* e *in vivo*, do derivado do dibenzoilmetano.

REFERÊNCIAS

BAKOS, L. Tratamento cirúrgico de metástase a distância. Grupo brasileiro de melanoma. **Boletim Informativo do GBM** - Ano IX - N° 32. Janeiro, Fevereiro e Março, 2006.

BOGO, D. **Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de compostos de liquens**. 2012. 110 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

BURKE, K.E. Photoaging: The role of oxidative stress. **G Ital. Dermatol. Venereol.**, 145: 445 - 459, 2010.

CARVALHO, C. A. et al. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **An. Bras. Dermat.**, 79: 53 - 60, 2004.

CHAPMAN, P. B., HAUSCHILD, A., ROBERT, C., et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **N. Engl. J. Med.**; 364: 2507 - 16, 2011.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Neoplasia. In: **Robbins- Pathologic Basis of Disease** Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2004.

DAVIES et al. Mutations of the BRAF gene in human câncer **Nature**, 417: 949 - 954, 2002

FLAHERTY, K. T. et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. **N. Engl. J. Med.**, 363: 809 - 19, 2010.

HEGEDÜS, C. et al. Cytoprotective dibenzoylmethane derivatives protect cells from oxidative stress-induced necrotic cell death. **Pharmacol. Res.**, 72: 25 - 34, 2013.

HUANG, M. T. et al. Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors and lymphomas/leukemias in Sencar mice. **Carcinog.**, 19: 1697 - 700, 1998.

HUBAUD, J., BOMBARDA, I., DECOME, L., WALLET, J., GAYDOU, E. Synthesis and spectroscopic examination of various substituted 1, 3-dibenzoylmethane, active agents for UVA/UVB photoprotection. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 92: 103 - 109, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2016: **Incidência do câncer no Brasil**. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>. Acesso em 16 abr. 2017.

KAUFMAN, H. L. *et al.* The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma **Nature Rev. Clin. Oncol.**, 10: 588 - 598 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K. FAUSTO, N. Robbins e Cotran – **Bases Patológicas das Doenças**. 7ª edição. Elsevier, 2005. cap. 1. p.3-48.

LAW, M. H.; MACGREGOR, S.; HAYWARD, N. K. Melanoma genetics: recente findings take us beyond well-traveled pathways. **J. Invest. Dermatol.**, 132: 1763 - 74, 2012.

LUI P, CASHIN R, MACHADO M *et al.* Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials. **Cancer Treat Ver.**, 33: 665 - 8, 2007.

MAGALHÃES, A. F.; *et al.* . Twenty-three Flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens* roots. **Phytochemistry**, 42: 1459 - 1471, 1996.

MAGALHÃES, A. F., NOGUEIRA, M. A. *et al.* Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus* species. **Phytochemistry**, 46: 1029 -1033, 1997.

MARNETT LJ, Chemistry and biology of DNA ,damage by malondialdehyde. **IARC Sci Publ.**, 150: 17 - 27, 1999.

MCGEE. J. O. D., ISAACSON, P. G., WRIGHT, N. A. Neoplasia. In: **Oxford Textbook of Pathology**. Oxford. Oxford University Press., 569-718, 1992.

NOGUEIRA, M. A. *et al.* A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **II Farmaco**, 58: 1163 - 1169, 2003.

PARAISO, K. H., *et al.*, Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. **Br J Cancer**, 102: 1724 - 30, 2010.

PICARDO, M., GRAMMATICO, P., ROCCELLA, F. *et al.* Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. **J. Invest. Dermatol.**, 107: 322 - 6, 1996.

PFEIFER, G.P.; YOU, Y.H.; BESARATINIA, A. Mutations induced by ultraviolet light. **Mutat. Res.**, 571: 19 - 31, 2005.

POULIKAKOS, P. I., et al., RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. **Nature**, 464: 427 - 30, 2010

SANDER, C. S., HAMM, F., ELSNER, P., THIELE, J. J. () *Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. Br. J. Dermatol.*, 148: 913 - 922, 2003.

SANDER, C.S.; CHANG, H.; HAMM, F.; ELSNER, P.; THIELE, J.J. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. **Int. J. Dermatol.**, 43: 326 - 335, 2004.

SKLAR, L.R.; ALMUTAWA, F.; LIM, H.W.; HAMZAVI, I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: A review. **Photochem. PhotoBiol. Sci.**, 12: 54 - 64, 2013.

SOUZA, R., MATTEDI, A., REZENDE, M., CORREA, M., DUARTE, E. An estimate of the cost of treating melanoma disease in the state of Sao Paulo-Brazil. **An. Bras. Dermatol.**, 84: 237 - 43, 2009.

TARAPORE, R. S. An Overview of Important Genetic Aspects in Melanoma. In VEREECKEN, P. **Highlights in skin cancer**. 1a. ed. Rijeka, Croácia: InTech, p.43-66, 2013

TYRRELL, R.M. Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. **Biochem. Soc. Symp.**, 61: 47 - 53, 1995.

VERONESE, L. A., MARQUES, M. E. A. Critérios anatomopatológicos para melanoma maligno cutâneo: análise qualitativa de sua eficácia e revisão da literatura. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 40: 99 - 112, 2004.

VILLANUEVA, J. et al., Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. **Cancer Cell**, 18: 683 - 95, 2010.

WANG, M., LIAO, Y. Hydroxydibenzoylmethane induces apoptosis through repressing ornithine decarboxylase in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Exp. Mol. Med.**, 43:189 - 196, 2011.

WILLIS, R. A. **The spread of tumors in the human body.** Butterworth e Co. Londres, 1952.

ZAWADIAK, J., MRZYCZEK, M. Influence of substituent on UV absorption and keto–enol tautomerism equilibrium of dibenzoylmethane derivatives. ***Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, 96: 815 - 819, 2012.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO

β -DICETONAS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

RESUMO

As β -dicetonas são compostos que têm chamado bastante atenção dos químicos orgânicos, inorgânicos e físico-químicos, por apresentarem características peculiares muito interessantes, principalmente devido à sua utilização como agentes de extração de metais, na síntese de compostos luminescentes, e por apresentarem atividades biológicas anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana e antitumoral. O derivado de dibenzoilmetano (DBM) (1,3-Difenilpropano-1,3-diona) e diferoilmetano (DFM) (3-methoxyphenyl-1,6-heptadiene-3,5-dione), são exemplos de β -dicetonas, cujas atividades antitumorais e fotoprotetoras vêm sendo exploradas em diversos estudos. Na natureza, DBM são encontrados, em famílias como Annonaceas, Asteraceas, Menispermaceas, Rosaceas, Salicaceas e, especialmente, Fabaceas (gênero *Glycyrrhiza* e *Lonchocarpus*) e os diferoilmetanos (DFM) encontrados na família Zingiberaceae principalmente na espécie *Curcuma longa*. Nesta revisão, foram exploradas as atividades fotoprotetoras e antitumorais, bem como os mecanismos de ação desses compostos e sua farmacocinética.

ABSTRACT

β -diketones are compounds that have attracted a great deal of attention from organic, inorganic and physicochemical chemists, since they have very interesting peculiar characteristics, mainly due to their use as metal extraction agents in the synthesis of luminescent compounds and because they present biological activity as anti-inflammatory, antiviral, antibacterial and antitumor. β -Diketones are also referred to as dibenzoylmethanes (DBM) (1,3-Diphenylpropane-1,3-dione) and diphenylmethanes (DFM) (3-methoxyphenyl-1,6-heptadiene-3,5-dione). Antitumor and photoprotective activities (DBM) have been explored in several studies. In nature, dibenzoylmethanes (DBM) are found in families such as Annonaceae, Asteraceae, Menispermaceae, Rosaceae, Salicaceae and especially in Fabaceae (genus *Glycyrrhiza* and *Lonchocarpus*) and the diphenylmethanes (DFM) found in the Zingiberaceae family, mainly in the *Curcuma longa* species. In this review, the photoprotective and antitumor activities were explored, as well as the mechanisms of action of these compounds and their pharmacokinetics.

INTRODUÇÃO

As β -dicetonas (figura 1) são compostos que têm chamado bastante atenção dos químicos orgânicos, inorgânicos e físico-químicos, por apresentarem características peculiares muito interessantes, principalmente devido à sua utilização como agentes de extração de metais, na síntese de compostos luminescentes (CHENG et al., 2011) e por apresentarem atividades biológicas anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana e antitumoral (ZHANG, 2003; NOGUEIRA et al., 2003; SINGH et al., 2013; ALMELAH et al., 2016; CHINTHALA et al., 2017; PETTINARI et al., 2017;;).

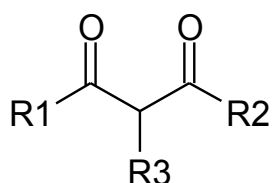


Figura 1 - Estrutura geral das β -dicetonas, os substituintes de R1, R2 são diferentes de hidrogênio e R3 podem ser hidrogênios ou outros substituintes.

Em relação à atividade antitumoral, as β -dicetonas têm demonstrado serem compostos bastante promissores, tanto na forma livre, como complexada com alguns metais como Cu e Pt (NOGUEIRA et al., 2003; WILSON, 2012). Estes compostos tanto podem ser encontrados na natureza, quanto podem ser obtidos por meio de síntese orgânica (MAGALHÃES et al., 1997).

Nos últimos anos, foram escritos artigos sobre alguns membros das β -dicetonas, com promissora atividade antitumoral para diversos cânceres. Aqui, busca-se apresentar as características químicas e estruturais desta classe de compostos representado pelo dibenzoilmetano e a ação de alguns desses compostos de origens sintética e natural nos mais variados tipos de câncer e outras atividades biológicas.

Síntese e características estruturais

Compostos β -dicetonados, ou simplesmente β -dicetonas, têm sido usados como importantes intermediários em síntese orgânica, sendo preparados através da condensação de Claisen, uma reação muito antiga datando de séculos atrás (CLAISEN, 1887).

Esses compostos apresentam como característica a presença de um grupo

metileno entre as duas carbonilas, que pode ou não estar substituído. Nos compostos não substituídos, uma das características mais importantes é a existência de tautomerismo ceto-enólico. Porém, ao contrário do que ocorre com os compostos monocarbonílicos, que apresentam uma forma enol e uma cetônica, sendo a última favorecida, no caso das β -dicetonas ocorre predominância da forma enólica. Isto pode ser comprovado através de estudos espectroscópicos de RMN ^1H (RUSTINI, 2003).

A tautomeria resulta da transferência do H_α do carbono para o oxigênio, com clivagem simultânea da ligação $\text{C}=\text{O}$ e formação da ligação $\text{C}=\text{C}$. A tautomerização requer um arranjo conformacional no qual a ligação $\text{C}-\text{H}_\alpha$ se orienta ortogonalmente em relação ao plano da ligação $\text{C}=\text{O}$, permitindo a transferência dos elétrons da ligação $\sigma\text{C}-\text{H}$ para o orbital antiligante vazio $\pi^*\text{CO}$ necessária para formar a ligação $\text{C}=\text{C}$ (COSTA et al., 2003).

Nos compostos monocarbonílicos, ocorre um favorecimento da forma cetônica. Isto ocorre porque existe uma diferença de 12 kcal/mol a favor da forma cetônica em relação à enólica, favorecendo então a primeira (SMITH et al., 2001), figura 2.

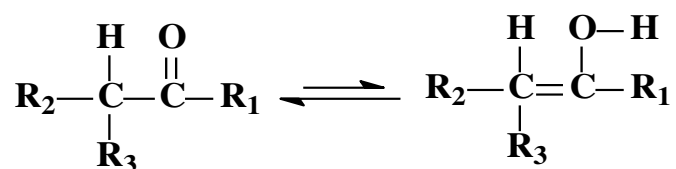


Figura 2 - Equilíbrio ceto-enólico em compostos monocarbonílicos, favorecendo a forma cetônica.

No caso das β -dicetonas, este favorecimento ocorre pelo fato da ligação $\text{C}=\text{C}$ da forma enólica encontrar-se em conjugação com a ligação $\text{C}=\text{O}$. Isto se deve a formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular que estabiliza a forma enólica, fazendo com que esta predomine sobre a forma cetônica em 84%, figura 3 (SMITH et al., 2001; COSTA et al., 2003).

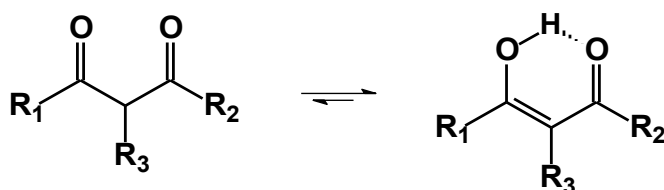


Figura 3 - Equilíbrio ceto-enólico em compostos dicarbonílicos, favorecendo a forma aldólica.

A β -dicetona mais simples é a acetilcetona (Hacac), na qual os substituintes R_1 e R_2 são grupos metilas e os substituintes R_3 , são hidrogênios. Vários compostos β -dicetonas têm sido preparados através da reação clássica de acilação de cetonas ou ésteres ou através da utilização de haletos de acila ou ésteres. Nas figuras 4 e 5, é possível observar as estruturas de algumas β -dicetonas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas sintetizadas a partir desse método (BINNEMANS, 2005).

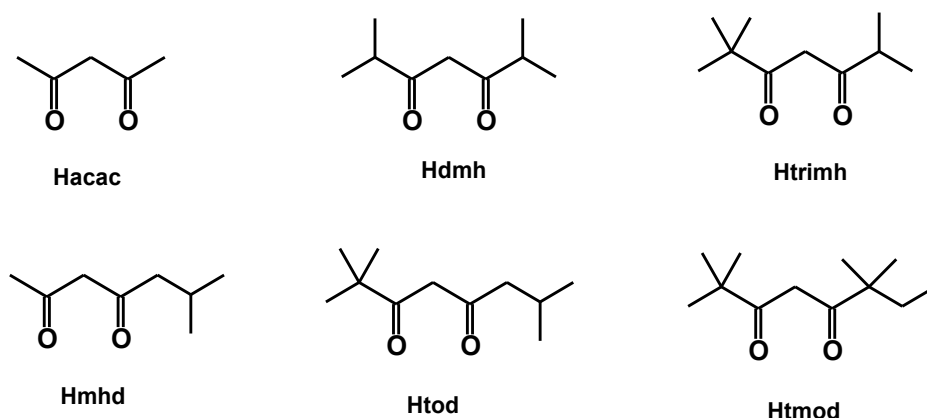


Figura 4 - β -dicetonas com substituintes alifáticos.

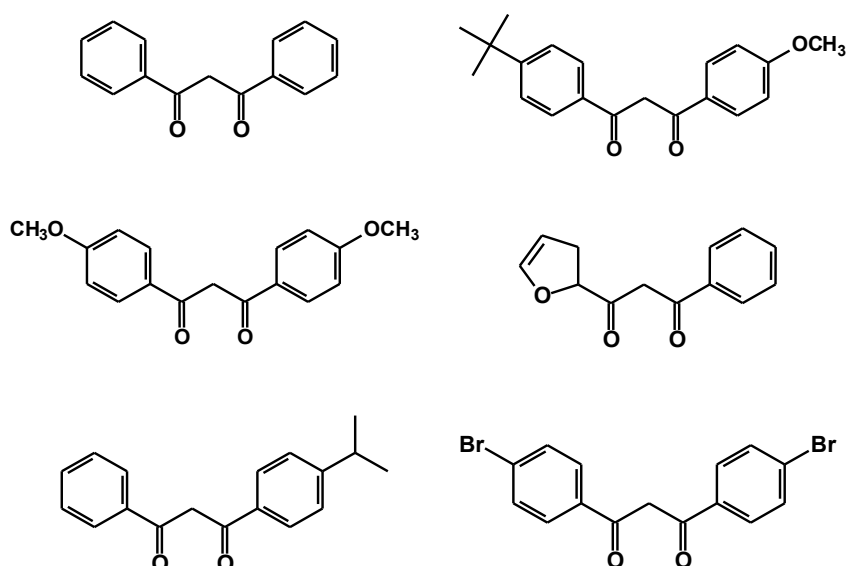


Figura 5 - β -dicetona aromáticas e heterocíclicas.

β -dicetonas são compostos que atraem o interesse da área de química de coordenação, pela capacidade que possuem de reagir com íons metálicos para

produzir uma série de complexos, os quais são empregados como aditivos para combustíveis, fluidos supercríticos, e em inúmeras reações de condensação, como por exemplo, complexos heterobimetálicos de lantanídeos, que têm sido usados como catalisadores assimétricos em síntese orgânica. As β -dicetonas se apresentam, principalmente, na forma enólica e como quelatos de metais, na presença de íons como Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , sendo que tais propriedades quelantes podem representar papel importante nas suas atividades antitumorais (QIAN et al., 2010).

As β -dicetonas são também denominadas dibenzoilmetanos (DBM) (1,3-Difenilpropano-1,3-diona) e diferoilmetanos (DFM) (3-methoxyphenyl-1,6-heptadiene-3,5-dione), cuja estrutura geral se encontram representada na figura 6, em suas formas enolizadas. São compostos cujas atividades antitumorais e fotoprotetoras (DBM) vêm sendo exploradas em diversos estudos (SINGLETARY et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2003; NAKANO et al., 2004; KHOR et al., 2009).

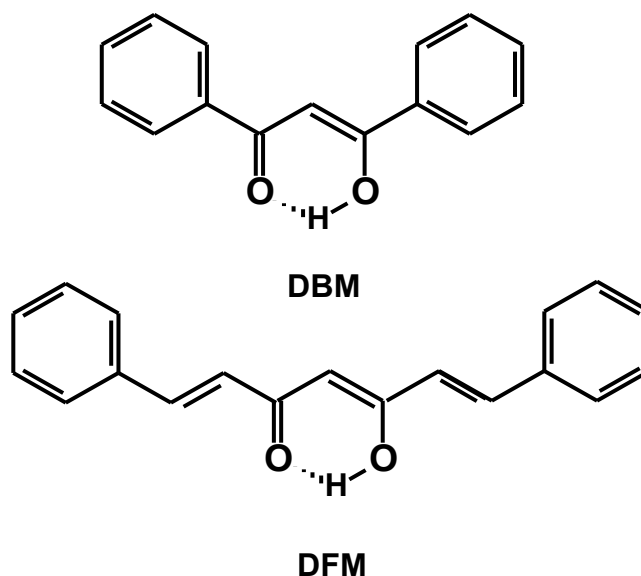


Figura 6 - 1,3-Difenilpropano-1,3-diona (DBM) e 1,7-Difenil-1,6-heptadieno-3,5-diona (DFM - diferoilmetano).

Na natureza, os dibenzoilmetanos (DBM) são encontrados em famílias como Annonaceas, Asteraceas, Menispermaceas, Rosaceas, Salicaceas e, especialmente, Fabaceas (gênero *Glycyrrhiza* e *Lonchocarpus*) e os diferoilmetanos (DFM) encontrados na família Zingiberaceae principalmente na

espécie *Curcuma longa* (Figura 7) (MAGALHÃES et al., 1997; NOGUEIRA et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2007).

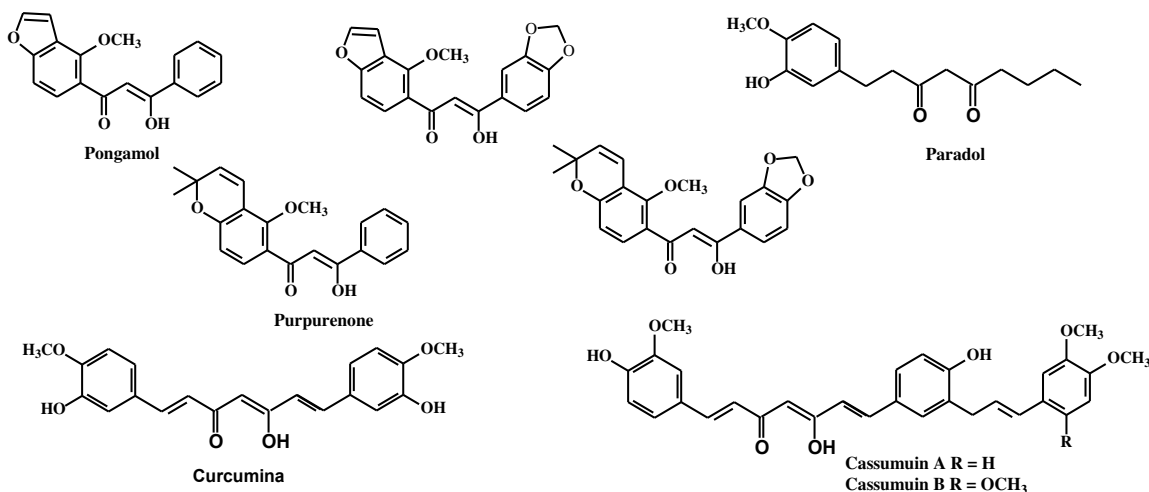


Figura 7 - Exemplos de β -dicetonas (em suas formas enolizadas) de origem natural.

Atividades biológicas

Dibenzoilmetanos (DBMs) também apresenta atividade fotoprotetora, como por exemplo o Eusolex® 8020 e o Parsol® 1789, usados na indústria cosmética já há alguns anos, como componentes de filtros solares, sendo, em sua maioria, mais eficientes contra radiação ultravioleta A (UVA), prevenindo sua penetração nas células e bloqueando a produção de radicais livres (NOGUEIRA et al., 2003).

A atividade fotoprotetora de uma série de derivados de dibenzoilmetano foi explorada por Nogueira et al. (2003), em um estudo que descreveram a síntese de dezenove compostos derivados dos dibenzoilmetanos comerciais (Eusolex® 8020 e Parsol® 1789), e avaliaram a atividade citotóxica de tais compostos, em quatro linhagens celulares derivadas de diferentes tipos de câncer humano. Dentre os compostos obtidos e testados, oito apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens celulares utilizadas. Tais compostos tiveram, ainda, sua fotoestabilidade avaliada após exposição à luz ultravioleta por nove horas, sendo que um deles apresentou-se altamente estável. Ademais, o mesmo composto apresentou IC₅₀ (concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular) menor que o composto doxorrubicina (agente quimioterápico de ampla utilização) para melanoma, reunindo assim, características desejáveis para sua aplicação em

formulações químico e fotoprotetoras (Figura 8).

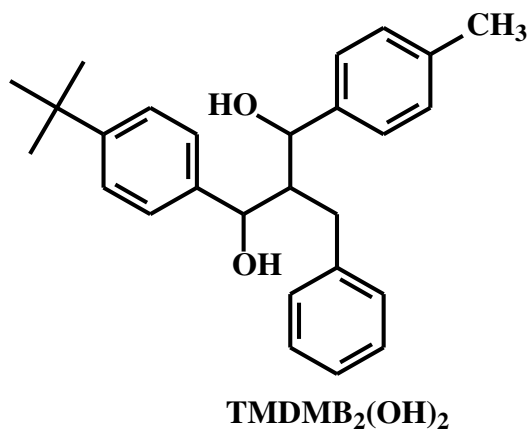


Figura 8 - β -dicetona TMDMB₂(OH)₂

Wetz e colaboradores (2004) apresentaram um derivado do 4-*tert*-butil-4'-metoxidibenzoilmetano (BM-DBM), o 1-(4-*tert*-butilfenil)-2-decanil-3-(4'-metoxifenil)-propano-1,3-diona (C10-DBM) (Figura 9), e compararam sua eficiência de absorção em soluções orgânicas com os resultados obtidos a partir de soluções idênticas contendo o BM-DBM, com ou sem a irradiação por lâmpada de xênon, e identificaram que sua absorbância de UVA foi acentuada sob irradiação, e sua fotoestabilidade, sob irradiação, foi maior do que a das soluções contendo o BM-DBM.

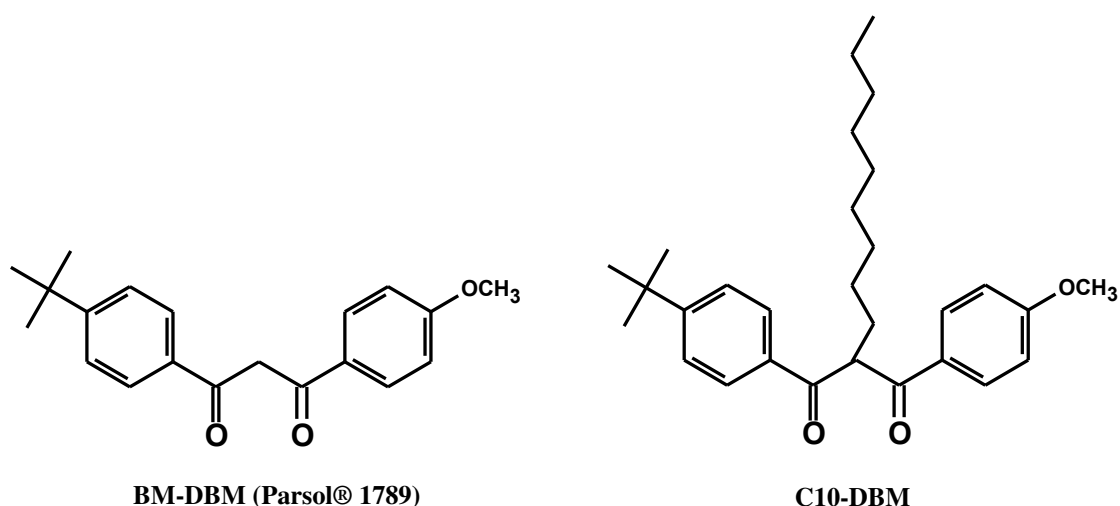


Figura 9 - Derivado 4-*tert*-butil-4'-metoxidibenzoilmetano (BM-DBM), o 1-(4- *tert*-butilfenil)-2-decanil-3-(4-metoxifenil)-propano-1,3-diona.

É importante ressaltar que o Parsol® 1789 é o derivado de DBM mais utilizado em formulações fotoprotetoras, sendo o seu uso aprovado pelas autoridades fiscalizadoras da Europa, Estados Unidos, Japão e Austrália. Esta classe de derivados de DBM apresenta alta absorção no UV em torno de 360 nm. Foi descrita a síntese de dezoito derivados de 1,3-dibenzoilmetano onde se relacionou as variações no espectro de absorção à natureza dos grupos substituintes doadores ou receptores. A presença de dois ou três grupos metoxi no mesmo anel aromático (2b, 2d, 2e e 2f) pareceu ser a característica mais importante para o uso cosmético dos compostos testados, porque mesmo após a irradiação, preservam suas propriedades absorptivas tanto em absorção UVA quanto ultravioleta B (UVB) (HUBAUD et al., 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 - Compostos que apresentaram maior absortividade em UVA/UVB

	R	R₁	R₂	R₃	R₄
2a	H	H	H	H	H
3a	OCH ₃	H	H	H	H
4a	CH ₃	H	H	H	H
5a	F	H	H	H	H
6a	CL	H	H	H	H
2b	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
3b	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
4b	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
5b	F	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
6b	CL	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
7b	BR	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
5c	F	H	OCH ₃	H	H
6c	CL	H	OCH ₃	H	H
7c	BR	H	OCH ₃	H	H
8c	COCH ₃	H	OCH ₃	H	H

2d	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
2e	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H
2f	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H

Zawadiak & Mrzyczek (2010) sintetizaram 10 analogos do Parsol e verificara que o grupo metoxi na posição *para* aumenta a absorção de radiação UVA. Quando dois grupos metoxi estão presentes, ocorre efeito sinérgico.

Puri e colaboradores (2016) avaliaram o efeito de uma formulação micro emulsionada com DBM (DBM ME) como agente fotoprotetor para radiação UVA. Os autores mostraram que esse composto pode ser usado para essa finalidade a partir dos resultados observados na permeação *ex vivo* e nos estudos *in vivo* revelando que o DBM ME penetrou eficazmente na pele e foi capaz de prevenir o dano provocado pela radiação.

Atividade antitumoral e mecanismos de ação

A despeito da atividade fotoprotetora, uma atividade que tem atraído à atenção dos pesquisadores consiste nas propriedades antitumorais dessa classe de compostos.

Singletary e colaboradores (1998) e Lin e colaboradores (2001) relacionaram a suplementação de dibenzoilmetano na dieta à sua atividade antineoplásica, demonstrando o papel de uma dieta de 1% de dibenzoilmetano na inibição de tumor mamário, induzido por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DBMA), em ratas (figura 10).

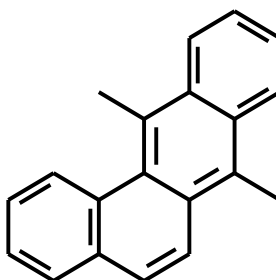


Figura 10 - 7,12-dimetilbenz[a]antracene (DBMA).

Singletary e colaboradores (1998) observaram que o efeito dessa redução estava associado com um aumento significativo nas atividades hepáticas da

glutathione S-transferase (GST), quinona-redutase (QR) e 7-etoxiorresorufina-O-detilase. Por outro lado, Huang e colaboradores (1998) verificaram que, ao administrar uma dieta de DBM 1% em ratas Sencar, além de inibir o tumor mamário induzido por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DBMA), inibiu também a incidência de linfomas/leucemias também induzida pelo DBMA.

O mesmo efeito foi observado por Shen e colaboradores (2007), mostrando que a administração de uma dieta contendo Sulforaphane (SFN) e dibenzoilmetano (DBM) na dose de 1 % isoladamente, ou em combinação, suprimiu, significativamente a tumorigênese do colo retal no modelo de animal com a mutação *ApcMin/+* (mutação responsável pela causa de 50 a 80% do câncer colo retal), demonstrando que os seus efeitos quimiopreventivos poderiam envolver mecanismos como a alteração do metabolismo do ácido araquidônico, a inibição da via de sinalização de sobrevivência celular, tal como Akt e MAPKs, e a indução da inibição do crescimento celular e da apoptose.

Lung e colaboradores (2009) avaliaram a eficácia de uma dieta suplementada com DBM 1% e 0,05% de Isotiocianato de fenetila (PEITC), metabólito do glicosinolato, que é encontrado com abundância em vegetais da família *Cruciferae*, na quimioprevenção do câncer de cólon. Os autores observaram que PEITC e DBM são compostos quimiopreventivos eficazes contra a carcinogênese do cólon induzida pelo modelo AOM/DSS. O mecanismo de ação *in vivo* do DBM pode ser através da desintoxicação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio por enzimas desintoxicantes/antioxidantes reguladas por *Nrf2A*, onde esse composto parece induzir um maior nível de expressão de *Nrf2*, resultando em uma indução mais robusta de genes desintoxicantes e antioxidantes de fase II, particularmente, *GSTM1*, *HO-1* e *NQO1*, que desempenhariam um papel importante na desintoxicação de intermediários reativos carcinogênicos e espécies reativas de oxigênio/nitrogênio.

Ishida e colaboradores (2002) sintetizaram 26 β -dicetonas (DBM). Os compostos foram avaliados quanto à citotoxicidade *in vitro* contra um painel de linhagens de células tumorais humanas. O composto X (figura 11), um derivado α substituído de DBM, foi o análogo mais potente contra várias linhas celulares, incluindo HOS (câncer de osso) e 1A9 (câncer da mama). De acordo com os

autores, a atividade desse composto poderia estar relacionada à sua interação com o DNA, já que é altamente eletrofílico.

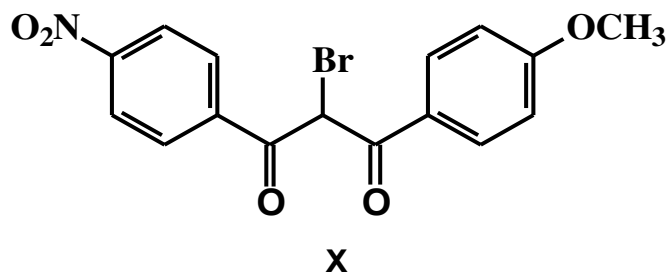
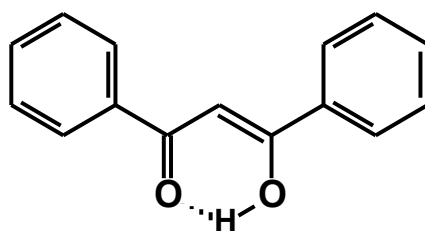
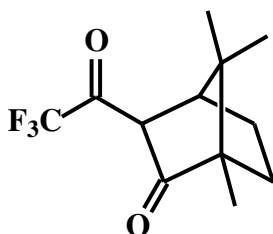


Figura 11 - Análogo X mais potente contra linhagens de células câncer de ovário (1A9) e Câncer de osso (HOS).

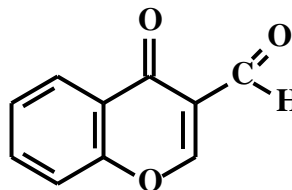
Jackson e colaboradores (2002) estudaram o efeito do DBM no crescimento de células de câncer de próstata. Neste caso, o DBM pareceu inibir o crescimento celular de uma forma dose-dependente. Porém, também pareceu existir um efeito sobre o ciclo celular, com suspensão na fase G₁ pela indução de proteínas inibitórias do ciclo celular. Nakano e colaboradores (2004) relacionaram β-dicetonas, inclusive o dibenzoilmetano (DBM), à inibição de tumores por meio da indução de mecanismos apoptóticos, como a ativação de caspases. Nesse estudo, foi analisada a atividade citotóxica de uma série de β-dicetonas, pelo método que usa o MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) como corante indicativo da viabilidade celular. Após esse teste, o índice de seletividade (IS) de cada um dos compostos (índice que relaciona o efeito citotóxico do composto sobre linhagens celulares derivadas de células normais e de linhagens derivadas de células tumorais) foi avaliado. Por fim, os pesquisadores avaliaram a atividade de caspases após o tratamento das células com os compostos e identificaram a ativação de caspases 3, 8 e 9 pelo composto BD17 (Figura 12).



BD2 IS 3.7



BD13 IS 4.3



BD17 IS 5.4

Figura 12 - Estruturas de β -dicetonas BD2, BD13 e BD17 atuam pela indução de mecanismos apoptóticos, como a ativação de caspases.

KHOR e colaboradores (2009) avaliaram, *in vivo*, o efeito de DBM na dieta em relação à neoplasia de próstata usando modelo de camundongos TRAMP (transgênicos para câncer de próstata), além de analisar os efeitos do tratamento de linhagens celulares de câncer de próstata com o composto. Os animais foram submetidos a uma dieta suplementada com DBM a partir de 12 semanas de vida, até a 24^a semana. Os animais controle receberam somente a dieta, sem suplementação. Após os períodos de tratamento estabelecidos, os animais foram eutanasiados e submetidos à autópsia simples, sem identificação de alterações significativas, e tiveram o aparelho genitourinário (vesícula seminal, próstata e bexiga) excisados e suas amostras foram submetidas à análise histológica detalhada, além de *westernblotting*, para quantificação de proteínas relacionadas ao ciclo celular, também analisadas nas linhagens celulares usadas no teste *in vitro*, e quantificação do DBM em amostras de plasma e também dos tecidos. As células tratadas foram submetidas à citometria de fluxo para estabelecimento da fase do ciclo celular em que se encontravam, e também tiveram amostras direcionadas para *westernblotting*, que identificou que o DBM pode atuar pela inibição da progressão do ciclo celular, suprimindo proteínas relacionadas ao ciclo celular, como pS6, c-myc, pRb, ciclina D1, ciclina A, Akt fosforilada, PDK-1 fosforilada e S6 fosforilada.

Liao e colaboradores (2015) testaram o DBM e dois análogos (Figura 13) a fim de esclarecer os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos da DBM e dos seus análogos sobre a metástase de células MCF-7 induzida por 13-acetato de forbol-12-miristato (PMA). Os autores verificaram que DBM, HDB e HMDB inibiram a migração celular e a invasão de células MCF-7 mediada por PMA por inibição da expressão de metaloproteinase de matriz (MMP) -9. Rottlerina, um inibidor de proteína quinase C (PKC) e LY294002, um inibidor de fosfatidilinosítido 3-quinase (PI3K), reduzindo também a expressão mediada por PMA de MMP-9. Além disso, observaram também que os compostos DBM, HDB e HMDB impediram a ativação das vias PKC δ e PI3K (enzimas responsáveis pela transdução de sinais intracelulares, desempenhando papel na regulação da proliferação e migração celular) por inibição da sua fosforilação. Em 2003, Min-Hsiung Pan e seus colaboradores também observaram que esses compostos foram capazes de induzir a apoptose em células COLO 205 de carcinoma colo retal, sendo que o composto HDB induziu a morte celular apoptótica acompanhada por *upregulation* de ciclina D3, Bax e p21 e regulação negativa de Bcl-XL, não tendo efeito nos níveis de proteína Bcl-2 e Bad.

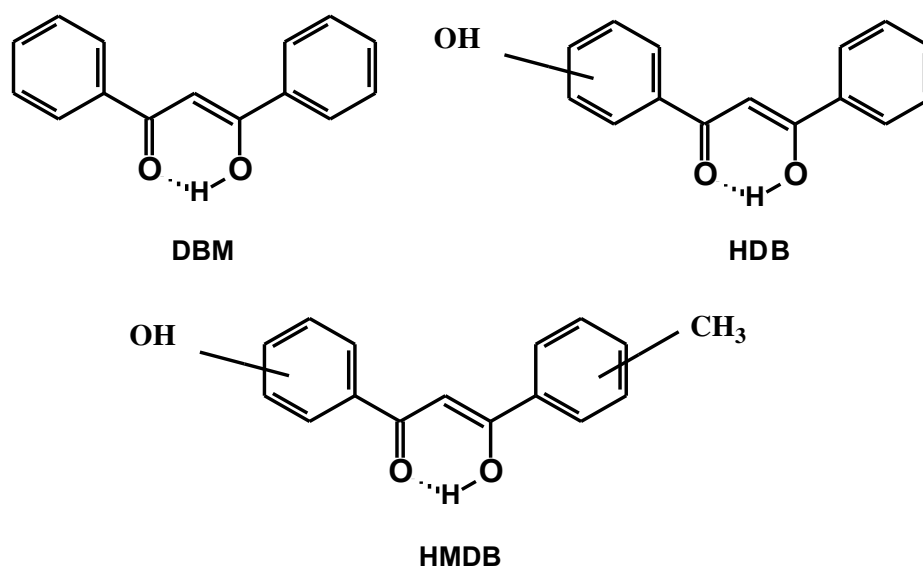


Figura 13 - β -dicetonas DBM, HDB e HMDB (formas enolizadas) inibiram a migração celular através da inativação das vias PKC δ e PI3K.

Alguns estudos têm relacionado a atividade do DBM a mecanismos celulares variados, além da supressão da progressão do ciclo celular. Os mecanismos listados

vão desde inibição da mutagenicidade, indução de apoptose, até a atividade oxidante.

Wang e colaboradores (1991) demonstraram que o DBM é capaz de inibir a mutagenicidade induzida por metilnitrosourea, benzo[a]pireno, aflatoxina e 2-nitrofluoreno na bactéria *Salmonella typhimurium*. A ligação do benzo[a]pireno e da aflatoxina B₁ ao RNAt também foi inibida por este composto. No mesmo estudo, foi observado que a inibição da mutagenicidade pela metilnitrosourea ocorreu quando a *S. typhimurium* foi exposta concomitantemente ao mutagênico e ao DBM, mas não quando o DBM foi adicionado 1 hora após a exposição ao mutagênico. Isto pode significar que o DBM pode inibir a mutagenicidade e ligação de carcinógenos químicos a ácidos nucleicos, provavelmente por capturar eletrófilos carcinogênicos.

Wang e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos do hidroxibenzoilmetano (Figura 14), sobre a via da ornitina descarboxilase (ODC).

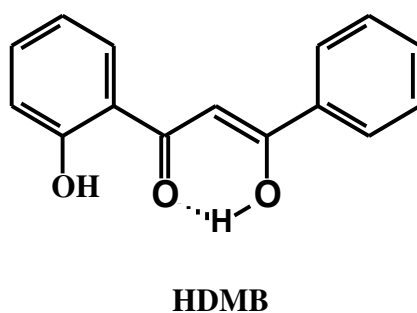


Figura 14 - Hidroxidibenzoilmetano (HDBM).

A ODC é uma enzima envolvida na biossíntese de poliaminas (putrescina, espermetina, espermina) que atuam em funções biológicas variadas, como embriogênese, ciclo celular e proliferação celular, cuja expressão e atividade aparecem aumentadas em células tumorais. Inibidores de ODC podem induzir apoptose em modelos *in vitro* e *in vivo*. Após o tratamento das células utilizadas no estudo citado com hidroxidibenzoilmetano (HDMB), foi identificada uma redução na atividade e expressão da enzima ODC de acordo com a dose do tratamento recebido, com indução de apoptose nas células tratadas. Ademais, a superexpressão da enzima ODC reduziu a apoptose induzida pelo tratamento com hidroxidibenzoilmetano, prevenindo a liberação de citocromo c e consequente ativação da via das caspases. Observou-se, ainda, que o tratamento com HDB

aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a super expressão da enzima ODC conseguiu diminuir esses níveis, concluindo-se que o HDMB possui propriedade apoptótica nas células por meio do aumento dos níveis de ROS.

Já Hegedüs e colaboradores (2013) realizaram um *screening* entre os compostos de uma biblioteca própria, e identificaram vinte e nove compostos com atividade antioxidante, com base em testes de viabilidade variados, como o ensaio de resazurina, em que as células são tratadas com o composto-teste e posteriormente expostas à peróxido de hidrogênio, e o ensaio com MTT, que identifica a viabilidade celular indireta pela medida da absorbância, além de testes específicos para avaliação de enzimas e proteínas relacionadas à morte celular. Dos 29 compostos obtidos, quatro eram derivados de dibenzoilmetano (Figura 15), que apresentaram atividade antinecrótica no experimento realizado, sem, entretanto, ativar caspases. Foi identificado que tais compostos atuam inibindo a kinase ERK 1/2, e ainda, que esta inibição não foi específica a nenhum um tipo celular.

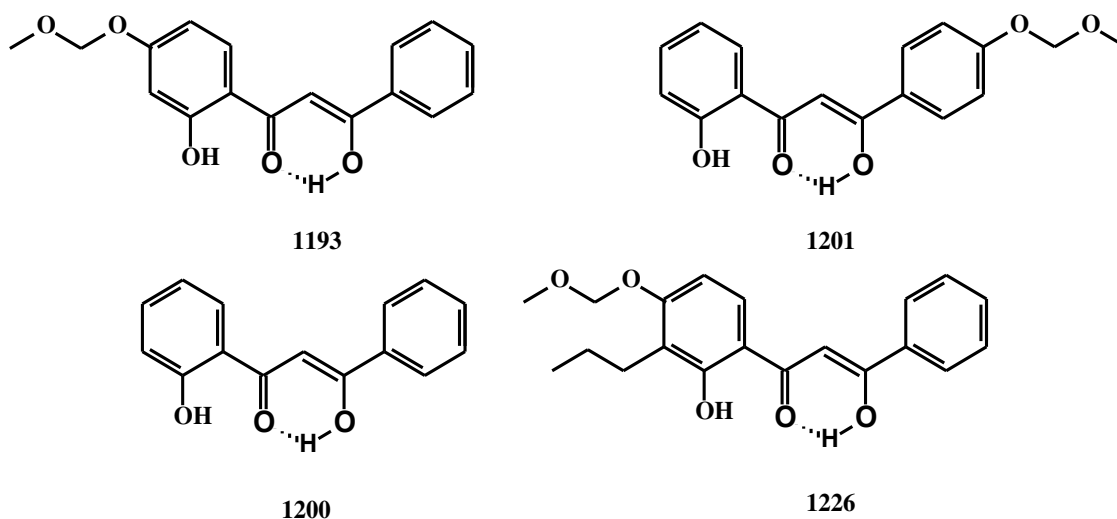


Figura 15 - Estruturas de β -dicetonas (formas enolizadas) com atividade antinecrótica.

Takano e colaboradores (2007) avaliaram os derivados de dibenzoilmetanos 14-26 (2,2'-dimethoxydibenzoylmethane) em células SH-SY5Y e PC12 e verificaram que esses derivados regulam o estresse do retículo endoplasmático (ER) e o estresse oxidativo, verificando que esta propriedade está associado a sua propriedade antioxidante, impedido a produção de ROS quando as células foram

expostas a oxidantes tais como peróxido de hidrogénio e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ou um estressor de ER brefeldina A (BFA) Figura 16.

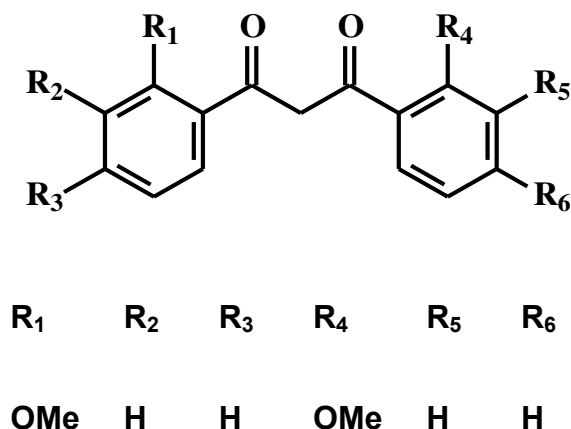


Figura 16 - Derivados de dibenzoilmetanos que apresentaram atividade antioxidante impedido a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Takano e colaboradores (2017) também avaliaram as células microglial BV-2 de ratos e verificaram que o DBM 14-26 inibiu a expressão de iNOS induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e a produção de óxido nítrico (NO) também em microglia. DBM 14-26 também suprimiu a expressão de IL-1b induzida por LPS. Estes resultados indicam que a ativação microglial por LPS causa morte celular neuronal e DBM 14-26 protege o neurônio através da inibição da ativação microglial, podendo ser um candidato terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Pettinari e colaboradores (2017) avaliaram a atividade antitumoral de 7 DBM complexados com rutênio contra linhagens celulares de mieloma múltiplo humano U266 e RPMI. Os autores verificaram que todos os compostos derivados de DBM-Ru foram eficazes na redução da viabilidade celulares de uma forma dependente do tempo e da dose, a partir de 24 horas pós-tratamentos, sendo mais efetivo que o DBM na sua forma não complexada. O composto mais efetivo dessa série de 7 foi o complexo DBM-Ru contendo *p*-cimeno (Figura 17)

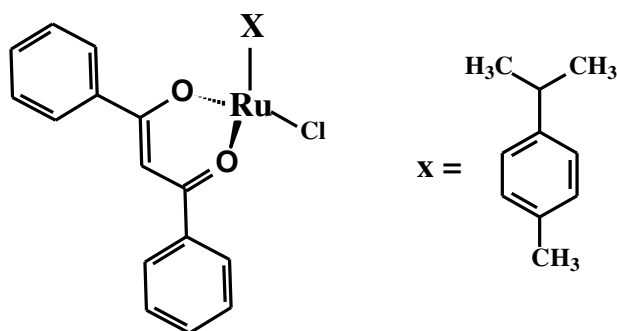


Figura 17 - Complexo DBM-Ru-*p*-cimeno, mais ativo para linhagens celulares de mieloma múltiplo humano U266 e RPMI.

Os mesmos autores também avaliaram a atividade antioxidante dos 7 complexos DBM-Ru e verificaram que o composto 3 (figura 18) foi o mais ativo, sendo mais efetivo que o composto usado como controle (Trolox).

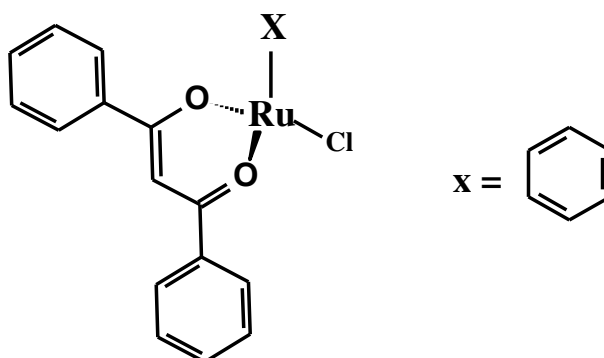


Figura 18 - Complexo DBM-Ru-benzeno, mais ativo para atividade anti oxidante.

Chinthala e colaboradores (2017) sintetizaram três β -dicetonas complexadas em oxovanádio (VO) (Figura 19) e depois avaliaram *in vitro* a eficácia da absorção da glicose e a citotoxicidade usando linhagens celulares de C2C12 (músculo esquelético de rato) e HeLa (câncer cervical humano). Esses autores verificaram que os complexos sintetizados reduziram os níveis de glicose, e apresentaram boa citotoxicidade para as linhagens celulares testadas. Sendo que os valores de IC₅₀ do complexo [VO (dbm) 2] são comparáveis ao composto padrão da Cisplatina. O complexo [VO (dbm) 2] mostra melhor capacidade de absorção de glicose na linhagem celular C2C12 e também apresentam maior citotoxicidade na linhagem celular HeLa do que os outros dois complexos sintetizados

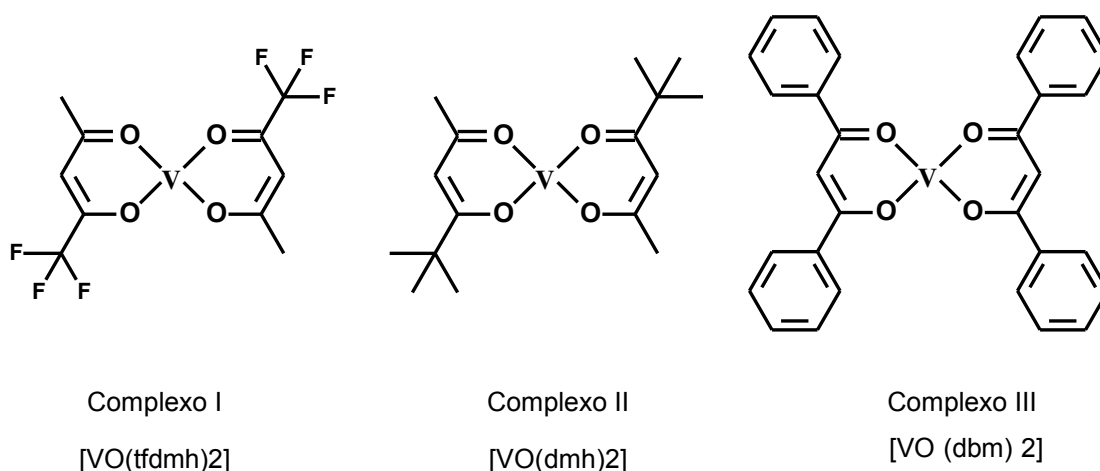


Figura 19 - Complexos β -dicetonas oxovanádio (IV).

Farmacocinética

Lin et al. 2011 analisaram a biodisponibilidade oral e intravenosa (I.V) de DBM no modelo de ratos, com doses de 10 – 250 mg/kg. Com a previsão de baixa solubilidade do DBM (22 $\mu\text{g/mL}$), foram realizados experimentos utilizando-se emulsões com nanopartículas. Os parâmetros de farmacocinética foram realizados como modelo não compartimental. Os dados encontrados sugeriram que o DBM comporta-se como farmacocinética linear em ratos machos com as doses testadas.

O clearance plasmático e o tempo de meia vida permaneceram inalterados com o aumento das doses, sugerindo novamente a farmacocinética linear do DBM em ratos depois de administração intravenosa. No geral, o DBM mostrou-se como um padrão nas propriedades farmacocinéticas muito similares nas doses de 10 e 20 mg/Kg, e o DBM parece ser igualmente distribuído entre o plasma e sangue de ratos. O clearance do sistema sanguíneo do DBM encontrado sugere que DBM tem um lento clearance hepático em ratos Sprague-Dawley.

O mecanismo absorptivo indicou capacidade limitada de captação no sistema de transporte, o qual poderia alcançar a saturação em altas doses. Assim, a absorção pode ter uma taxa limitada quando o DBM for administrado oralmente. Foi verificada baixa taxa de absorção e isso pode ser resultado de precipitação do DBM no veículo no trato gastrointestinal (TGI). Esse evento pode ser mais significativo em altas doses, o que pode causar baixa biodisponibilidade oral. A fração absorvida (Fabs) é determinada principalmente pela solubilidade e estabilidade da droga no TGI e sua

permeabilidade através na membrana intestinal. Esses autores fizeram a previsão *in silico* da absorção do DBM utilizando o *software* GastroPlus (Simulations CA). DBM é uma droga lipofílica com valor de Log P de 2,7 e valor de Log D de 2,72 no pH=6,8, calculado pelo GastroPlus. O pKa do DBM foi previsto em 8,64, sendo um ácido fraco, o qual pode se precipitar no estômago. A solubilidade do DBM foi prevista com valor baixo, em 22 µg/mL pH=6,8. Esses resultados previstos *in silico* confirmam a noção de que a baixa absorção no TGI pode ser a causa da baixa biodisponibilidade. Para determinar a causa da baixa biodisponibilidade, foi realizado o teste de sensibilidade pelo GastroPlus. O resultado do teste de sensibilidade foi equitativo para permeabilidade e solubilidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As β -dicetonas possuem um grande potencial como protetores solares e antitumorais. Há um grande desafio com relação à farmacocinética dessa classe de compostos, visto que a absorção oral é limitada. Assim, estudos com diferentes formas de administração são necessários para que esses compostos possam se tornar alternativas no tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

- ALMELAH, E., DAVID P., SMITH, T., MCGOWN, A., AZIZ, A., POTGIETER, H. J., RAGAZZON, P. Dibenzoyl-methane Derivatives as a Potential and Exciting New Therapy for the Treatment of Childhood Bone Cancer, **Anticancer Res.**, 36: 6043 - 6050, 2016.
- BINNEMANS, K. Rare-Earth Beta-Diketonates. In: GSCHNEIDNER, K. A., BÜNZLI, J. C., PECHARSKY, V. Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths. North-Holland, Amsterdam: Elsevier, 2005. vol. 35, p. 107-272. 27
- CHENG, G. et al., Synthesis, characterization and luminescence of novel beta diketones and Eu(III) ternary complex. **Spectroscopy and Spectral Anal.**, 31: 2346 - 49, 2011.
- CHINTHALA, C. P., ANGAPPAN, S. Effect of solvent coordination on the structure of β -diketone-based vanadyl complexes and assessment of *in vitro* antidiabetic activity and cytotoxicity. **Appl. Organometal Chem.**, 2017;e 3700. Disponível em <<https://doi.org/10.1002/aoc.3700>> Acesso em 18 jun 2017.
- CLAISEN, L., LOWMAN, O. Notiz über die Einwirkung von salpetriger Säure auf Ketone. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, 20: 651-654, 1887.
- COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELOS, M., In **Substâncias Carboniladas e Derivados**, Sao Paulo: Bookman, 2003; pp. 17-214.
- HEGEDÜS, C. et al. Cytoprotective dibenzoylmethane derivatives protect cells from oxidative stress-induced necrotic cell death. **Pharmacol. Res.**, 72: 25 - 34, 2013.
- HUANG, M. T. et al. Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors and lymphomas/leukemias in Sencar mice. **Carcinog.**, 19: 1697 - 700, 1998.
- HUBAUD, J. et al. Synthesis and spectroscopic examination of various substituted 1,3-dibenzoylmethane, active agents for UVA/UVB photoprotection. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 92: 103-109, 2008.
- ISHIDA, J., OHTSU, H., TACHIBANA, Y., NAKANISHI, Y., BASTOW, K. F., NAGAI, M., WANG. H., ITOKAWA, H., LEE, K., Antitumor agents. Part 214: Synthesis and evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents. **Bioorg. Med. Chem.**, 10: 3481 - 3487, 2002.

JACKSON, K. M., De Leon, M. Verret, C. R., Harris, W. B. **Cancer Lett.**, 178: 161. **2002**

LIAO, Y., TZENG, Y., HUNG, H., & LIU, G. Dibenzoylmethane, hydroxydibenzoylmethane and hydroxymethyldibenzoylmethane inhibit phorbol-12-myristate 13-acetate-induced breast carcinoma cell invasion. **Mol. Med. Reports**, 11: 4597 - 4604, 2015.

KHOR, T. O. et al. Dietary feeding of dibenzoylmethane inhibits prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. **Cancer Res.**, 69: 7096 - 102, 2009.

LIN, C. et al. Inhibition by dietary dibenzoylmethane of mammary gland proliferation , formation of DMBA $\pm$ DNA adducts in mammary glands , and mammary tumorigenesis in Sencar mice. **Cancer Lett.**, 168: 125-132, 2001.

LIN, W., HONG, J. L., SHEN, G., WU, R. T., WANG, Y. et. al. Pharmacokinetics of Dietary Cancer Chemopreventive Compound Dibenzoylmethane in Rats and the Impact of Nanoemulsion and Genetic knockout of Nrf₂ on its Disposition. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**: 32: 65 - 75, 2011

MAGALHÃES, A. F., NOGUEIRA, M. A. et. al. Three dibenzoylmethane derivatives from Lonchocarpus species. **Phytochemistry**, 46: 1029-1033, 1997.

MAGALHÃES, A. F. et al. Flavonoids of Lonchocarpus montanus A.M.G. Azevedo and biological activity. **A. Acad. Bras. Cien.**, 79: 351 - 367, 2007.

NAKANO, K. et al. Induction of Apoptosis by β -Diketones in Human Tumor **Cells**, 718: 711 - 17, 2004.

NOGUEIRA, M. A. et al. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **II Farmaco**, 58: 1163 - 69, 2003.

PAN, M. H., HUANG, M. C., WANG, Y. J., LIN, J. K. AND LIN, C.H.: Induction of apoptosis by hydroxydibenzoylmethane through coordinative modulation of cyclin D3, Bcl-X(L), and Bax, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells. **J. Agric. Food Chem.**, 51: 3977 - 3984. 2003

PETTINARI, R., MARCHETTI, F., PETRINI, A., PETTINARI, C., LUPIDI, G., BELÉN FERNÁNDEZ, DIÉGUEZ, A. R., SANTONI, G., NABISSI, M. Ruthenium(II)-arene complexes with dibenzoylmethane induce apoptotic cell death in multiple myeloma cell lines. **Inorg. Chim. Acta**, 454: 139 - 148, 2017.

PURI, A., KAUR, A; RAZA, K.; GOINDI, S., KATARE, O. P.. Development and evaluation of topical microemulsion of dibenzoylmethane for treatment of UV induced photoaging. **J. Drug Delivery Sci. Technol.**, 37: 1e12, 2017

QIAN, C., ZHANG, X., ZHANG, Y., SHEN, Q. Heterobimetallic complexes of lanthanide and lithium metals with dianionic guanidinate ligands: Syntheses, structures and catalytic activity for amidation of aldehydes with amines. **J. Organomet. Chem.**, 695: 747 - 752, 2010.

RUSTINI, V. C. F. R., GALEMBECK, S. E. **Braz. J. Pharm. Sci.**, 39 (sup. 2), MM06, 2003.

SHEN, G., KHOR, T.O., HU, R., YU, S., NAIR, S., HO C., REDDY, B. S., HUANG, M.T., NEWMARK, H.L. KONG A. T.. Chemoprevention of Familial Adenomatous Polyposis by Natural Dietary Compounds Sulforaphane and Dibenzoylmethane Alone and in Combination in *Apc*^{Min/+} Mouse. **DOI:** 10.1158/0008-5472.CAN-07-1112 Published 15 October 2007.

SINGH, S., JOSHI, Y. C. Synthesis and antimicrobial screening of novel b-diketones containing 2-substituted 2-imidazoline moiety. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 5: 398 – 404, 2013.

SINGLETERY, K. et al. Effect of the β -diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene. **Carcinog.**, 19: 1039 - 1043, 1998.

SMITH, M.B.; MARCH, J., In *March's Advanced Organic Chemistry*, Willey Inter-Science: New York, **2001**; 5th Ed., pp. 32 - 97.

TAKANO, K et al., A dibenzoylmethane derivative protects dopaminergic neurons against both oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology.** 293: C1884-C1894 2007; **DOI:** 10.1152/ajpcell.00305.2007

TAKANO K., et al. A dibenzoylmethane derivative inhibits lipopolysaccharide-induced NO production in mouse microglial cell line BV-2. **Neurochem Int.** 2017 Apr 5. pii: S0197-0186(17)30133-X.

WANG, M., LIAO, Y. Hydroxydibenzoylmethane induces apoptosis through repressing ornithine decarboxylase in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Exp. Mol. Med.**, 43:189 - 196, 2011.

WETZ, F. et al. Photochemical Behavior of a New Long-chain UV Absorber Derived from 4-tert- Butyl-4'-metoxidibenzoilmetano Photochemical Behavior of a New Long-chain UV Absorber Derived from 4-tert-Butyl-4'-Methoxydibenzoylmethane. **Photochem. Photobiol.**, 80: 316 - 321, 2004.

WILSON, J. J. & LIPPARD, S. J. In vitro anti cancer activity of *cis*-diammineplatinum (II) complexes with β -diketones leaving groups ligands. **J. Med. Chem.**, 55: 5326 - 36, 2012.

ZAWADIAK, J., MRZYCZEK, M. UV absorption and keto-enol tautomerism equilibrium of methoxy and dimethoxy 1,3-diphenylpropane-1,3-diones. **Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.**, 75: 925 - 929, 2010. doi: 10.1016/j.saa.2009.12.040.

ZHANG, P. Gleevec (STI 571) inhibits lung cancer cells growth (A 549) and potentiates the cisplatin effects. **Mol. Cancer**, 2: 2003.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO DBPOH

RESUMO

O dibenzoilmetano (DBM) (1,3-difenilpropano-1,3-diona) e seus derivados, são pequenas β -dicetonas, fontes promissoras de novas substâncias antitumorais. Poucos estudos existem sobre a farmacocinética dos DBMs e até o momento não encontramos na literatura nenhum estudo sobre o uso tópico do DBM, tampouco com seus derivados. Assim, o objetivo desse estudo foi sintetizar um derivado do dibenzoilmetano (DBPOH), caracterizar sua identificação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e propor futuras ferramentas de identificação *in vivo* utilizando a ferramenta Cromatografia Líquida Acoplada a Espectômetro de Massas (LC/MS). O composto DBPOH, inédito na literatura, foi sintetizado em duas etapas (alquilação e mono redução). Na primeira etapa da síntese, foi obtido o composto alquilado, com a duração de 72 horas. O rendimento dessa etapa foi de 78%. Na segunda etapa da síntese, o composto alquilado sofreu a redução em uma carbonila e sua estrutura é demonstrada por ressonância, bem como a cromatografia em camada delgada (CCD), com rendimento de 42%. O composto purificado por CLAE teve um tempo de retenção de 47 minutos com fase móvel mistura água ultrapura MilliQ e metanol Merck grau HPLC (20:80), razão de fluxo 3 mL/min. O DBPOH foi indentificado através de UPLC-MS/MS, em soro de camundongos C57Bl inoculados com células de melanoma B16F10, após administração tópica do composto. A utilização do uso tópico pode ser uma solução para a baixa biodisponibilidade dos derivados do DBM e com técnicas padronizadas de identificação desses compostos podem ser utilizadas na identificação do composto nos diversos órgãos de animais de experimento, além da já aqui testada, (soro).

ABSTRACT

Dibenzoylmethane (DBM) (1,3-diphenylpropane-1,3-dione) and its derivatives are small β -diketones, promising sources of new antitumor substances. Few studies exist on the pharmacokinetics of DBMs and to date there have been no studies on the topical use of DBM in the literature or its derivatives. The aim of this study was to synthesize a dibenzoylmethane derivative (DBPOH), to characterize its identification in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and to propose future in vivo identification tools using the Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometer tool (LC / MS). Unpublished DBPOH in the literature was synthesized in two steps (alkylation and mono reduction). In the first step of the synthesis, the alkylated compound was obtained, with the duration of 72 hours. The yield of this step was 78%. In the second step of the synthesis, the alkylated compound undergoes reduction in a carbonyl and its structures are demonstrated by resonance as well as thin layer chromatography (CCD) in 42% yield. The HPLC-purified compound had a retention time of 47 minutes with mobile phase mixing of ultra-pure MilliQ water and methanol Merck grade HPLC (20:80), flow rate 3 mL / min. DBPOH was identified by UPLC-MS / MS in serum from C57Bl mice inoculated with B16F10 melanoma cells after topical administration of the compound. The use of topical use may be a solution for the low bioavailability of the DBM derivatives and standardized techniques for identifying these compounds can be used to identify the compound in the various organs of experimental animals in addition to the one already tested (serum).

INTRODUÇÃO

O dibenzoilmetano (DBM) (1,3-difenilpropano-1,3-diona) e seus derivados, são pequenas β -dicetonas, fontes promissoras de novas substâncias antitumorais (NOGUEIRA *et al.*, 2003; NAKANO *et al.*, 2004; KHOR *et al.*, 2009). Os DBMs são considerados um subgrupo na classe dos flavonoides e não são encontradas com facilidade na natureza, podendo, porém, serem isolados principalmente no gênero *Lonchocarpus*. Esses tipos de flavonoides foram isolados pela primeira vez na espécie *Lonchocarpus latifolius* (Wild) DC (MAGALHÃES, *et al.*, 1997; NOGUEIRA *et al.*, 2003). As principais propriedades biológicas do DBM e seus derivados descritos na literatura são: fotoprotetoras e antineoplásicas no combate aos cânceres de mama, próstata e intestino. (LIN *et al.* 2001; JAKSON *et al.* 2002; CHEN, 2009).

Poucos estudos existem sobre a farmacocinética dos DBMs e até o momento não encontramos na literatura nenhum estudo sobre o uso tópico do DBM, e seus derivados.

A busca incessante por novas vias mais eficientes de distribuição de medicamentos para os sítios tumorais constitui um dos desafios encontrados pelas pesquisas da área. Atualmente, a pele tem sido alvo de estudos e análises cada vez mais detalhadas, em busca de alternativas à utilização de drogas sistêmicas injetáveis (BAROLI, B, 2010; CEVC, G 2010; LADEMANN, *et al.*, 2011). A pele atua como barreira física primária frente à penetração de agentes externos químicos e biológicos e, também, à perda de água pelo organismo, graças à composição de seu estrato córneo. Além disso, atua, ainda, minimizando os efeitos da radiação ultravioleta e infravermelha (BAROLI, B. 2010). As vantagens da aplicação local (tópica) ou transdérmica de medicamentos sobre os métodos tradicionais orais ou intravenosos permeiam a prevenção do metabolismo de primeira passagem e minimização de dor até a possível liberação prolongada e controlada da droga, além do importante fato de constituir uma via de terapia mais aceitável para o paciente e amenizar a ampla gama de efeitos colaterais das demais vias de administração medicamentosa.

Assim o objetivo desse estudo foi sintetizar um derivado inédito na literatura do dibenzoilmetano (DBPOH), identificar esse composto através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e propor futuras ferramentas de identificação *in vivo* utilizando a ferramenta Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas (LCMS), utilizando soro de camundongos C57BL, inoculados com células de melanoma B16F10 e tratados com o DBPOH em uma formulação transdérmica.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram feitas no aparelho Shimadzu, ultravioleta/visível (UV/VIS), usando-se coluna octadecilsilano (ODS) de 250 x 4,6 mm, fase móvel isocrática 80:20 (H₂O:MeOH) em 50 min, comprimento de onda de detecção 254 nm e fluxo 3,0 mLmin⁻¹

As análises por UPLC-MS/MS sistema LC-MS/MS utilizando o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8 µm, 2,1 x 50mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda Zorbax SB- C18, 1,8 µm (Agilent). A fase móvel consistiu: (A) ácido acético 0,02% em água e (B) ácido acético 0,02% em acetonitrila em um gradiente de tempo/%B de: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. Fluxo de 0,3 mL/min⁻¹ e temperatura da coluna de 23 °C. No espectrômetro de massas foi utilizada a fonte de ionização ESI (Electrospray Ionisation) com as seguintes condições: temperatura de gás 300 °C, fluxo de nitrogênio de 10 L/minuto, pressão de nebulização de 35 psi e voltagem capilar de 4.000 V.

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C, DEPT, foram obtidos em espectrômetros 400 da Bruker no Departamento de Química da UFMG. Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl₃) e água deuterada (D₂O), usando-se como referência interna o tetrametilsilano (TMS).

As placas cromatográficas preparativas (PCP) foram feitas com sílicagel G e sílicagel GF₂₅₄ Merck na proporção de 2:1, sobre suporte de vidro (espessura de 1 mm).

As cromatografia em camada delgada foram feitas em cromatofolhas de alumínio sílicagel G F₂₅₄ 0,2 nm Art. 1.05554 Merck. Reveladores: Lâmpada de UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm.

Todas as cromatografias foram realizadas no Laboratório Química e Bioquímica de Produtos Naturais (Bionat) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

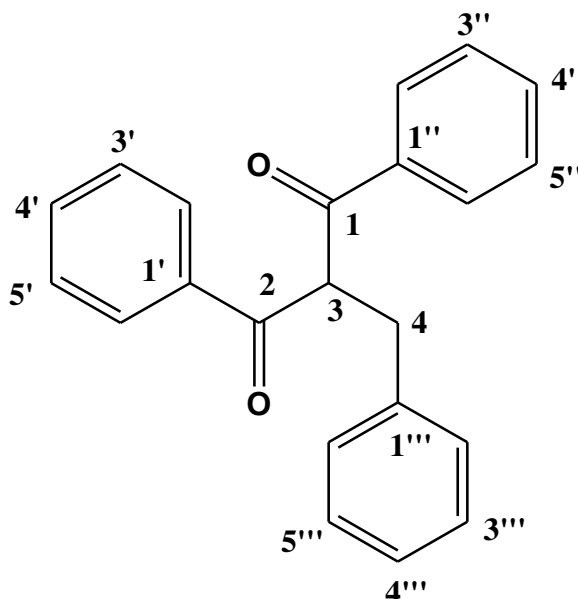
Síntese do composto 1,3-Difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona

A síntese do derivado de DBM ($C_{22}H_{20}O_2$) utilizada nesse trabalho foi realizada em duas etapas. Na primeira foi feita uma reação de alquilação e na segunda etapa, uma reação de redução.

Alquilação

Em um balão de fundo redondo de 100 mL contendo dibenzoilmetano (1,34 mmol) adicionou-se K_2CO_3 (4,02 mmol) e acetona (20 mL), deixou-se sob agitação por 30 minutos. Após este tempo, adicionou-se lentamente uma solução do brometo de benzila (1,34 mmol), em acetona (10 mL). A mistura reacional foi agitada vigorosamente por 72h e, então, filtrada para remoção dos sólidos em suspensão. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna cromatográfica (CC, hexano/acetato de etila 95:5), fornecendo o produto alquilado desejado (1,3-difenil-2benzil-1,3-propanodiona - $DBPO_2$). A reação foi acompanhada através de cromatografia de camada delgada (CCD).

(±)-1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBPO₂)



Aspecto Físico: Sólido amorfo incolor

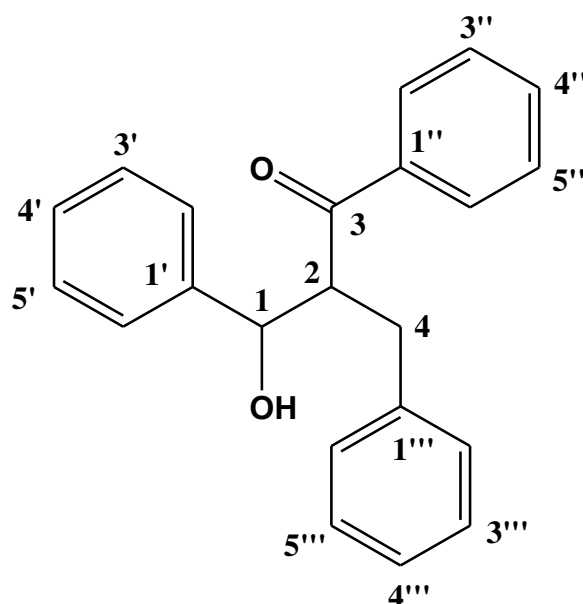
RMN ¹H δ : 7,88 (4H, *dd*, *J* = 10; 2 Hz, H-2', H-6', H-2'', H-6''), 7,12-7,56 (11H, *m*, H-3', 4', 5', 3'', 4'', 5'', H-2'''-H-6'''), 5,43 (1H, *t*, *J* = 7 Hz, H-2), 3,44 (1H, *dd*, *J* = 14, 7 Hz, H-1''')

RMN ¹³C δ : C-1'-C-1'' (139,1 C_O), C-2'-C-6'-C-2''-C-6'' (128,9 C-H), C-3'-C-5'-C-3''-C-5'' (128,6 C-H), C-4 (133,5 C-H), C-3-C-1 (195,4 C = O), C-2 (59,0 C-H), C-1''' (135,98), C-2'''-C-6''' (128,6 C-H), C-3'''-C-5''' (128,8 C-H) C-4''' (126,6 C-H).

Redução Química

Em um balão de fundo redondo (25 mL) contendo a substância alquilada, 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona - DBPO₂ (1,0 mmol) e metanol (3 mL), adicionou-se NaBH₄ (0,25 mmol) a -10 °C. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD, diclorometano). A mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna com solvente diclorometano, levando à obtenção do produto mono reduzido desejado: 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH).

(±)-1,3-Difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH).



Aspecto Físico: Sólido amorfo branco.

RMN ^1H δ : 7,88 (4H, *dd*, J = 10; 2 Hz, H-2', H-6', H-2'', H-6''), 7,12-7,56 (11H, *m*, H-3', 4', 5', 3'', 4'', 5'', H-2'''-H-6''') 2,88 (1H, *dd*, J = 10,1 e 4,7, H_a) e absorções características 2,88 (1H, *dd*, J 10,1 e 4,7, H_a) e 3,04 (1H, *dd*, J 10,1 e 6,4, H_b) e 3,4 (1H, *d*, J 6,7, **O-H**); 4,1 (1H, *m*, **H-2**) e 4,9 (1H *t* J 6,3 **H-3**).

RMN ^{13}C δ : C-1'-C-1'' (142,8,1 C_O), C-2'-C-6'-C-2''-C-6'' (128,9 C-H), C-3'-C-5'-C-3''-C-5'' (128,6 C-H), C-4'-C-4'' (133,5 C-H), C-3-C-1 (75,6 C-H), C-2 (54,7 C-H), C-4 (36,7 CH), C-1''' (135,98), C-2'''-C-6''' (128,6 C-H), C-3'''-C-5''' (128,8 C-H) C-4''' (126,6 C-H).

Purificação por CLAE

A purificação do composto foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras impuras foram preparadas diluindo 15 mg do composto em 5 mL de fase móvel. Antes de proceder a cromatografia a fase móvel, solução e as amostras foram filtradas a vácuo utilizando membrana de 0,22 μm e desaerados por trinta minutos em banho de ultrassom.

Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

As amostras de soro dos camundongos foram previamente preparadas para o UPLC-MS/MS. Uma alíquota de 50 µL foi extraída com 200 µL de acetato de etila/metanol (95:5). A solução foi agitada por 2 minutos em vortex à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo após a centrifugação de 10.000 G por 3 minutos. A mistura foi evaporada à temperatura ambiente e o resíduo foi reconstituído com 1 mL de metanol, filtrado em filtro 0,22 µm Nylon. O padrão foi preparado na concentração 1 mg/mL, filtrado em filtro 0,22µm Nylon. As amostras foram automaticamente injetadas (5 µl) no sistema LC-MS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese e caracterização do composto

Na primeira etapa da síntese, foi obtido o composto alquilado, com a duração de 72 horas. O rendimento dessa etapa foi em torno de 78%, resultado similar ao conseguido por Nogueira e colaboradores (2003), de 86% e França, (2013) com rendimento de 80%. A figura 1 mostra o composto de partida dibenzoilmetano (P), o composto alquilado (Ø) e a cromatografia de camada delgada (CCD), utilizada para o acompanhamento da síntese.

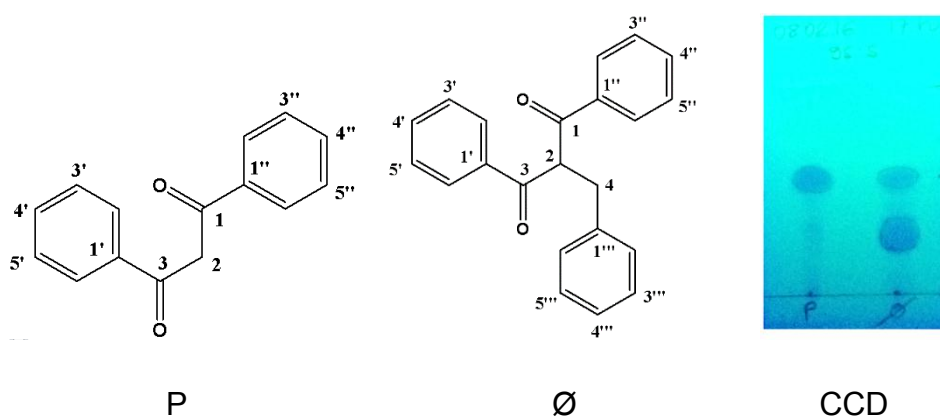


Figura 1. Cromatografia de camada delgada (CCD) da primeira etapa da síntese (alquilação do dibenzoilmetano). P: dibenzoilmetano; Ø composto alquilado.

Na segunda etapa da síntese, o composto benzilado obtido na primeira etapa sofreu a redução da carbonila e suas estruturas são mostradas na figura 2, bem

como a CCD, com rendimento de 42%. Utilizando o solvente diclorometano para a CCD, os valores de R_f foram de 0,55, 0,70 e 0,77 para o dibenzoilmetano, composto alquilado e composto reduzido, respectivamente.

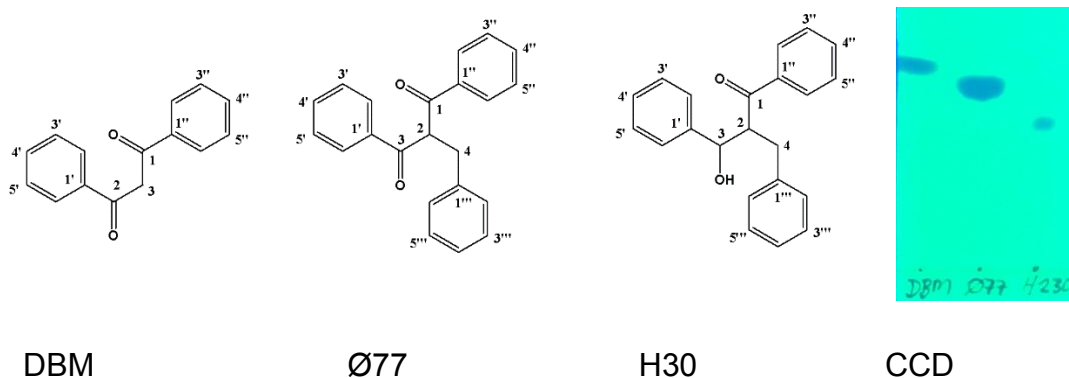


Figura 2. Cromatografia de camada delgada (CCD) da segunda etapa da síntese (redução do produto alquilado na primeira etapa). DBM: dibenzoilmetano; Ø77 composto alquilado; H30: composto reduzido.

O composto reduzido incorporado na formulação transdérmica foi extraído com diclorometano (CH_2Cl_2) e realizada a CCD. A figura 3 demonstra a presença do DBPOH, com sua identificação no UV.

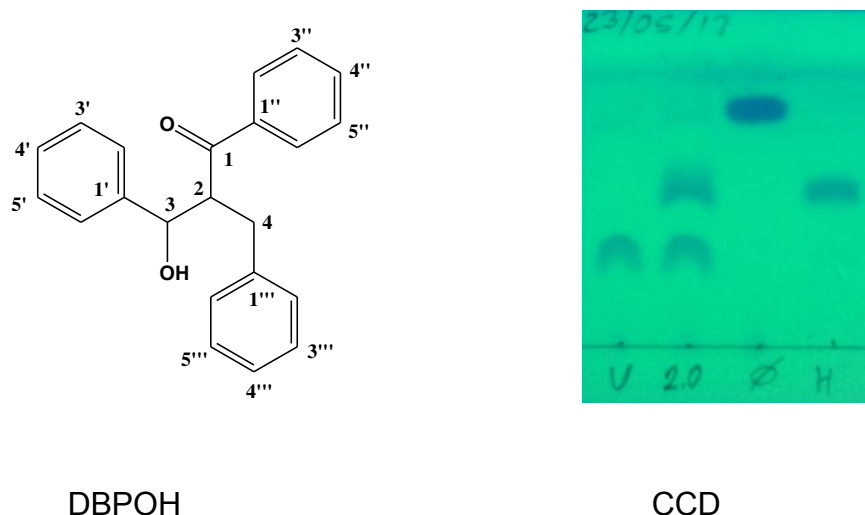


Figura 3. Cromatografia de camada delgada (CCD) da DBPOH na formulação transdérmica. V: veículo, 2,0: compostos DBPOH; Ø: composto alquilado; H: composto reduzido.

O perfil da amostra purificada está demonstrado na figura 4. O tempo de retenção foi próximo de 47 minutos, no detector de 254nm.

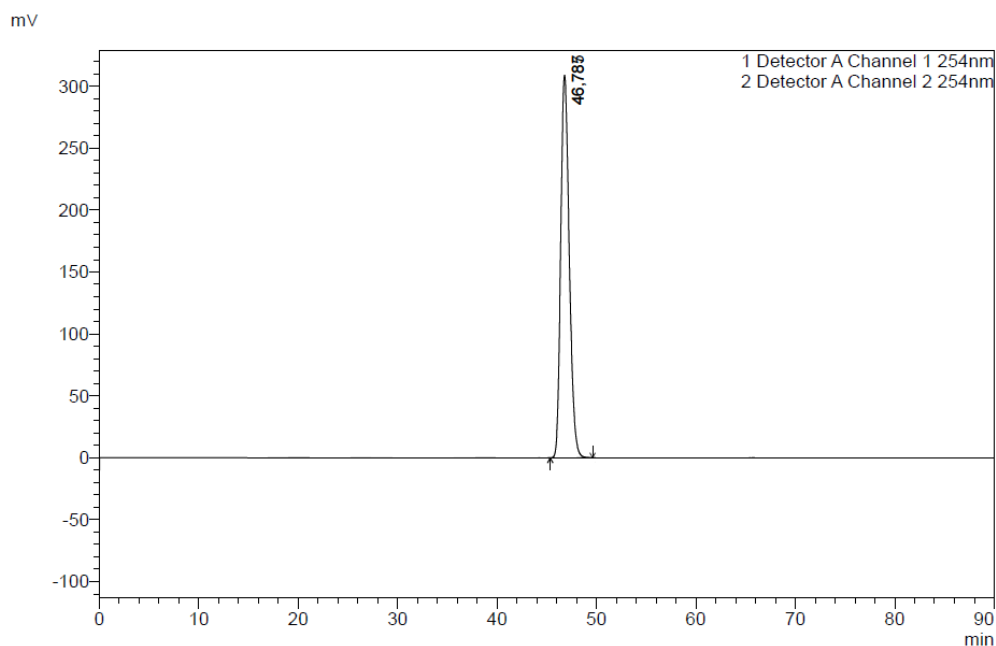


Figura 4. Cromatograma do composto DBPOH purificado por CLAE.

LC MS

Para verificar se o composto DBPOH atingiu a circulação sanguínea dos camundongos, no experimento *in vivo*, foram realizadas análises através de LC-MS (figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11). Após as análises do grupo controle e animais tratados, o composto identificado de massa m/z 316 foi fragmentado e as propostas estruturais dos fragmentos foram feitas para as seguintes massas: m/z 57, m/z 70, m/z 105, m/z 117, m/z 132. O padrão do composto DBPOH forneceu o fragmento mais estável com m/z 274 e esse fragmento poderá ser utilizado em experimentos futuros de farmacocinética, com a determinação da concentração do composto tanto no plasma, como nos diversos órgãos do animal. Shin et al. (1999) utilizando essa mesma técnica determinou a distribuição do ácido botulínico, demonstrando que pode ser uma técnica de grande aplicação nesse tipo de estudo.



Figura 5. Perfil do plasma controle.

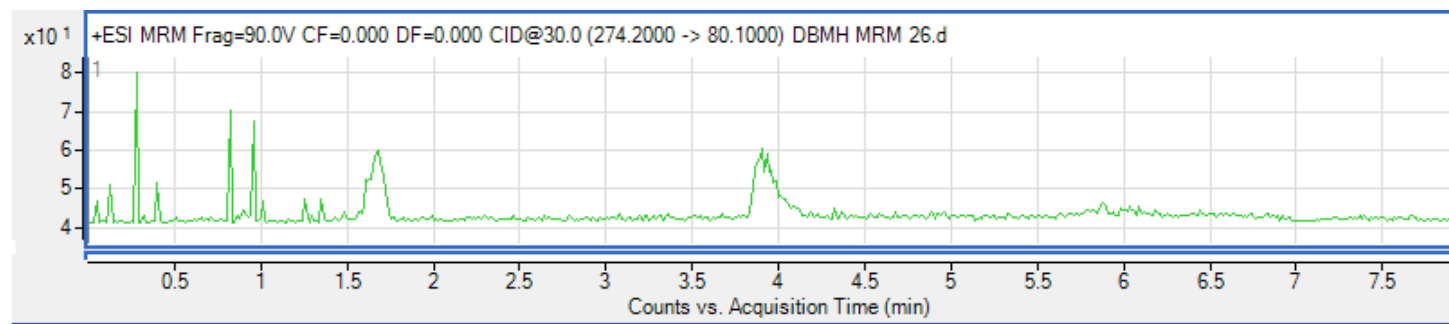


Figura 6. Perfil do plasma contendo DBPOH concentração 0,25 mg/g.

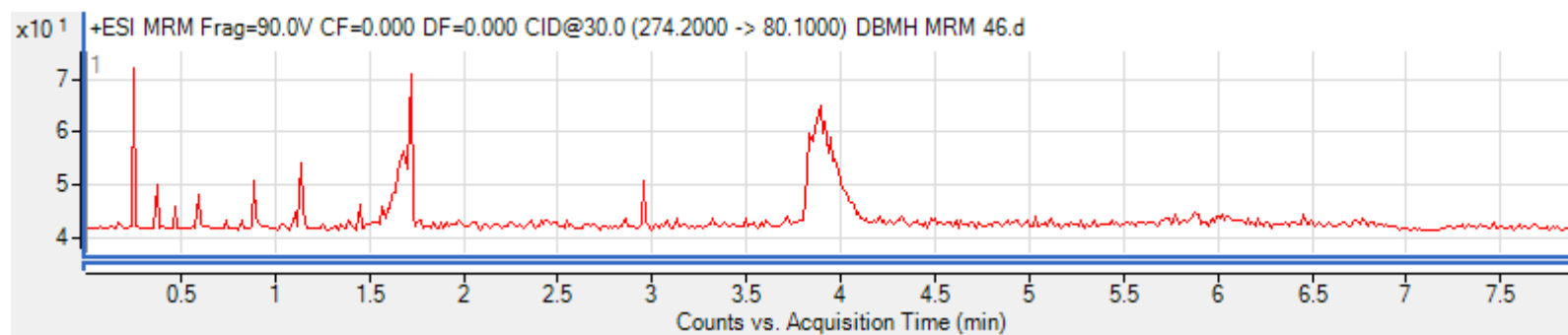


Figura 7. Perfil do plasma contendo DBPOH concentração 1,00 mg/g.

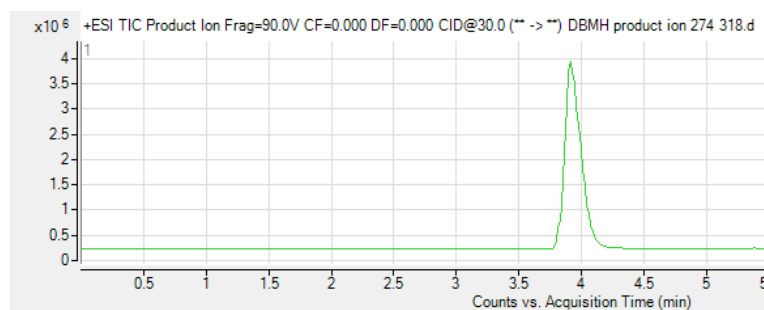


Figura 8. Perfil do padrão contendo DBPOH concentração 1,00 mg/mL

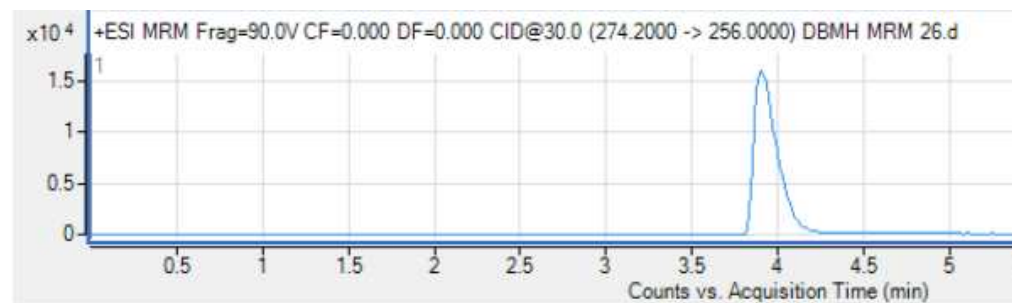


Figura 9. Perfil do plasma contendo DBPOH concentração 0,25 mg/g.

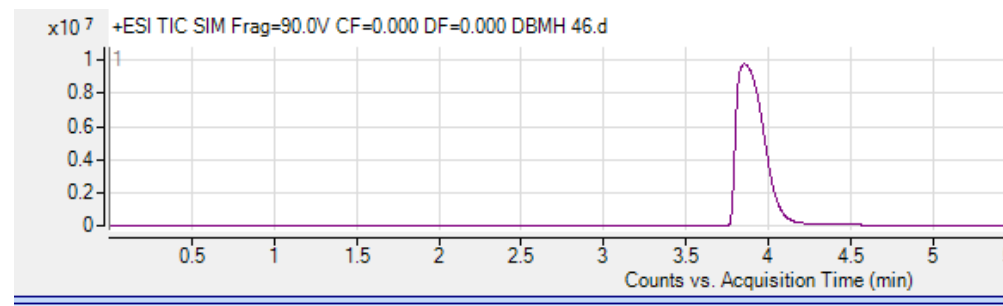


Figura 10. Perfil do plasma contendo DBPOH concentração 1,00 mg/g.

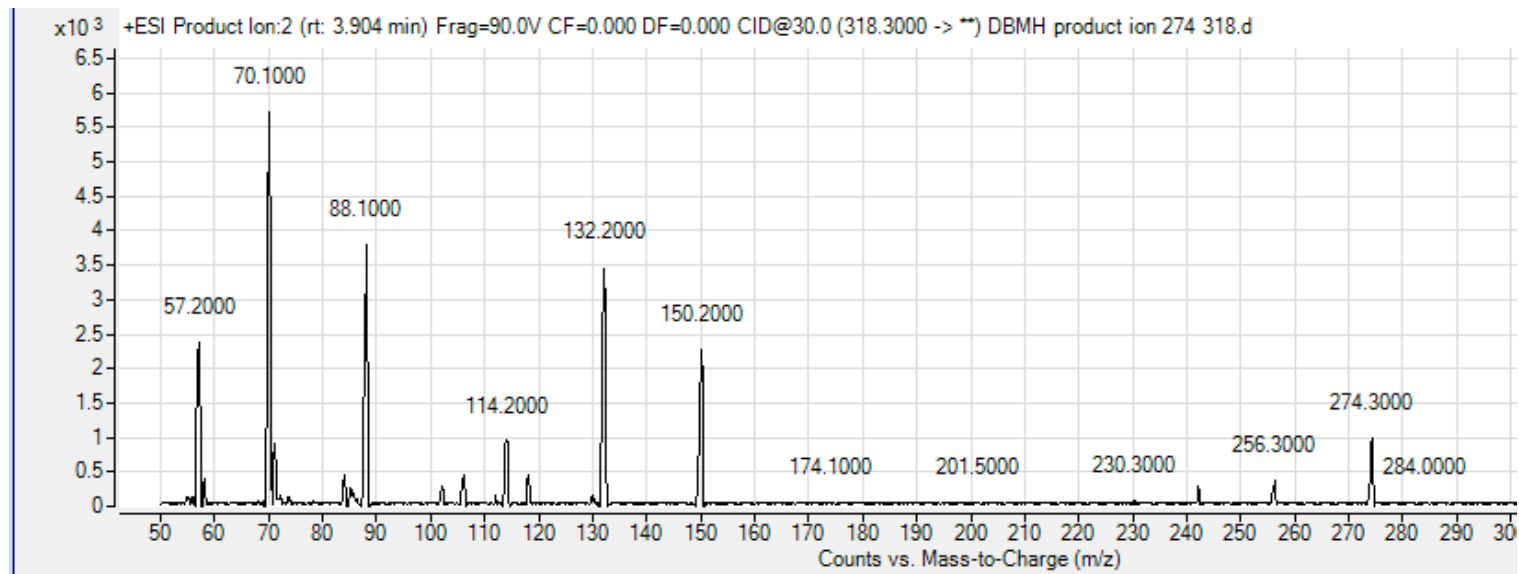


Figura 11. Espectro de massas do composto DBPOH.

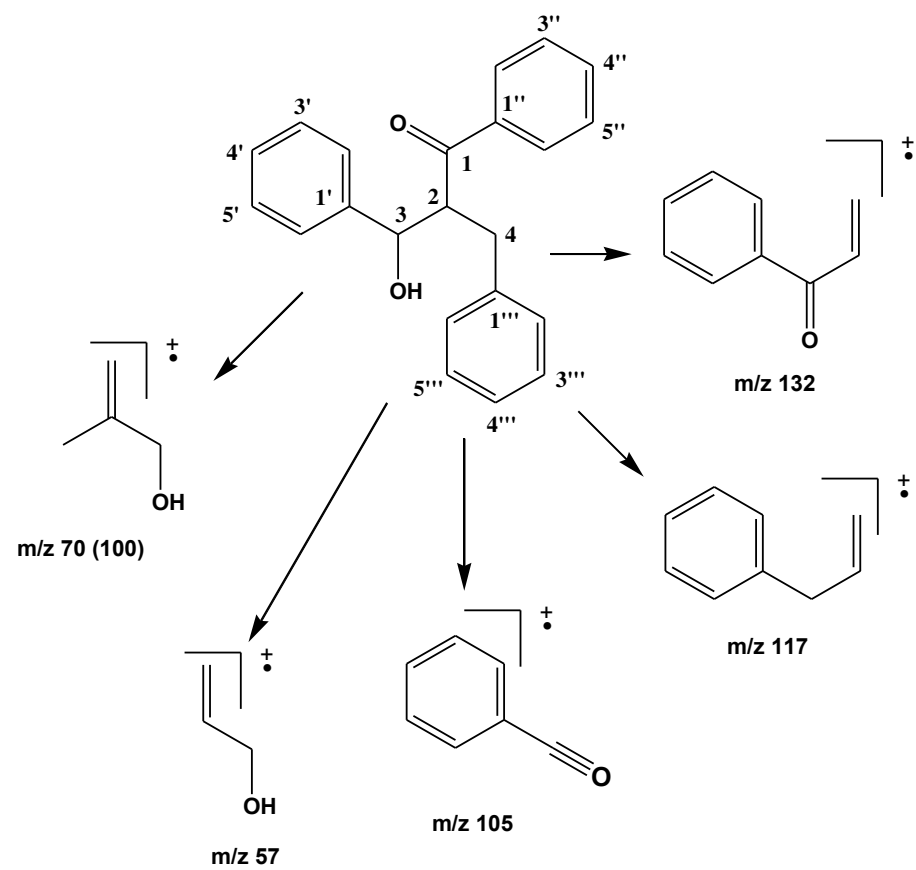
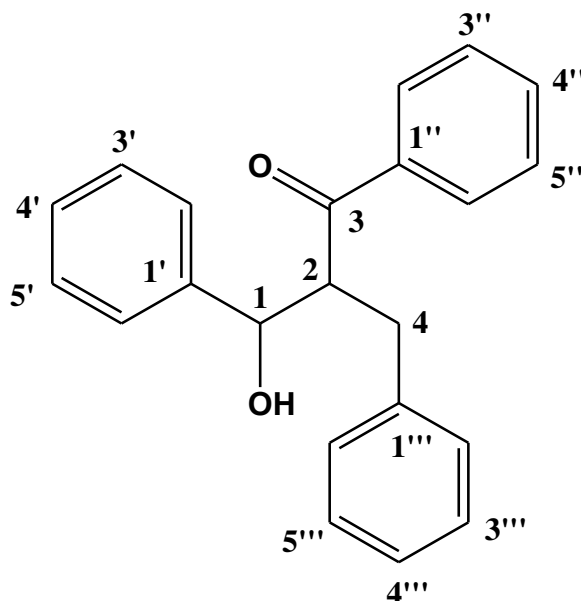


Figura 12. Proposta de fragmentação do composto DBPOH.

Identificação do Composto



O composto **DBPOH** foi identificado com base nos espectros de hidrogênio e carbono 13 . Nas figura 13, 14, e 15 pode-se observar o espectro de RMN ^1H em CDCl_3 que mostra sinais referentes a três anéis aromáticos monossustituídos e absorções características do **CH₂** do grupo benzila em 2,88 (1H, dd, J 10,1 e 4,7, **H_a**) e absorções características em 3,04 (1H, dd, J 10,1 e 6,4, **H_b**) e 3,4 (1H, d, J 6,7, **O-H**); 4.1 (1H, m, **H-2**) e 4,9 (1H t J 6,3 **H-3**).

O espectro de RMN ^1H em D_2O foi feito para determinar inequivocamente que a absorção em 3,4 (1H, d, J 6,7, **O-H**) refere-se ao hidrogênio da hidroxila estando a mesma ausente no espectro em D_2O e na absorção em 4,9 (1H d J 6,3 **H-3**) observa-se agora um dubleto (Figuras 16 e 17).

No espectro de carbono treze (Figuras 18, 19 e 20) os sinais em 36,7 (**C-3**) 54,9 (**C-2**), 75,6 (**C-1**), 142,6 (**CO**) ligado a carbonila, além do sinal 205,6 referente a carbonila corroboram com a estrutura proposta.

O espectro de DEPT 135° (Figura 21 e 22) mostram picos referentes a **9** carbonos **C-H** de aromáticos, **1 CH₂** benzílico e **2 C-H** alifáticos, sendo um deles carbinólico.

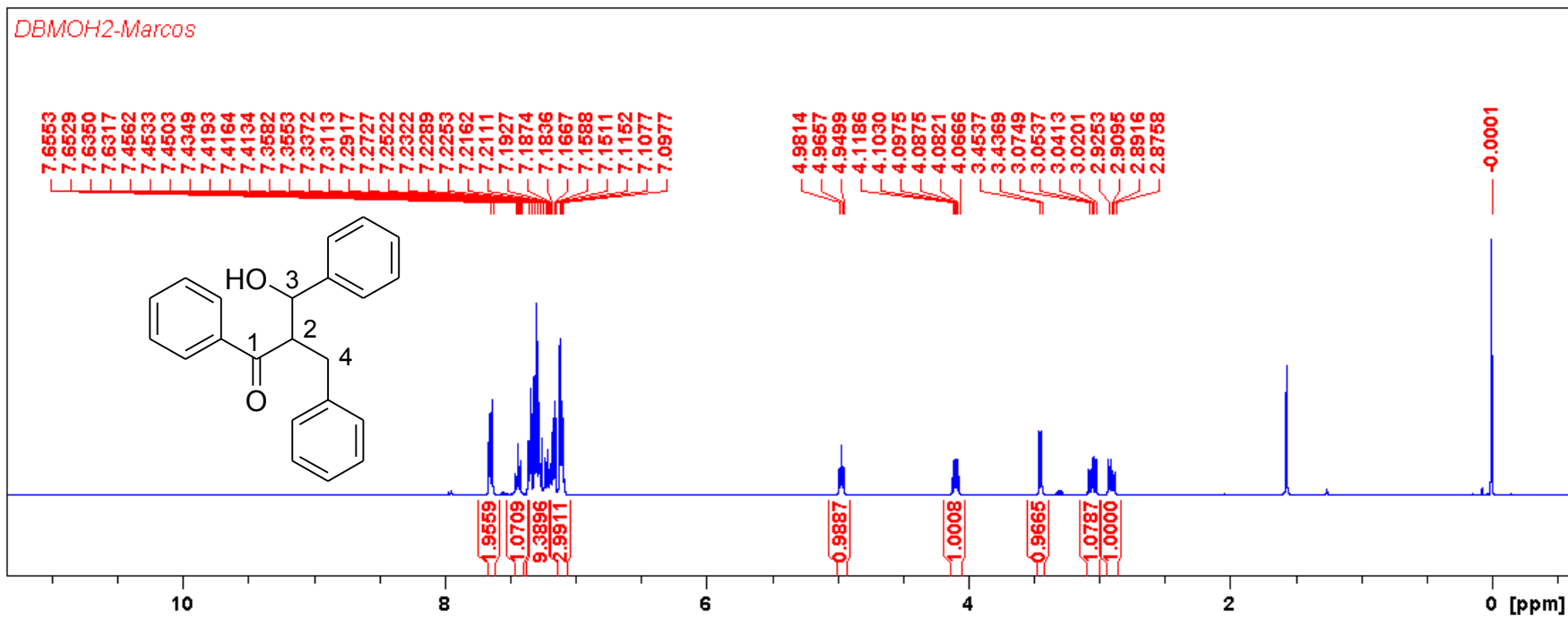


Figura 13. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3).

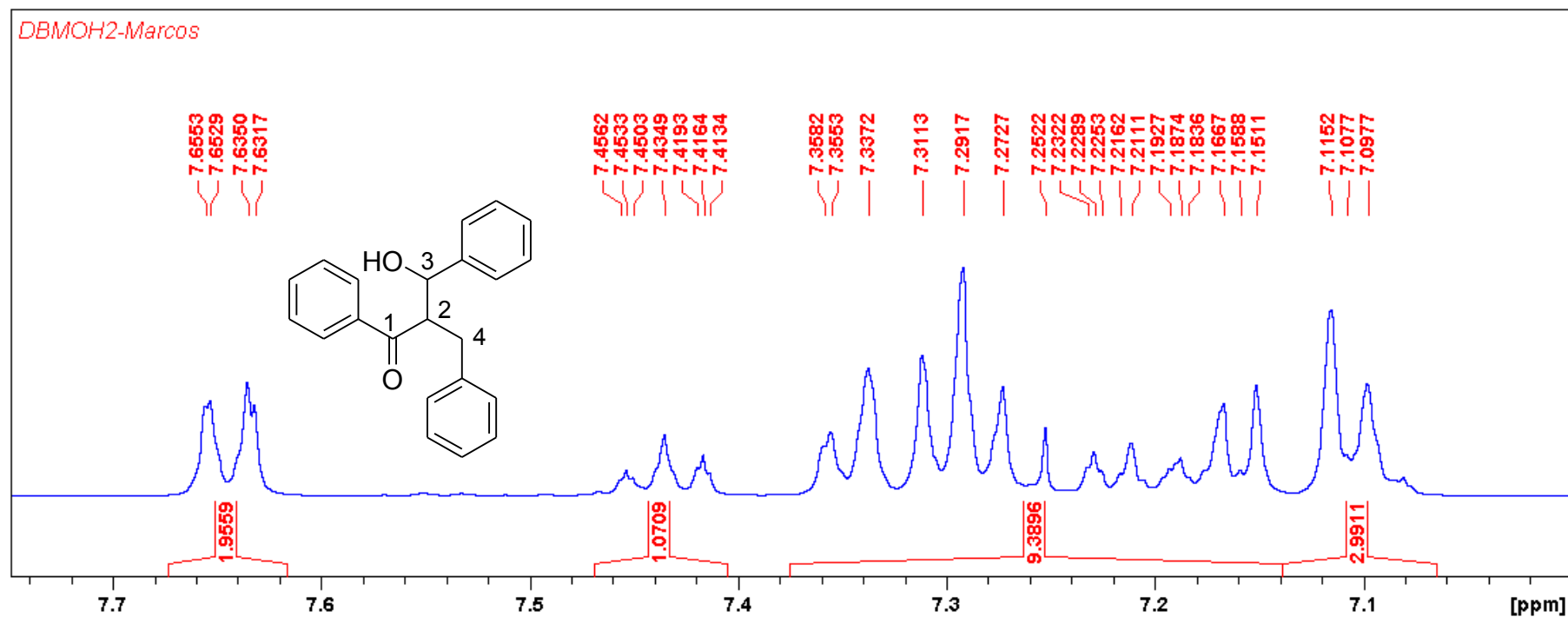


Figura 14. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) expansão.

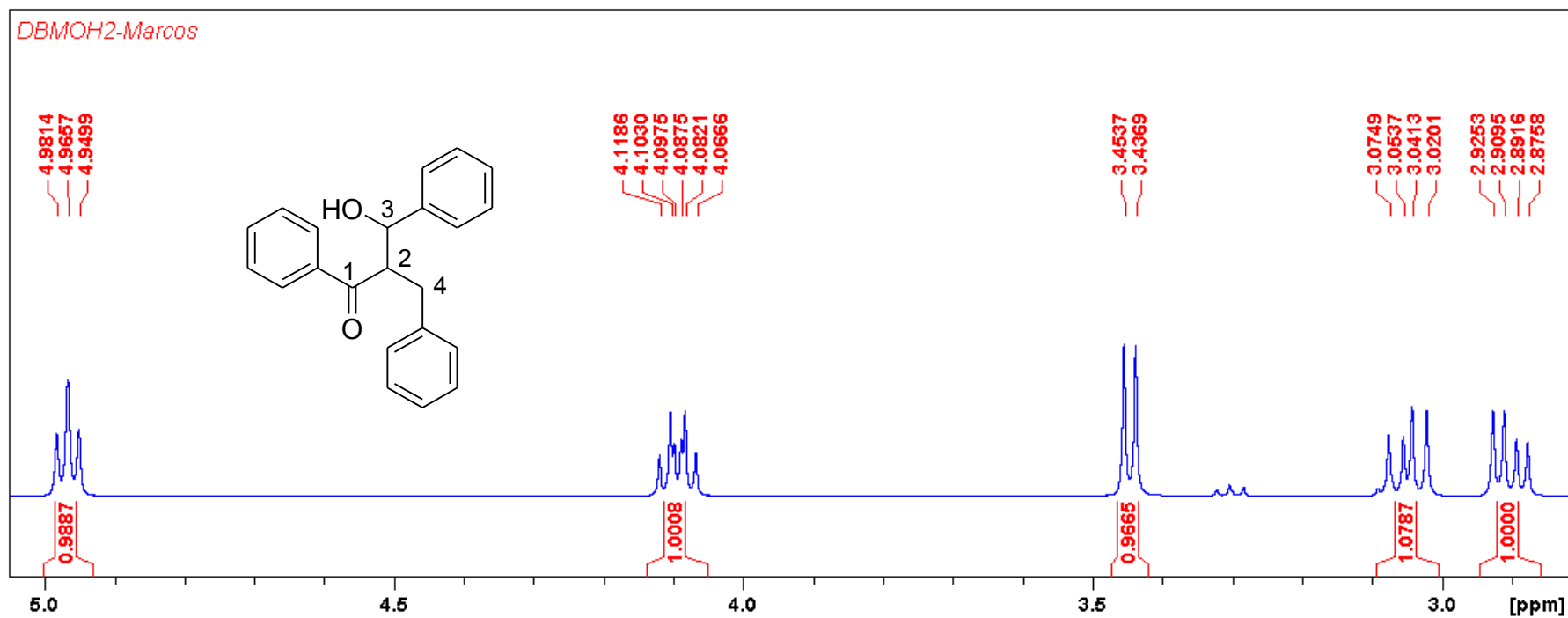


Figura 15. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) expansão.

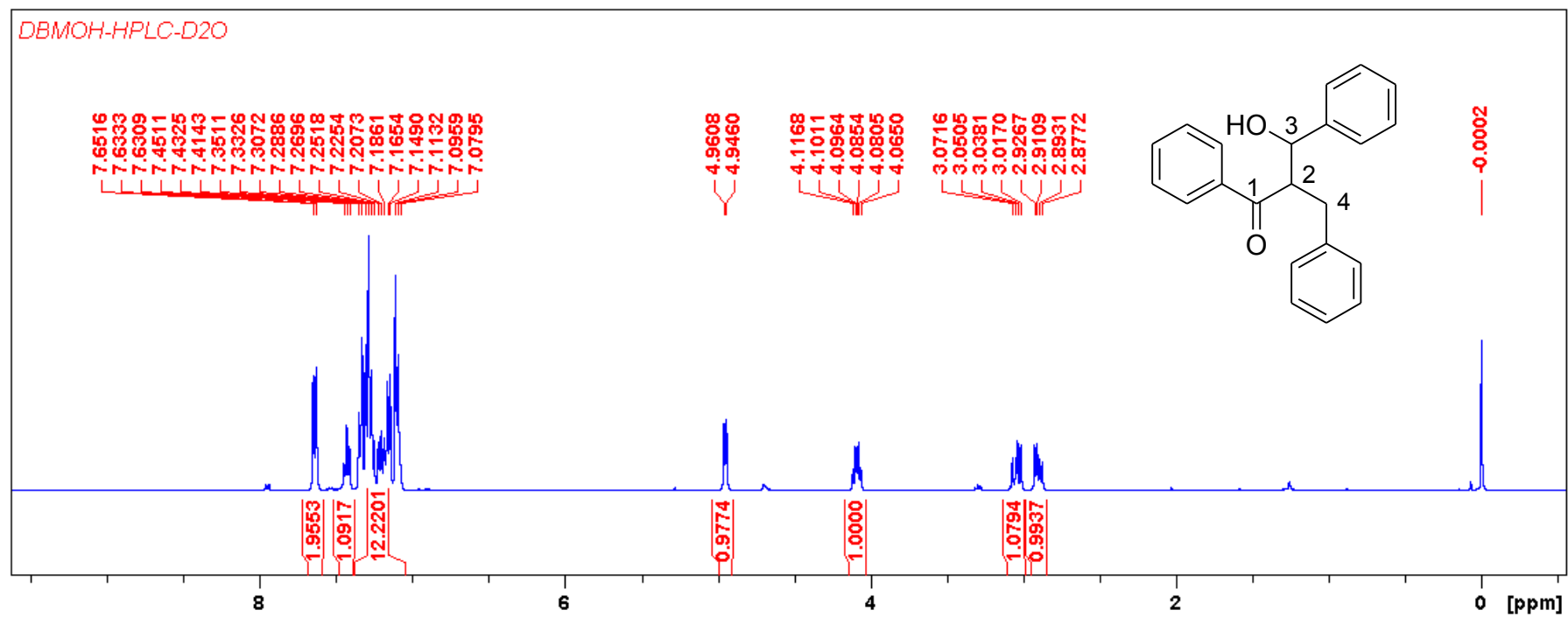


Figura 16. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O).

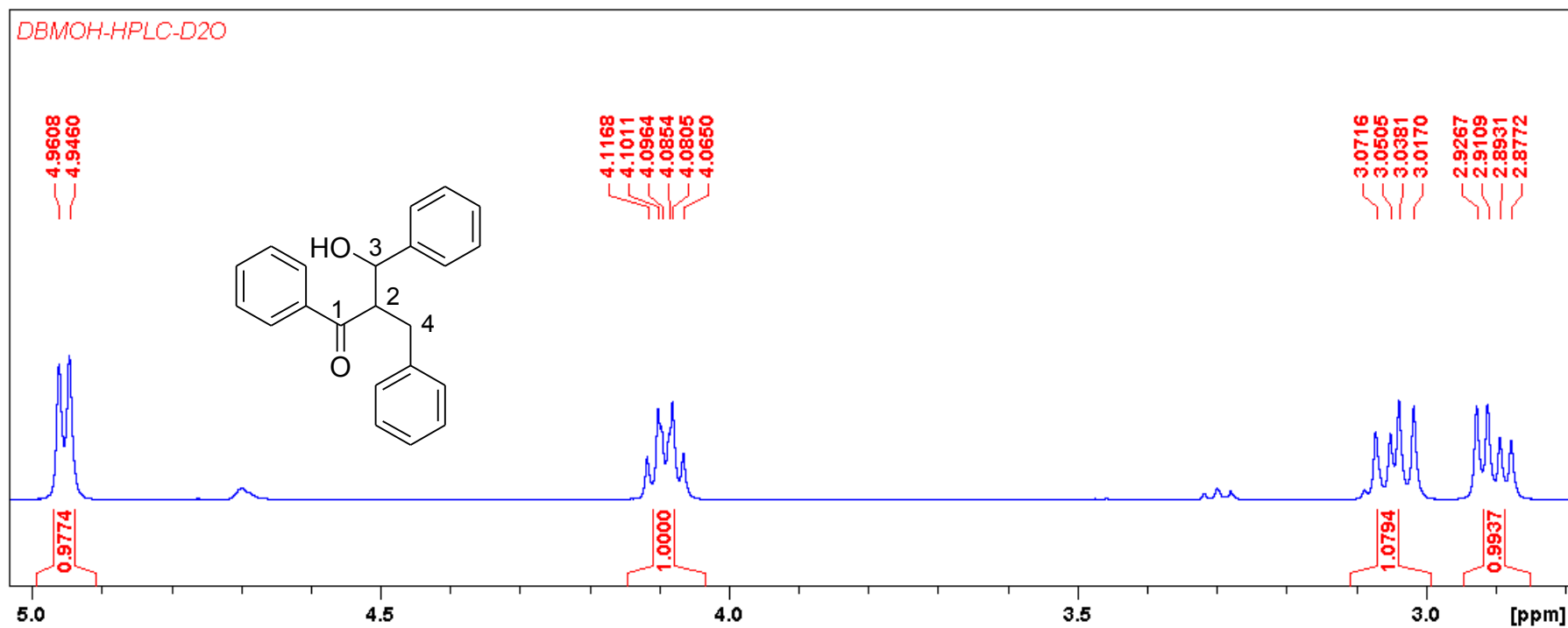


Figura 17. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) expansão, observa-se a ausência da absorção em δ 3,4 referente ao H da hidroxila.

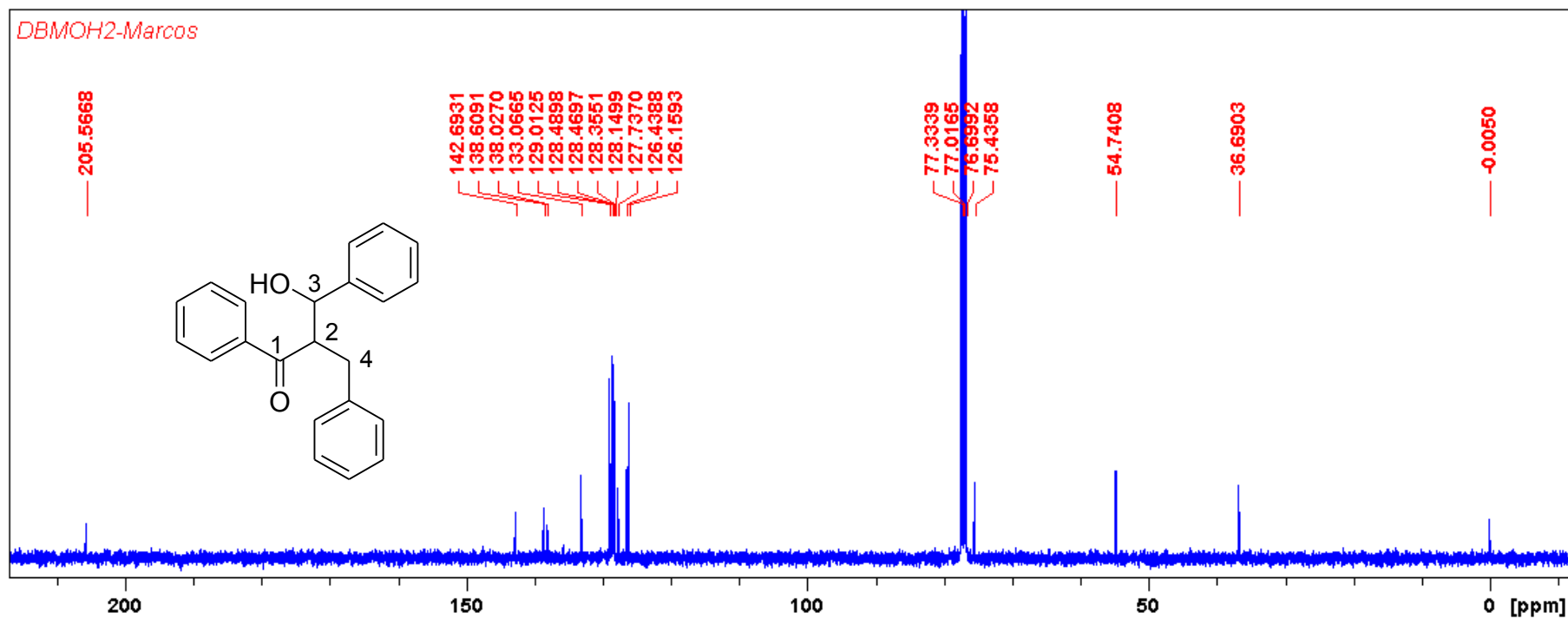


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)-CCD.

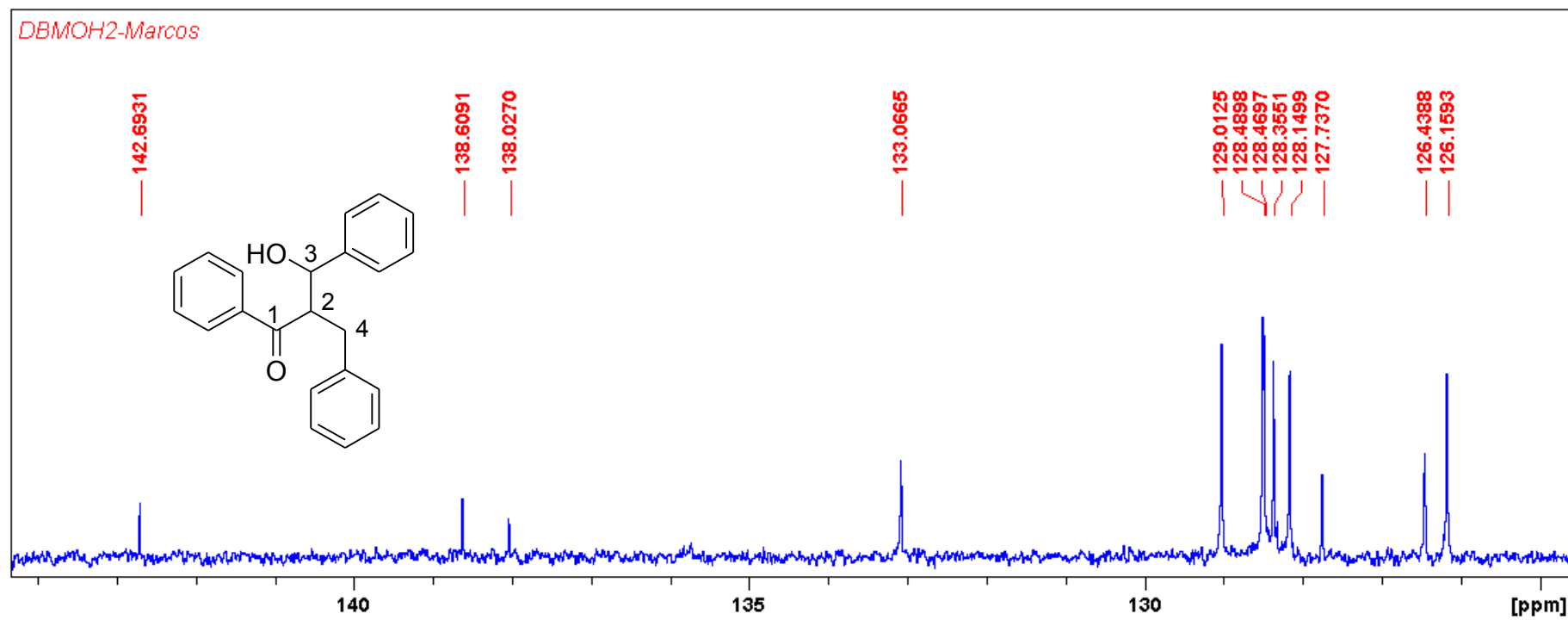


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3).

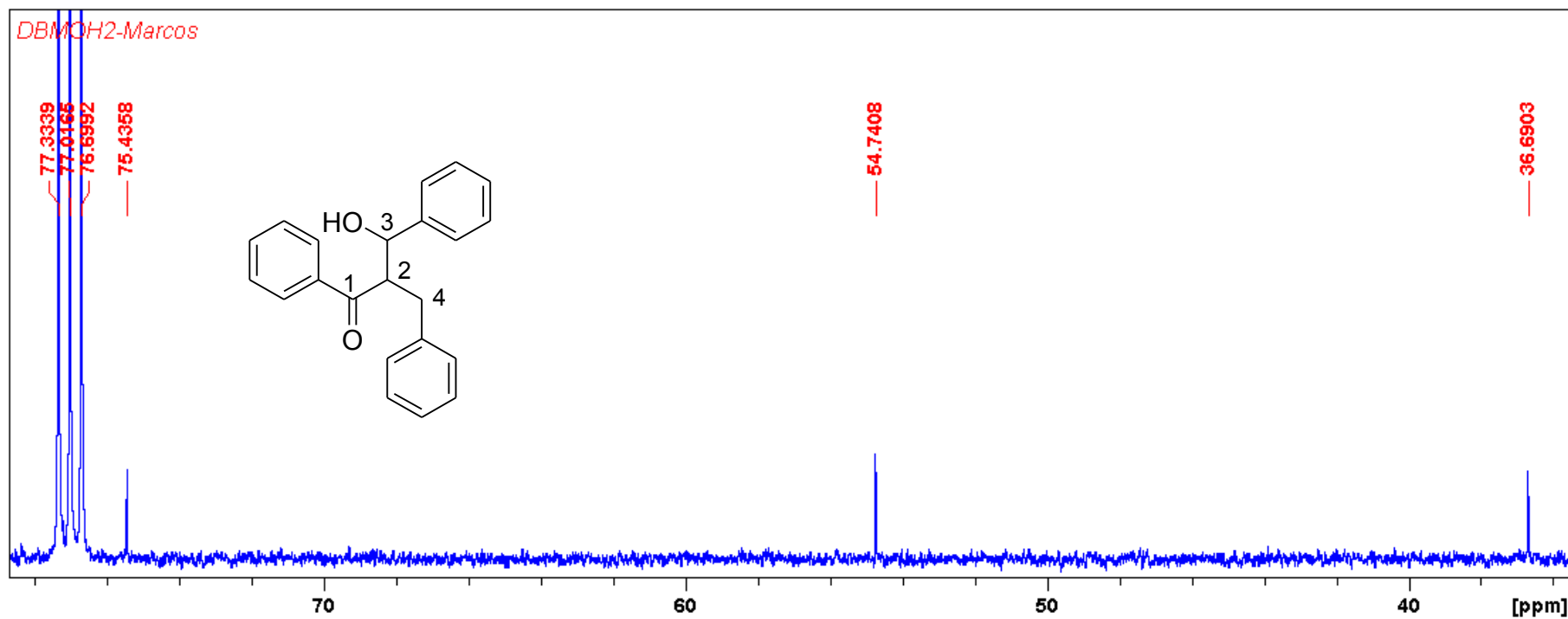


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) expansão.

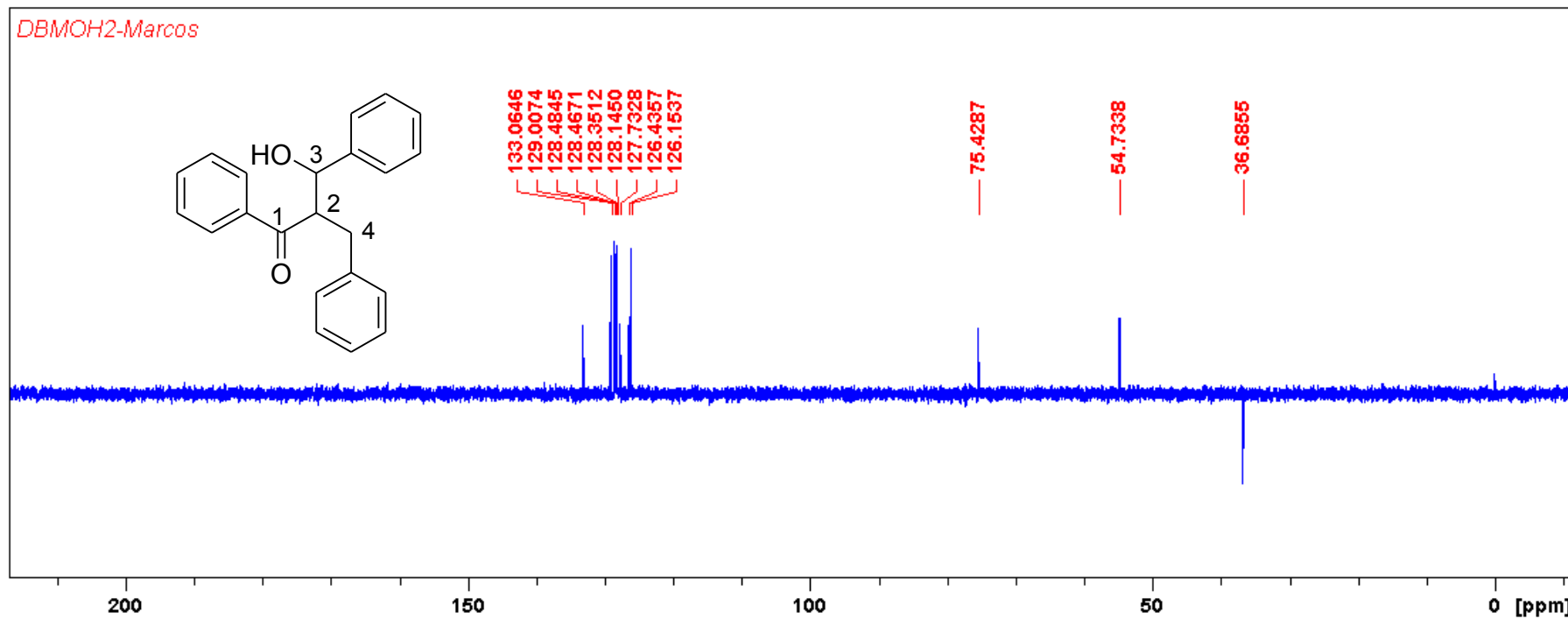


Figura 21. Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3)

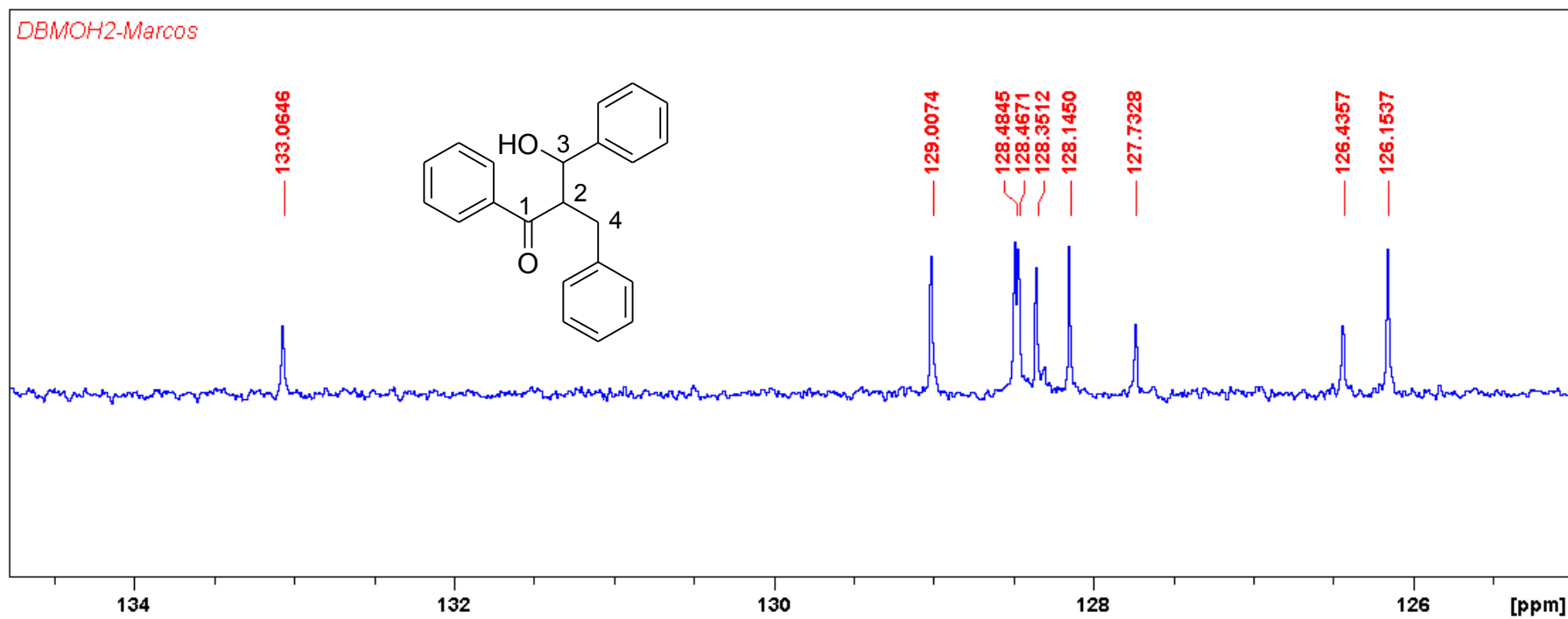


Figura 22. Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3) expansão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho foi o primeiro passo para a caracterização de um derivado de dibenzoilmetano, desde sua síntese até a caracterização por espectrometria de massas. É importante ressaltar que esses dados poderão ser utilizados em estudos futuros de farmacocinética, uma ferramenta essencial no desenvolvimento de novos fármacos. A utilização do uso tópico pode ser uma solução para a baixa biodisponibilidade dos derivados do DBM e com técnicas padronizadas de identificação desses compostos, tais técnicas podem ser utilizadas na identificação do composto nos diversos órgãos dos animais de experimento, além da já aqui testada, (soro).

REFERÊNCIAS

- BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? **J. Pharm. Sci.**, 99: 21, 2010.
- CEVC, G., VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **J. Control Release**, 141: 277, 2010.
- CHEN, X. et al. Histopathology of normal skin and melanomas after nanosecond pulsed electric field treatment. **Melan. Res.**, 19: 361 - 71, 2009.
- FRANÇA, A. A. P, D. Avaliação da atividade antimelanoma in vitro e in vivo de um derivado de dibenzoilmetano, **Tese** Doutorado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG. 2013.
- INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial. MARSAIOLI, A. J. Diaz, M. A. N.; PESSINE, F. B. T. **Obtenção de novos derivados de Dibenzoilmetano que apresentam atividade antineoplásica e de aplicação potencial como filtro solar.** Número do registro: **PI65838**; 22 dez 2000.
- JACKSON, K. M., DE LEON, M., VERRET, C. R., HARRIS, W. B. Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells. **Cancer Lett.**, 178, 161, 2002.
- KHOR, T. O. et al. Dietary feeding of dibenzoylmethane inhibits prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. **Cancer Res.**, 69: 7096 - 102, 2009.
- LADEMANN, J., RICHTER, H., SCHANZER, S., KNORR, F., MEINKE, M., STERRY, W., et al. Penetration and storage of particles in human skin: perspectives and safety aspects. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 77: 465e8, 2011.
- LIN, C. et al. Inhibition by dietary dibenzoylmethane of mammary gland proliferation, formation of DMBA ± DNA adducts in mammary glands , and mammary tumorigenesis in Sencar mice. **Cancer Lett.**, 168: 125 - 32, 2001.
- MAGALHÃES, A., NOGUEIRA, M. A. et al. Three dibenzoylmethane derivatives from Lonchocarpus species. **Phytochemistry**, 46: 1029 - 33, 1997.
- NOGUEIRA, M. A. et al. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **II Farmaco**, 58: 1163 - 69, 2003.
- NAKANO, K. et al. Induction of Apoptosis by, -Diketones in Human Tumor **Cells**. 718: 711 - 17, 2004.
- SHIN, Y. G., CHO, K. H., CHUNG, S. M., GRAHAM, J., et al. Determination of betulinic acid in mouse blood, tumor and tissue homogenates by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, 732: 331 – 336, 1999.

CAPITULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DO COMPOSTO DBPOH, DE USO TÓPICO.

RESUMO

O dibenzoilmetano (1,3-difenilpropano-1,3-diona) DBM e seus derivados são substâncias pertencentes à classe dos flavonoides, raramente encontrados na natureza e têm sido isolados de algumas espécies de *Lonchocarpus*. Com o objetivo de avaliar a atividade antimelanoma na redução do tumor, avaliação do estresse oxidativo e impactos nos parâmetros bioquímicos do 3-difenil-2-benzil-1-propanol (DBPOH), foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*, de uma formulação transdérmica em células B16F10 e camundongos C57BL, respectivamente. Após o teste de citotoxicidade realizado com MTT, a IC₅₀ foi 10,5 µg/mL para as células da linhagem melan- A, de 3,8 µg/mL para a B16F10, respectivamente, com índice de seletividade (IS) de 2,7. O tratamento em células B16F10 por 16 horas com o composto DBPOH induziu a morte majoritariamente por apoptose na concentração 13,903 µg/mL (44 µM) (Anexina V-FITC⁺/PI⁻ e Anexina V FITC⁺/PI⁺). Nessa concentração, o composto induziu em torno de 94% de apoptose nessas células. Não houve alteração nos valores de ambas as transaminases ALT e AST. Os valores de creatinina sérica também não foram diferentes significativamente ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Foi verificado que, na dosagem do ácido úrico sérico, houve uma diminuição de 48%, 50%, 50% e 76% nos tratamentos com as concentrações 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00 mg/g e 2,00 mg/g, respectivamente ($p < 0,05$). O composto DBPOH reduziu a atividade da Glutathione S Transferase em 27% e 16% nas concentrações 0,50mg/g e 1,00 mg/g, respectivamente, nos tumores. Com relação ao tecido hepático, foram observadas alterações nas concentrações de malondialdeído em todos os tratamentos, com diminuições de 72%, 65%, 79% e 88%, nas concentrações 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00mg/g e 2,00 mg/g, respectivamente. Com relação à catalase, somente o tratamento com 2,00mg/g, reduziu-se sua atividade, cerca de 40%. Os dados obtidos indicam que o composto DBPOH pode ser um candidato a medicamento para o tratamento do melanoma, mas estudos

complementares são necessários para garantir a segurança com relação à toxicidade e para verificar o mecanismo de ação e a farmacocinética do composto.

ABSTRACT

Dibenzoylmethane (1,3-Diphenylpropane-1,3-dione) DBM and its derivatives are substances belonging to the class of flavonoids, rarely found in nature and which have been isolated from some species of *Lonchocarpus*. In order to evaluate the antimelanoma activity in tumor reduction, oxidative stress evaluation and impact on the biochemical parameters of 3-Diphenyl-2-benzyl-1,3-propanediol (DBPOH), *in vitro* and *in vivo* tests of a transdermal formulation were carried out in B16F10 cells and in C57BL mice, respectively. After the MTT cytotoxicity test, the IC_{50} was 10.5 $\mu\text{g/mL}$ for the melan-A cell line, from 3.8 $\mu\text{g/mL}$ to B16F10, respectively, with a selectivity index (IS) of 2,85. The treatment in B16F10 cells for 16 hours with compound DBPOH induced death mainly by apoptosis at a concentration of 3.679 $\mu\text{g/mL}$ (12 μM) (Annexin V-FITC + / PI- and Annexin V FITC + / PI +). At this concentration the compound induced around 94% apoptosis in these cells. There was no change in the values of both ALT and AST transaminases. Serum creatinine values were also not significantly different ($p > 0.05$) between treatments. Serum uric acid levels were decreased by 48%, 50%, 50% and 76% in the treatments with concentrations of 0.25 mg/g, 0.50 mg/g, 1.00 mg/ and 2.00 mg/g, respectively ($p < 0.05$). The compound DBPOH reduced the activity of Glutathione S Transferase in the tumors by 27% and 16% in the concentrations 0,50mg/g and 1,00mg/g, respectively. In relation to hepatic tissue, the concentrations of malondialdehyde were observed in all treatments, with decreases of 72%, 65%, 79% and 88%, in concentrations of 0.25 mg/g, 0.50 mg/g, 1.00mg/g and 2.00mg/g, respectively. Regarding catalase, reduction of its activity was observed only in the treatment of 2.00mg/g, at about 40%. The data obtained indicate that compound DBPOH may be a drug candidate for the treatment of melanoma. Further studies are needed to ensure safety with respect to toxicity and to verify the mechanism of action and pharmacokinetics of the compound.

INTRODUÇÃO

As neoplasias ou tumores malignos podem ser conceituados como uma massa de tecido, cujo crescimento excede ao dos tecidos saudáveis e que persiste mesmo depois da interrupção dos estímulos que o desencadeou. Esse tipo de crescimento autônomo compete com o organismo hospedeiro pelo seu suprimento nutricional e energético. Esses tumores malignos tendem a ser muito agressivos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo (WILLIS, 1952; MCGEE et al., 1992; COTRAN et al., 2004.).

Estima-se para o Brasil, entre os anos de 2016 e 2017, uma média de 596.070 novos casos de câncer. Serão 5.670 casos de câncer de pele tipo melanoma, que embora apresente baixa incidência, possui letalidade elevada. É de extrema importância a busca por tratamentos mais eficientes, visto que o melanoma é responsável por 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele em todo o mundo, que é em grande parte devido à sua propensão para metástase (PALUNCIC et al., 2016). O prognóstico de metástases do melanoma é exíguo, com uma baixa expectativa de vida, em torno de oito meses (BALCH et al., 2009).

Nas últimas décadas, o câncer vem se apresentando como um problema de saúde pública mundial, despertando o interesse urgente na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral e também novos processos de diagnósticos, que identifiquem os tumores com maior eficiência e rapidez (BOGO, 2012). Atualmente, o tratamento da neoplasia pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de um procedimento (INCA, 2016).

Os tipos mais comuns de câncer são os de pele, de próstata, de mama feminina, de pulmão e de cólon e reto, sendo o primeiro de maior incidência no Brasil e de menor letalidade, com exceção do melanoma (INCA, 2016).

O melanoma é um dos tipos de câncer humano mais agressivo e resistente ao tratamento, tendo aumentado radicalmente em todo o mundo durante as últimas décadas. O estresse oxidativo pode ter um papel importante no melanoma. Células de melanoma revelam um elevado nível de ácidos graxos poli-insaturados (PICARDO et al., 1996), os quais são alvos sensíveis à peroxidação lipídica, a qual leva a formação de aldeídos α,β -insaturados, como o

malondialdeído (MDA), que já foi demonstrado ser mutagênico e carcinogênico (MARNETT, 1999). Já foi demonstrado elevados níveis de MDA na área do melanoma. Além disso, altos níveis de MDA também foram encontrados não só em células do melanoma, como também na área do entorno dos queratinócitos, indicando um severo dano oxidativo nessa região (SANDER et al., 2003).

Na constante busca por novas terapias eficazes para o tratamento do melanoma, os derivados de dibenzoilmetano se tornaram foco do estudo devido às suas propriedades fotoprotetoras, antitumorais e antimicrobianas (NOGUEIRA et al., 2003; HUBAUD et al., 2008; ZAWADIAK; MRZYCZEK, 2012). O dibenzoilmetano (1,3-difenilpropano-1,3-diona) DBM e seus derivados são substâncias pertencentes à classe dos flavonoides, raramente encontrados na natureza e têm sido isolados de algumas espécies de *Lonchocarpus* (MAGALHÃES et al., 1996; NOGUEIRA et al., 2003). Na natureza, os DBMs são encontrados em algumas plantas, como a Fabaceae (gênero *Glycyrrhiza* e *Lonchocarpus*). Já foi demonstrada a inibição do crescimento de células do câncer de mama, melanoma e pulmão pelo dibenzoilmetano sintético 1,3-difenil-2-alil-1,3-propanodiona (NOGUEIRA et al., 2003). Huang e colaboradores (1998) verificaram que ao administrar uma dieta de DBM a 1%, em ratas Sencar, houve a inibição do tumor mamário e também diminuiu a incidência de linfomas/leucemias. Estudos têm relacionado a atividade do DBM a mecanismos celulares variados, como: supressão da progressão do ciclo celular, inibição da mutagenicidade, indução da apoptose (WANG et al., 2011), atividade antioxidante (HEGEDÜS et al., 2013).

Há muitos estudos relacionados às atividades *in vitro* e *in vivo*, do DBM e seus derivados no combate ao câncer, com destaque no melanoma. Porém, a biodisponibilidade oral desses compostos permanece uma barreira a ser superada. Muito importante também, são os cuidados especiais com substâncias novas, para que as mesmas possam não causar danos ao organismo. Com o objetivo de avaliar a atividade antimelanoma na redução do tumor, avaliação do estresse oxidativo e impactos nos parâmetros bioquímicos do 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH), foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*, de uma formulação transdérmica em células B16F10 e camundongos C57BL, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Teste de citotoxicidade

Foram utilizadas células das linhagens melan-A, estabelecida a partir de melanoblastos normais (BENNETT et al., 1987) e B16F10, estabelecida a partir de células de melanoma murino (FIDLER, 1973). As células de melanócitos normais melan-A foram cultivadas em meio de cultura completo ("Roswell Park Memorial Institute")- RPMI - suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (Anfotericina B; Penicilina e Streptomicina) em frascos de cultura de 25 cm², de poliestireno, em incubadora a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. A linhagem B16F10 foi cultivada em meio de cultura completo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (Anfotericina B; Penicilina e Streptomicina) e mantidas nas condições acima descritas. A dacarbazina foi utilizada como controle positivo com as seguintes concentrações: 1 mM; 1,5 mM; 2 mM; 2,5 mM; 3 mM; 6 mM; 9 mM; 12 mM. O composto DBPOH foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e foram feitas concentrações de 0,004 mM a 0,025 mM obtidas por diluições seriadas com fator de diluição 2. Em cada poço, a concentração de DMSO não ultrapassou 0,5%.

As células foram plaqueadas na concentração de 1x10³ células/mL para as linhagens de B16F10 e na concentração de 1x10⁴ células/mL para a linhagem melan-A. Cada poço recebeu 100 µL de meio e suspensão de células. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade em seus respectivos meios de cultura. Após este período, foram adicionadas as concentrações de Dacarbazina (controle positivo) e 1,3-Difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH) às células e estas foram incubadas por 60 horas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após este período, o meio contendo os compostos foi retirado, todos os poços foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) e foi adicionado em cada poço 50 µL de uma solução de MTT (brometo de 3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólio) a 0,5 mg/mL e as placas foram novamente incubadas nas condições descritas acima por 4 horas. Após este período o MTT foi retirado de todos os poços e em seguida foram adicionados 100 µL de DMSO. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm e a concentração inibitória de 50% das células (IC₅₀) foi calculada. O IC₅₀ de

cada linhagem foi usado para o cálculo do índice de seletividade (IS) do composto. O IS indica a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, e o potencial uso terapêutico deste composto em testes clínicos. Assim, neste estudo, o IS corresponde à divisão entre o valor da IC₅₀ do composto sobre a linhagem de células normais (melan-A) e o valor da IC₅₀ do composto sobre a linhagem de células neoplásicas (B16F10).

Citometria de Fluxo

Células B16F10 (1×10^6) foram plaqueadas em placas de petri de 60 x 90 cm. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade em seus respectivos meios de cultura. Após este período, foi adicionada a concentração equivalente ao IC₉₀ do composto e estes foram incubadas por 16 horas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Em seguida, as células foram tripsinizadas, a interrupção da reação de tripsinização foi realizada com adição de meio completo e lavagem das células por centrifugação a 600 g por 5 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de PBS. Ao término dessa etapa, a suspensão de células foi centrifugada a 600 g por 5 minutos e o pellet foi ressuspenso em 1 mL de tampão Hanks. Foi realizada uma contagem das células e ajustou-se a concentração para 10⁵ células/mL. Na sequência, foram adicionados 5 µL de Anexina V-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (ImunnoTools). Após 20 minutos de incubação ao abrigo de luz, foram adicionados 5 µL de iodeto de propídio (PI) e posteriormente foi feita a leitura dos dados em citômetro de fluxo (CYAN – Dako Cytomation), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Os resultados foram apresentados em forma de dot-plot dividido em quatro quadrantes. Foram classificadas como células em apoptose inicial aquelas com marcação somente para Anexina-V (AN⁺/PI⁻), e como células em apoptose tardia, aquelas com dupla marcação de Anexina V e PI (AN⁺/PI⁺), células em necrose somente marcação para PI (AN⁻/PI⁺) e células viáveis não apresentam nenhuma marcação.

Testes *in vivo*

Camundongos machos da linhagem C57BL/6, de 7-8 semanas de idade pesando 20 ± 5 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa, foram mantidos em biotério ventilado do laboratório de Biofármacos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais de acrílico translúcido, Alesco^R, de 24 x 37 x 19 cm, forradas com maravalha, em ambiente com condições controladas (22 ± 2 °C, $60 \pm 5\%$ umidade), com ciclo claro/escuro de 12h, separados por grupos. Receberam dieta padrão e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV e foram aprovados pelo referido órgão, através do processo no 11/2013.

Os animais foram contidos e tricotomizados na região da nuca, para facilitar a inoculação das células e para a aplicação do tratamento tópico no local. Para a indução do tumor, 1×10^5 células da linhagem B16F10 foram inoculadas subcutaneamente no flanco dos camundongos C57BL/6 machos (HAMANO et al., 2003; ZEISBERG et al., 2007). Após 24 horas, os animais começaram a receber o tratamento tópico, realizado durante o período de 21 dias, conforme descrição abaixo. O número de dias de tratamento foi pré-estabelecido por meio de testes prévios em nosso grupo de pesquisa (dados não publicados). Após o período do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, com posterior incisão dorsal, para excisão do tumor e análise da presença e medição de possíveis focos de metástase e incisão ventral, na linha média, para excisão das amostras de fígado, pulmões e rins, além da retirada das amostras de sangue por punção cardíaca.

Tratamento

O experimento *in vivo* foi realizado utilizando como veículo para o composto ativo uma formulação transdérmica INDERM V^R (formulação abaixo), para fins de otimização da penetração na pele (KAKUMANU et al., 2011; TAGNE et al., 2008). Foram utilizados cinco grupos no total, conforme descrição abaixo (n = número de animais por grupo), totalizando 30 animais. Os animais receberam o tratamento

tópico por 21 dias, começando 24 horas após a indução do tumor, de acordo com os grupos listados abaixo.

Grupo 1: Gel transdérmico sem composto ativo (n = 6)

Grupo 2: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,25 mg/g (n = 6)

Grupo 3: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g (n = 6)

Grupo 4: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g (n = 6)

Grupo 5: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 2,00 mg/g (n = 6)

O tratamento foi aplicado de forma tópica, em intervalos regulares de 24 horas, no mesmo local onde foi induzido o tumor (região tricotomizada). As concentrações utilizadas da formulação foram de 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00 mg/g e 2,00 mg/g. A dose utilizada para cada aplicação foi de 80 mg. Considerando cada concentração, as doses individuais de cada aplicação foram de 20 µg, 40 µg, 80 µg, e 160 µg do composto, nos grupos: 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Assim, com a média de peso de 20 gramas por camundongo, a dosagem variou de 1 a 8 mg/Kg peso corporal.

Análise histológica

As amostras de tecidos (tumor, pulmões, fígado e rins) coletadas foram fixadas por 24 horas em formol 10%, processadas e incluídas em resina, no Laboratório de Histopatologia, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Viçosa. As lâminas utilizadas para análise histológica foram coradas em hematoxilina-eosina.

Avaliação histológica do tumor

Após a excisão do tumor, foram registradas três medidas para estimativa do volume tumoral pela fórmula (comprimento x largura x altura) x 0,52 (HAMANO et al., 2003; ZEISBERG et al., 2007), para fins de comparação entre controle e tratamentos (KAKUMANU et al., 2011). Nas amostras de rins, fígado e pulmões, foram feitas lâminas histológicas e nas amostras de melanoma, foram avaliados, histologicamente, o estado geral do tecido, a presença de vasos sanguíneos, atipias celulares e teciduais e indicativos de morte celular, usando-se o software Image-Pro

Plus, comparando-se os grupos tratados ao grupo controle. As lâminas foram avaliadas qualitativamente.

Avaliação de parâmetro sanguíneo

Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2400 G por 10 minutos para separação do soro, que foi congelado em microtubos a – 20°C. Nas amostras de soro foram avaliados Alanina Amino Transferase (ALT), Aspartato Amino Transferase (AST), Ácido Úrico e Creatinina utilizando-se reagentes do fabricante Bioclin®, e metodologia cinética no aparelho BS2200.

Estresse Oxidativo

Foram determinadas as atividades das enzimas antioxidantes e concentração dos metabólitos da ação de espécies oxidantes no tumor e fígado dos camundongos. Os órgãos foram coletados após a eutanásia e esses tecidos foram congelados a -80 °C. Para realizar as análises, as amostras foram homogeneizadas em PBS pH 7,4 e a suspensão centrifugada a 12.000 G a 4 °C por 10 minutos. Foi utilizado o sobrenadante para a realização das análises.

Para que as atividades das enzimas e concentração de malondialdeído fossem expressas em unidades da enzima por mg de proteína, foi determinada a concentração da proteína total dos homogenatos segundo Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A atividade da Catalase (CAT) foi determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mM) em espectrofotômetro a 240 nm durante 60 s (AEBI, 1984). A atividade da CAT foi expressa em U CAT/mg proteína. A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm, baseada na capacidade desta enzima em catalisar a reação do ânion superóxido O₂⁻ em peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogallol (Dieterich et al., 2000, modificado). A atividade da SOD foi expressa em U SOD/mg proteína.

A atividade da Glutathione-S-Transferase (GST) foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorbância em 340 nm por 60 s. A formação do conjugado ocorre espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não-enzimática, sendo acelerada pela atividade da enzima GST. Uma unidade (U) de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1 mol do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDBN 340=9,6

mM⁻¹.cm⁻¹ foi utilizado para os cálculos (HABIG et al., 1974). A atividade da GST foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1}.\text{g}^{-1}$.

Para determinação dos metabólitos da ação de espécies oxidantes (indicativo da peroxidação lipídica) foi feita a mensuração da concentração de malondialdeído (MDA). Ao sobrenadante, foi adicionado solução TBARS (ácido tricloroacético 15% e 0,375% de ácido tiobarbitúrico, e HCl 0,25 N) em banho-maria por 15 minutos, resfriado, centrifugado a 10.000 G por 10 minutos e o sobrenadante mensurado em espectrofotômetro a 535 nm (BUEGE; AUST, 1978). Os cálculos foram feitos utilizando-se o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^{-5} \text{ M.cm}^{-1}$. A concentração do MDA foi expressa em nmol/mg proteína.

Análise Estatística

A avaliação do efeito dos diferentes tratamentos com o composto DBPOH sobre os parâmetros bioquímicos, volumes tumorais, pesos dos tecidos e atividade antioxidante foram realizadas por meio de análise de variância e de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar o pressuposto de normalidade dos erros foi aplicado o teste de Lilliefors e quando não houve normalidade, os dados foram transformados. Para verificar a homogeneidade das variâncias dos erros entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Bartlett, utilizando-se o *software* STATPLUS^R. Para escolha do modelo de regressão mais adequado, foi considerada a significância dos coeficientes de regressão, pelo teste *t* de Student, a magnitude dos coeficientes de determinação, bem como o comportamento das variáveis em estudo.

RESULTADOS

Testes *in vitro*

Após o teste de citotoxicidade realizado com MTT, a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) das células pelo composto foi calculada, utilizando-se os resultados das leituras de absorbância obtidas. Com base nas duas linhagens celulares testadas (Melan-A e B16F10), os valores de IC₅₀ obtidos foram de 10,5 $\mu\text{g/mL}$ para as células da linhagem melan-A, de 3,852 $\mu\text{g/mL}$ para a B16F10, respectivamente, com índice de seletividade (IS) de 2,726 (Tabela 1).

Tabela 1 Testes *in vitro* nas linhagens Melan-A e B16F10.

Linhagem celular	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
Melan-A	10,504 (33 µM)	2,726
B16F10	3,852 (12 µM)	

IS: Índice de Seletividade IC50: Concentração inibitória de 50%.

Citometria de Fluxo

Para investigar se o composto DBPOH induz apoptose e/ou necrose nas células B16F10, foi feito ensaio por citometria de fluxo, utilizando Anexina V e iodeto de propídeo. O tratamento com o composto DBPOH por 16 horas induziu a morte, majoritariamente por apoptose na concentração 13,903 µg/mL (44 µM) (Anexina V-FITC⁺/PI⁻ e Anexina V FITC⁺/PI⁺). Nessa concentração, o composto induz em torno de 94% de apoptose nas células (76,8% apoptose e 16,9% apoptose tardia) (Figura 2).

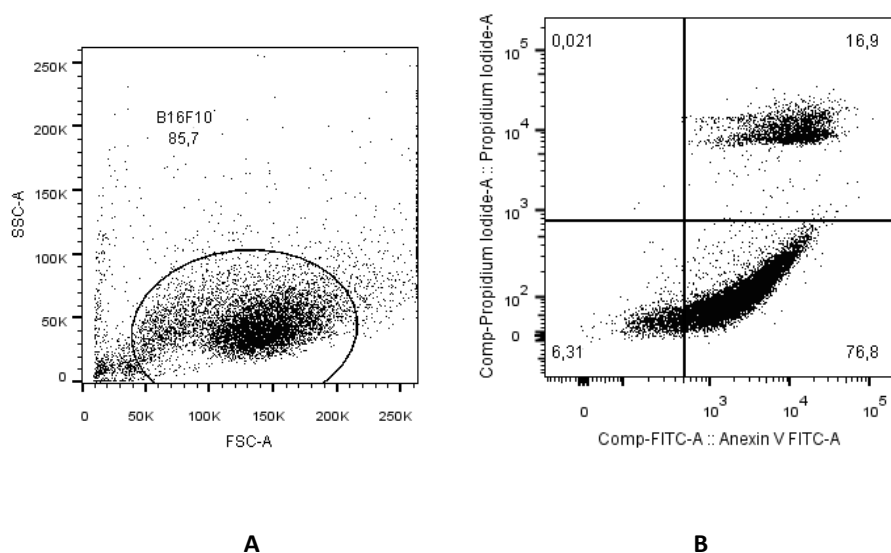


Figura 1 - Indução da apoptose pelo composto DBPOH em células B16F10. (A) controle; (B) células tratadas com 44uM IC90 do composto DBPOH.

Dosagens bioquímicas

No presente estudo, não houve alteração nos valores de ambas as transaminases ALT e AST (Tabela 2). Os valores de creatinina sérica também não foram diferentes significativamente ($p>0,05$) entre os tratamentos, observando assim, que o composto não afetou esse marcador de função renal. O ácido úrico sérico (AUS) é o produto final do metabolismo das purinas, derivado exclusivamente da oxidação da xantina e hipoxantina. Um dado interessante foi verificado na dosagem do ácido úrico sérico, com uma diminuição de 48%, 50%, 50% e 76%, nos tratamentos com as concentrações: 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00mg/g e 2,00 mg/g, respectivamente ($p<0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 Dosagens bioquímicas de camundongos C57CL tratados com o composto DBPOH n = 6

	Concentrações do composto DBPOH(mg/g)					CV(%)
	Controle	0,25	0,50	1,0	2,0	
Ácido úrico (mg/dL)*	4,5 ± 1,11 ^a	2,34 ± 0,53 ^b	2,26 ± 0,8 ^b	2,27 ± 1,23 ^b	1,07 ± 0,6 ^b	54
Creatinina (mg/dL)	0,42 ± 0,05	0,39 ± 0,04	0,41 ± 0,06	0,37 ± 0,07	0,35 ± 0,11	13
AST (UI/L)	516 ± 21,7	311 ± 20,7	304 ± 13,0	361 ± 26,4	350 ± 7,8	49
ALT (UI/L)	134 ± 4,7	119 ± 49	148 ± 77	145 ± 63	114 ± 24	29

* efeito significativo com $p<0,05$.

Estresse oxidativo

Nesse estudo, foi verificado que o composto DBPOH reduziu a atividade da Glutathione S Transferase (GST) em 27% e 16% nas concentrações 0,50 mg/g e 1,00 mg/g, respectivamente, nos tumores ($p<0,05$). Por outro lado, não foram observados efeitos do composto nas concentrações de malondialdeído, óxido nítrico e nem nas atividades da catalase e superóxido dismutase (SOD) (Tabela 3).

Tabela 3 Atividade antioxidante nos **tumores** de camundongo C57BL tratados com o composto DBPOH n = 6

Atividade antioxidante	Concentrações do composto DBPOH(mg/g)					CV (%)
	0,0	0,25	0,50	1,00	2,00	
Superóxido dismutase (U SOD/mg proteína) [#]	1,26	1,25	1,24	1,28	1,35	13
Catalase (U CAT/mg proteína) [#]	0,902	0,587	0,563	0,348	0,556	59
Glutationa-S-Transferase (μmol/ning) [*]	36,37	38,11	26,70	30,62	36,80	21
Malondialdeído (nmol/mg.proteína) [#]	0,191	0,148	0,180	0,084	0,113	75
Óxido nítrico (μM) [#]	14,06	12,77	14,24	10,27	13,08	42

[#] não significativo

$$^1 = 8,1368x^2 - 16,523x + 37,464$$

Com relação ao tecido hepático, foi observada a diminuição de nas concentrações de malondialdeído (MDA) em todos os tratamentos, com variações de 72%, 65%, 79% e 88%, nas concentrações de 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00mg/g e 2,00 mg/g, respectivamente (p<0,05). Para a catalase, o tratamento de 2,00 mg/g mostrou redução de sua atividade em cerca de 40%, (p<0,05). Não foram observados efeitos do composto nas concentrações de óxido nítrico e nem nas atividades de GST e SOD (Tabela 4).

Tabela 4 Atividade antioxidante nos **figados** de camundongo C57BL tratados com o composto DBPOH n = 6

Atividade antioxidante	Concentrações do composto DBPOH(mg/g)					CV (%)
	0,0	0,25	0,50	1,00	2,00	
Catalase (U CAT/mg proteína) [*]	37,21	36,72	48,70	41,17	22,49	38
Glutatione-S-transferase [#]	57,39	79,20	78,84	84,05	84,45	37
Malondialdeído (nmol/mg.proteína) [*]	7,32	2,06	2,55	1,53	0,91	169
Óxido Nítrico [#]	14,06	12,77	14,24	10,27	13,08	130
Superóxido dismutase (U SOD/mg proteína) [#]	54,90	47,85	69,33	58,30	39,63	50

[#] Não significativo

$$^1 \text{CAT: } -13,364x^2 + 19,559x + 36,558 \text{ R}^2 = 0,8677$$

$$^2 \text{MDA: } 2,9385x^2 - 8,2964x + 5,989 \text{ R}^2 = 0,7466$$

Pesos dos órgãos e volume do tumor

Não houve diferença significativa com relação ao volume tumoral entre os animais do grupo controle e tratados (Figura 1).

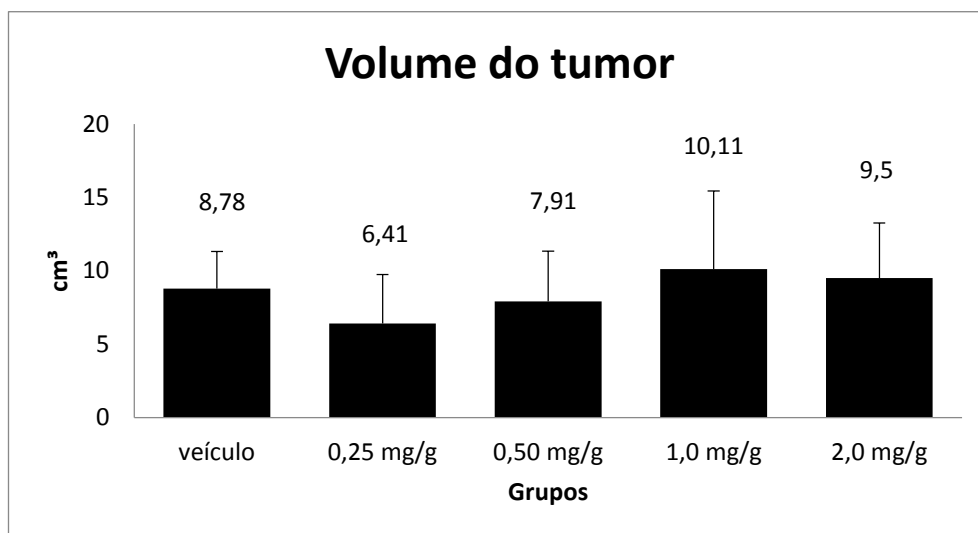


Figura 2. Volume dos tumores dos camundongos, não tratados (veículo) e tratados como o composto DBPOH nas concentrações 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00 mg/g e 2,00 mg/g, n=6.

Com relação ao peso corporal, o grupo sem tratamento se mostrou com essa variável menor que os demais grupos, porém, não de modo significativo ($p > 0,05$). Da mesma forma, os tratamentos ($p > 0,05$) no índice visceral, rins e testículos não foram diferentes estatisticamente em todos os tratamentos (tabela 5).

Tabela 5 Peso corporal e dos órgãos dos camundongos C57BL; tratados com o composto DBPOH, (n = 6).

	Concentrações do composto DBPOH(mg/g)				
	Controle	0,25	0,50	1,0	2,0
Peso corporal final (g) [#]	23,7 ± 3,5	27,0 ± 2,6	26,4 ± 2,4	28,3 ± 3,1	26,1 ± 1,8
Ganho de peso (g) [#]	3,23 ± 3,49	4,5 ± 2,51	5,57 ± 2,82	6,13 ± 3,72	3,69 ± 3,41
Índice visceral (%) ^{#*}	59 ± 5	60 ± 9	53 ± 6	52 ± 10	48 ± 10
Pumõesn (mg) [#]	171 ± 58	201 ± 33	199 ± 21	204 ± 51	155 ± 42
Rins (mg) [#]	133 ± 26	153 ± 13	138 ± 24	140 ± 12	131 ± 13
Testículos (mg) [#]	109 ± 34	129 ± 30	125 ± 27	124 ± 17	92 ± 17

[#] não significativo. * Razão do peso do fígado pelo peso corporal (%).

Histologia

Tumor

Na análise histológica do material tumoral de todos os grupos foi identificada a organização de células tumorais em formato de ninhos confluentes ao redor de estruturas vasculares (CHEN et al., 2009; PAULIS et al., 2010), formando um padrão pseudo-glandular. Esta característica constitui um dos critérios para diagnóstico histológico do melanoma cutâneo, juntamente com a presença de necrose e atipias celulares, também relatados nas presentes observações (SIDDARAJU, 2011). Um detalhe que chamou atenção foi a ausência de células endoteliais delimitando a parede de alguns locais dessa rede vascular tumoral apesar da presença de hemácias no lúmen, o que constitui indício de mimetismo vasculogênico ou formação de vasos mosaico, (CARMELIET; JAIN, 2011; HENDRIX et al., 2002; PAULIS et al., 2010) (Figura 3).

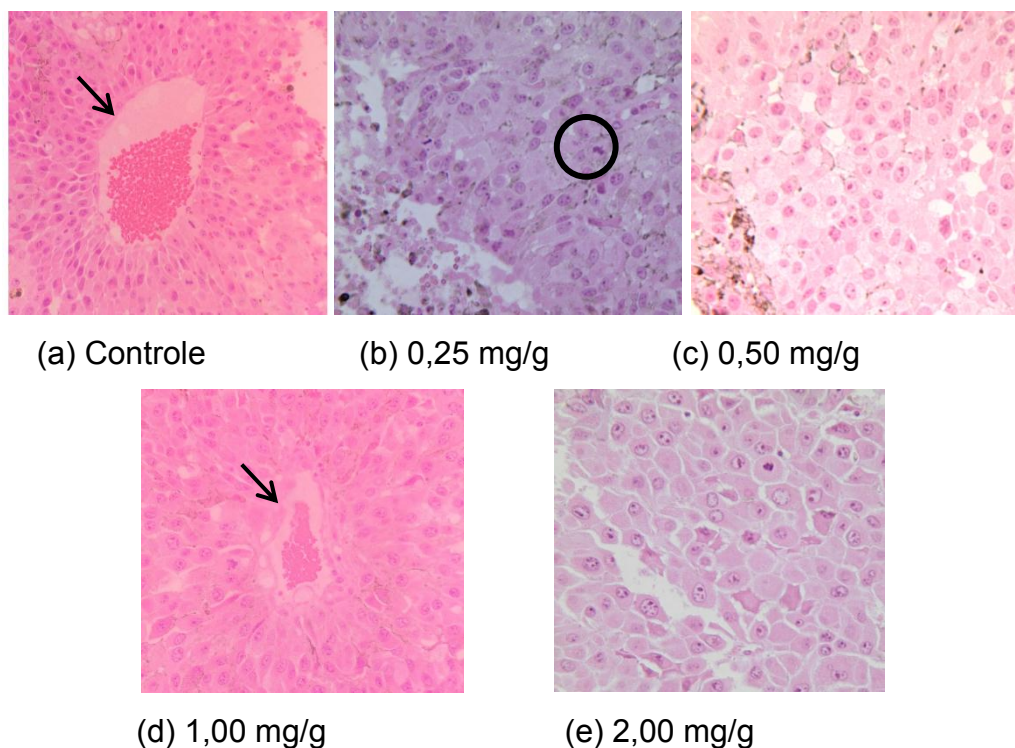


Figura 3. Secções histológicas de amostras do tumor, de camundongos não tratados (a) e tratados como o composto DBPOH nas concentrações de concentrações 0,25 mg/g (b), 0,50 mg/g (c), 1,00mg/g (d) e 2,00 mg/g (e). As setas nas figuras (a) e (d) indicam os diferentes tipos de vasos formados, com padrão pseudoglandular em (a). O círculo em (b) representa a célula no processo de mitose.

Fígado

Nas amostras dos fígados, observou-se uma característica peculiar. Enquanto nos animais controle não foram identificadas mitoses, essas apareceram no tratamento com o composto. Em uma análise quantitativa, essas mitoses puderam ser identificadas nos grupos que receberam tratamento, com maior frequência no grupo com 1,00 gm/g (Figura 4).

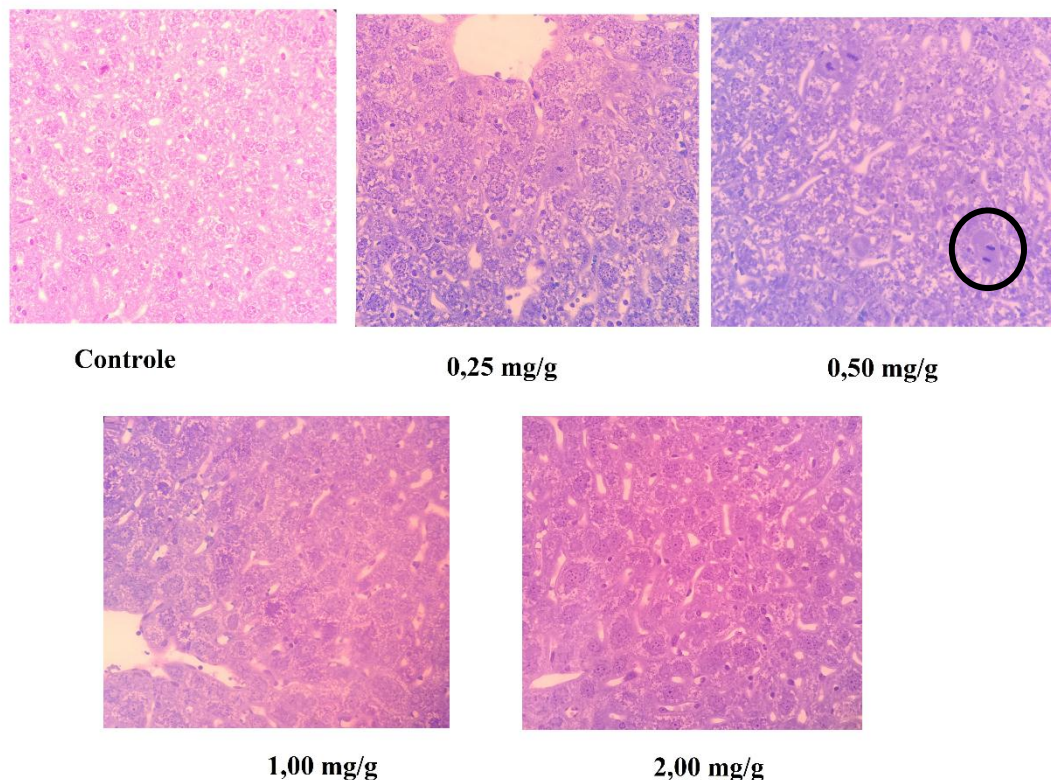


Figura 4. Secções histológicas de amostras do fígado, de camundongos não tratados (veículo) e tratados com o composto DBPOH nas concentrações 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00 mg/g e 2,00 mg/g. O círculo na concentração 0,25 mg/g mostra o hepatócito no processo de mitose.

DISCUSSÃO

Avaliação *in vitro*

MTT

Para avaliar o potencial terapêutico do composto DBPOH, foram realizados testes *in vitro*, para a obtenção do IC_{50} e o índice de seletividade. O IC_{50} para as células normais, Melan-A e de melanoma B16F10 foram de 10,504 (35 μ M) e 3,679 (12 μ M), respectivamente, com índice de seletividade (IS) igual a 2,855. O IS obtido nesse trabalho sinaliza que o composto é quase três vezes mais ativo contra células do melanoma, quando comparado às células normais, dentro dos padrões considerados significativos, que são valores entre 2 e 3 (BADISA et al., 2009; BÉZIVIN et al., 2003; SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). França (2013), trabalhando com composto similar ao DBPOH, encontrou um IS igual a 4,25, porém, a concentração de seu composto era de cerca de 21 vezes maior na IC_{50} das

células Melan-A e 14 vezes nas células B16F10. Esses dados demonstram que pequenas alterações estruturais podem provocar grandes alterações farmacológicas. Flores (2012), determinando IC₅₀ e IS de diversos compostos, verificou que o quimioterápico dacarbazina, utilizado no tratamento do melanoma, possui IS próximo de 1,0, o que torna esse medicamento sem seletividade para células tumorais. Além disso, essa mesma autora encontrou valores de IC₅₀ iguais a 708 µg/mL e 754 µg/mL para células B16F10 e melanócitos normais, respectivamente, muito superiores aos encontrados para o composto DBPOH. Os resultados encontrados no recente trabalho trazem importantes informações para a sequência de experimentos, para confirmar as virtudes farmacológicas do composto DBPOH.

Citometria de Fluxo

As células do melanoma possuem propriedades de sobrevivência e motilidades superiores às células normais, com isso, elas apresentam baixos níveis de apoptose *in vitro* e *in vivo* e, por essa razão, são mais resistentes à apoptose induzida por drogas, o que lhe confere maior agressividade entre os cânceres (GRAY-SCHOPFER et al., 2007; SOENGAS; LOWE, 2003). A resistência à apoptose ocorre devido à quebra do controle da morte celular associada aos fatores de ativação anti-apoptóticos e inativação de efetores pró-apoptóticos e potencialização dos sinais de sobrevivência (SOENGAS; LOWE, 2003). Moléculas importantes estão envolvidas na promoção da apoptose, como as proteases específicas para aspartato que contém cisteína, da família das caspases, o citocromo c e moléculas da família Bcl-2. A sinalização da apoptose envolve, principalmente, receptores de membrana, como Fas e fator de necrose tumoral (TNF), bem como seus receptores ou via conduzida por mitocôndrias, as quais ativam caspases (caspase 8 ou 9) e moléculas chave de sinalização de transdução de sinal *downstream*, com sucessivo início por caspase 3, deflagrando a apoptose. (SCHMITZ et al., 2000; ADAMS 2003).

No processo de apoptose, as células passam por mudanças na bicamada fosfolipídica da membrana celular e ocorre externalização da fosfatidilserina para membrana externa. Dessa forma, células apoptóticas podem ser marcadas pela

Anexina-V (proteína que tem afinidade pela fosfatidilserina), ligada ao fluorocromo FITC, enquanto que o iodeto de propídeo não pode se ligar à célula, uma vez que este só consegue penetrar nas células quando sua membrana não está íntegra, como ocorre na necrose (KRYSKO et al., 2008). No presente estudo, o composto DBPOH promoveu a apoptose das células B16F10, na concentração 44µM, equivalente ao IC90. Considerando uma linhagem altamente agressiva das células B16F10, esses dados podem indicar um promissor efeito nesse tipo de morte celular. Sun et al. (2012), trabalhando com o Oridonin, um diterpenoide tetracíclico, observaram a indução da apoptose de 5,3%, 12,8%, 28,5% e 49,6%, utilizando concentrações de 1,25, 2,5, 5,0 e 10 µg/mL, respectivamente. Nath et al. (2016) testaram a atividade de 3,5-dihydroxy-4-ethyl-trans- stilbene (DETS), uma substância isolada do *Bacillus cereus*, e demonstraram sua atividade citotóxica em células de melanoma (IC50: 24,01 µM) e apoptose em células de melanoma, via mitocondrial, através da quebra da caspase 9. Esses autores verificaram que o DETS também ativou a caspase 8.

Há indicações que o estresse oxidativo é um importante fator na regulação da apoptose em células tumorais e ocorrência de apoptose pode ser induzida por agentes químicos através da perturbação do estado redox (DIXIT et al., 2009; DIXIT et al., 2014). A alteração promovida no tecido hepático e tumor, demonstrada nesse trabalho, indica que a alteração no estado redox pode ser um possível mecanismo de ação do composto DBPOH.

Avaliação bioquímica

Uma das preocupações de aplicação de novas drogas são os possíveis efeitos tóxicos causados por elas. Efeitos tóxicos locais dependem apenas de ocorrência de contato e tamanho da dose, já os sistêmicos dependem de absorção, distribuição, biotransformação e excreção do agente tóxico (MACHADO, 1998). Dentre os órgãos mais afetados, podem-se destacar os rins e fígado. A dosagem das transaminases ALT (Alanina Amino Transferase) e AST (Aspartato Amino Transferase) são dois indicadores de lesão hepatocelular (WILLIAMS et al., 1988). Compostos inéditos devem garantir a segurança em seu uso e obedecer uma sequência de testes *in vitro* e *in vivo*, além de obedecer as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). O tratamento tópico pode evitar o

metabolismo de primeira passagem, onde as substâncias, após a absorção intestinal, alcançam a veia porta e chegam ao fígado. Neste órgão, muitas substâncias sofrem reações, sendo inativadas ou ativadas farmacologicamente, alterando suas solubilidades e facilitando suas excreções. Nesse estudo, não foram observadas alterações em parâmetros que avaliam danos hepático e renal (transaminases e creatinina, respectivamente). Com relação ao fígado, não foram observadas alterações significativas nas transaminases ALT e AST. Yoon e colaboradores (2016) demonstraram que o acetaminofen, um composto antipirético e analgésico de ampla utilização em todo o mundo, pode alterar essas enzimas hepáticas, caracterizando injúria tecidual. Dessa forma, o composto utilizado se mostrou inócuo quando avaliada função hepática pelos níveis das transaminases. Com relação ao sistema renal, não houve diferenças significativas nas dosagens de creatinina no soro dos animais. Considerando dois órgãos que estão intimamente sujeitos à toxicidade e excreção de xenobióticos, o composto DBPOH, nas doses utilizadas, parece não provocar alterações, o que foi confirmado com a histologia desses órgãos. França (2013), trabalhando com o composto DBMO₂ (oxidado em relação ao DBPOH), também verificou que seu composto não afetava a função hepática, nem a renal, baseando nos dados histológicos.

Níveis de Ácido Úrico Sérico (AUS) têm sido recentemente associados com o aumento do risco e mortalidade de pacientes com câncer (FINI et al., 2012; SHIN et al., 2012; TANRIVERDI et al., 2014). Nesse trabalho, o composto DBPOH reduziu os níveis de AUS em todos os tratamentos, com a variação de 48% (0,25 mg/g) até 76% (2,00 mg/g), indicando a redução do ambiente redox pode contribuir para o melhor prognóstico do câncer. O ácido úrico é considerado um agente antioxidante, capaz de eliminar as EROs, protegendo contra danos no DNA e regulando o microambiente celular. Dessa forma, esse dado corrobora com um ambiente de menor potencial oxidante, indicado pelos menores valores de malondialdeído e catalase, no fígado e menor atividade da GST nos tumores, nos tratamentos com o composto. Uma hipótese seria que o composto DBPOH pudesse deixar o ambiente celular do melanoma menos agressivo, deixando essas células menos propensas à metástase. Estudos têm demonstrado a relação de altos níveis de AUS: com o câncer (AMES et al., 1981); como fator preditivo independente na redução e tempo de vida em pacientes terminais com câncer (SHIN et al. 2006); que paciente pré-

tratamento, com níveis altos de AUS também tinham metástases e menor sobrevivência em câncer de pulmão (TANRIVERDI et al., 2014).

Estresse Oxidativo

Células epiteliais morrem quando se soltam da matriz extracelular, em cultura de células, como resultado da reduzida captação de glicose, depleção de adenosina trifosfato (ATP) e estresse oxidativo (DEBNATH et al., 2005; DEBNATH et al., 2002). A sinalização oncogênica pode promover sua sobrevivência pelo aumento da captação de glicose e fluxo através da via das pentoses fosfato, a qual gera NADPH e regenera a glutatona, o tampão contra o estresse oxidativo (SCHAFFER et al., 2009). A glutatona é necessária para iniciação de alguns cânceres e, antioxidantes podem promover a iniciação de progressão (DENICOLA et al., 2011; SAYIN et al., 2014; HARRIS et al., 2015). Em níveis baixos, espécies reativas de oxigênio (EROs) atuam como moléculas sinalizadoras para proliferação e via de sobrevivência (SENA et al., 2012). Em níveis moderados, EROs promove danos no DNA e promove mutagênese em células (WISEMAN et al., 1996). Níveis altos de EROs, exercem estresse oxidativo na célula e podem causar senescência e morte. Para controlar o estresse oxidativo, as células geram moléculas com ação antioxidantes, que convertem as EROs. Devido à grande geração de EROs como produtos do crescimento celular, as células cancerosas toleram níveis muito altos de EROs produzidos, comparados as células normais (TRACHOOTHAM et al., 2009). Além disso, para evitar os efeitos danosos do estresse oxidativo, acredita-se que as células cancerosas devem ativamente regular um sistema múltiplo de antioxidantes.

Nesse estudo, o composto DBPOH teve efeito nas concentrações de MDA no tecido hepático indicando menor produção do marcador de peroxidação lipídica. Ainda no tecido hepático, também houve efeito do DBPOH na atividade da catalase. Este dado pode levar à hipótese de que essa diminuição da formação do produto de peroxidação lipídica poderia indicar menor atividade metabólica. Esse fator poderia deixar o ambiente celular do tumor mais frágil e menos preparado para ambientes mais hostis, como a circulação sanguínea e outros tecidos, o que poderia diminuir as chances de metástases. Essa hipótese poderia ter mais subsídios com um modelo diferente de indução tumoral, via cauda dos

camundongos, onde as células são injetadas diretamente na circulação (QI et al., 2014; CHIEN et al., 2016).

O aumento dos níveis de EROs nas células tumorais podem influenciar vias de sinalização celular, alteração na expressão de fatores de transcrição desregulando enzimas antioxidantes, alterando a proliferação e aquisição de fenótipo metastático (GOVINDARAJAN et al., 2007; LIU et al., 2012). Meyskens et al., (2001) sugeriram que os níveis de EROs endógenos são maiores em células de melanoma, quando comparados aos melanócitos. Santos e colaboradores (2016), estudando pacientes com melanoma sem metástases e com metástase, verificaram que no primeiro grupo a atividade da catalase estava menor que no grupo sem o melanoma, indicando que esse estado de menor atividade enzimática poderia deixar as células de melanoma menos agressivas com relação ao seu potencial metastático. O estado redox com menor concentração do MDA, induzido pelo composto DBPOH, pode ser um indicativo de inibição de metástases, tornando assim possível seu uso concomitante em quimioterapias. Através do tamponamento das EROs, as células conseguem manter esses níveis dentro de uma faixa mais alta, capaz de beneficiar a progressão do tumor. Tem surgido a evidência indicando que antioxidantes contribuem para a tumorigênese, pela prevenção do acúmulo de EROs e subsequente estresse oxidativo nas células (DIEHN et al., 2009; SCHAFER et al., 2009; DENICOLA et al., 2011). A depleção do sistema glutathiona parece ter um marcante potencial pró-apoptótico. A inibição da atividade SOD também se mostrou uma atividade seletiva anti-melanoma, representando um possível alvo terapêutico (HUAN et al., 2000; VENE et al. 2011; MAYOLA et al., 2011;).

Tumores

Os volumes dos tumores desse trabalho não tiveram diferenças significativas como resultados entre os tratamentos. França (2013), trabalhando com um composto similar ao DBPOH e mesmo modelo experimental com células B16F10, verificou redução nos tumores nos grupos tratados com 1 e 3 mg/mL. Esses dados demonstram que mesmo dados *in vitro* indicando efeitos similares, como os de França (2013) e os desse estudo, são necessários mais dados para revelar os efeitos e seus respectivos mecanismos. No presente trabalho, a alteração de dados marcadores de estresse oxidativo revelou que o ambiente tumoral sofreu

modificação com os diferentes tratamentos. Uma consequência dessa alteração no ambiente celular de estresse oxidativo, seria a dificuldade de células conseguirem invadir outros tecidos, com as metástases.

Histologia

Zhang e colaboradores (2006), utilizando o modelo de implante com células B16F10, não identificaram metástases nos fígados, baços, pulmões, rins e cérebros, em 60 animais analisados. Esse mesmo grupo não identificou necrose, quando os tumores tinham menos de 1,0 cm, demonstrando que o tumor, nesse estágio, possuía um bom suprimento de sangue. Após o tumor alcançar 1,5 – 2,0 cm, a necrose apareceu, no 21º dia após a inoculação. Nossos dados corroboram com aqueles, pois não foram identificadas metástases nos fígados analisados em todos os grupos.

França (2013) observou alterações teciduais nos seus grupos controle (espaços sinusoides aumentados, e vacuolização citoplasmática nos hepatócitos) e o infiltrado inflamatório foram atenuados com o tratamento, principalmente, na concentração de 3 mg/mL de seu composto derivado DBM, caracterizando efeito hepatoprotetor do composto, corroborando com os trabalhos de Garcea et al. (2004) e Hoele et al. (2006), que indicaram o fígado como principal órgão responsável pelo metabolismo de β -dicetonas da família dos curcuminóides. Neste trabalho, o composto DBPOH não mostrou sinais de agressividade no fígado, como infiltrados inflamatórios, esteatose e degeneração hidrópica. A arquitetura do órgão também foi mantida. Uma observação interessante deriva dos tratamentos de 0,25 mg/g, 0,50 mg/g e 1,00 mg/g, onde foram frequentes a presença de mitoses sinalizando, provavelmente, regeneração hepática. O processo de regeneração hepática, depois de desencadeado, pode ser avaliado por vários métodos: peso do fígado, número de mitoses, componentes do ácido desoxirribonucléico, índice de síntese dos antígenos nucleares, usando-se imuno-histoquímica, expressão de genes, variações dos níveis de proteínas séricas, testes sorológicos, determinações enzimáticas de marcadores de proliferação e citometria de fluxo (ASSY et al., 1997). Dentre esses métodos, o peso do fígado e transaminases não tiveram diferenças significativas para justificar a presença das mitoses nos referidos grupos. Lembrando que no ambiente celular desses grupos, foram encontrados um perfil de

menor espécies causadores de estresse oxidativo, seria necessário uma investigação mais profunda, principalmente na grande alteração encontrada na dosagem do ácido úrico sérico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento e melhora do prognóstico do melanoma permanece ainda um desafio. O conhecimento de seu mecanismo de iniciação, bem como sua evolução é fundamental para o sucesso de seu tratamento.

Novas substâncias são necessárias para o tratamento desse câncer, uma vez que as substâncias hoje existentes não promovem os resultados esperados para um tratamento satisfatório. A combinação de terapias pode ser a alternativa mais viável nesse caso.

Os derivados do dibenzoilmetano podem trazer novas esperanças para o tratamento do melanoma e o DBPOH pode ser um candidato nesse cenário. Tanto os resultados *in vitro*, como os resultados *in vivo*, demonstraram-se como candidatos muito promissores para a evolução do DBPOH para uma possível droga. Os valores de IC_{50} , IC_{90} e seus respectivos índices de seletividades são robustos e promissores. Além da ausência de efeitos tóxicos nos testes avaliados. Para isso, são necessários mais testes, tanto na parte de toxicologia, para garantir que ele não provoque danos ao organismo, como aqueles que possam identificar seu mecanismo de ação. Uma nova abordagem a ser inserida será a avaliação da capacidade de migração celular, *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes Dev.**, 17: 2481 - 95, 2003.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, 105: 121 - 126, 1984.

AMES, B.N., CATHCART, R., SCHWIERS, E., HOCHSTEIN, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 78: 6858 - 6862, 1981.

Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. **J. Hepatol.**, 26: 945-52, 1997

BADISA, R. B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugson human breast carcinoma MCF-7 cells. **Antic. Res.**, 29: 2993 - 2996, 2009.

BALCH, C. M., GERSHENWALD, J. E., SOONG, S. J., THOMPSON, J. F., ATKINS, M. B. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol.**, 27: 6199 - 6206, 2009

BENNETT, D. C., COOPER, P. J.; HART, I. R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. **Int. J. Cancer**, 39: 414 - 418, 1987.

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomed.**, 10: 499 - 503, 2003.

BOGO, D. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de compostos de liquens. 110 p. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2012.

BUEGE, J. A. & AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Enzymology**, 52: 302 - 310, 1978.

CARMELIET, P. JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, 473: 298 - 307, 2011.

CHAPMAN, P. B., HAUSCHILD, A., ROBERT, C., et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **N. Engl. J. Med.**, 364: 2507 - 16, 2011.

CHEN, X. et al. Histopathology of normal skin and melanomas after nanosecond pulsed electric field treatment. **Melan. Res.**, 19: 361 - 71, 2009.

CHIEN, C-H, LEE, M-J, LIOU, H-C, LIOU, H-H, FU, W-M. Growth hormone is increased in the lungs and enhances experimental lung metastasis of melanoma in DJ-1 KO mice. **BMC Cancer**, 16: 871, 2016. doi:10.1186/s12885-016-2898-5.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Neoplasia. In: **Robbins - Pathologic Basis of Disease** Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2004.

DAVIES et al., H. DAVIES, G. R., BIGNELL, C. COX, P. STEPHENS, S. EDKINS, S. CLEGG, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer **Nature**, 417: 949 - 954, 2002.

DEBNATH, J. & BRUGGE, J. S. Modelling glandular epithelial cancers in threedimensional cultures. **Nature Rev. Cancer**, 5: 675 - 688, 2005.

DEBNATH, J. et al. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressingmammary acini. **Cell**, 111: 29 - 40, 2002.

DENICOLA, G. M. et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. **Nature**, 475: 106 - 109, 2011.

DIEHN, M., et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. **Nature**, 458, 780 - 783, 2009.

DIETERICH, S., BIELIGK, U., BEULICH, K., HASENFUSS, G. & PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, 101: 33 - 9, 2000.

DIXIT, D., SHARMA, V., GHOSH, S., KOUL, N., MISHRA, P.K., SEN, E. Manumycin in inhibits STAT3, telomerase activity, and growth of glioma cells by elevating intracellular reactive oxygen species generation. **Free Radic. Biol. Med.**, 364 - 374, 2009.

DIXIT, D., GHILDIYAL, R., ANTO, N. P., SEN, E. Chaetocin-induced ROS-mediated apoptosis involves ATM-YAP1 axis and JNK-dependent inhibition of glucose metabolism. **Cell Death Dis.**, 5: e1212, 2014.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature**, 242: 148 - 149, 1973.

FINI, M. A., ELIAS, A., JOHNSON, R. J., WRIGHT, R. M. Contribution of uric acid to cancer risk, recurrence, and mortality. **Clin Transl Med.**,1: 16, 2012.

FLAHERTY, K. T. et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. **N. Engl. J. Med.**, 363: 809 - 19, 2010.

FLORES, F. F. Avaliação da atividade antitumoral do composto DM-1 e da terapia de captura de nêutrons por boro em associação ao quimioterápico Dacarbazina no tratamento do melanoma. Tese Doutorado Ciências. Universidade de São Paulo. São Paulo SP. 2012.

FRANÇA, A. A. P. D. Avaliação da atividade antimelanoma *in vitro* e *in vivo* de um derivado de dibenzoilmetano, Tese Doutorado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG. 2013.

GARCEA, G. et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. **Br. J. Cancer**, 90: 1011 - 15, 2004.

GOVINDARAJAN, B. et al. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **J. Clin. Invest.**, 117: 719 - , 2007.

GRAY-SCHOPFER, V., WELLBROCK, C., MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, 445, 851 e 857, 2007.

GRUNDY, J. S., ELIOT, L. A., FOSTER, R. T. Extrahepatic first-pass metabolism of nifedipine in the rat. **Biopharm. Drug Dispos.**, 18: 509 - 522. 1997.

GUOXIANG SHEN, et al. Newmark and Ah-Ng Tony Kong Chemoprevention of Familial Adenomatous Polyposis by Natural Dietary Compounds Sulforaphane and Dibenzoylmethane Alone and in Combination in *Apc*^{Min/+} Mouse. **Cancer res.**, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1112 Published 15 October 2007.

HENDRIX, M. J. C. et al. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. **Nat. Rev. Cancer**, 3: 411 - 21, 2003.

HABIG, W. H., PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. Glutathione-S-Transferases: The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation. **J. Biol. Chem.**, 249: 7130 - 39, 1974.

HAMANO, Y. et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. **Cancer Cell**, 3: 589 - 601, 2003.

HANLON, N., OKPARA, A., COLDHAM, N., SAUER, M. J., IOANNIDES, C. Modulation of rat hepatic and pulmonary cytochromes P450 and phase II enzyme systems by erucin, an isothiocyanate structurally related to sulforaphane. **J. Agric. Food Chem.**, 56:7866 - 71, 2008.

HARRIS, I. S. et al. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. **Cancer Cell**, 27: 211 - 222, 2015.

HEGEDÜS, C. et al. Cytoprotective dibenzoylmethane derivatives protect cells from oxidative stress-induced necrotic cell death. **Pharmacological Research**, 72: 25 - 34, 2013.

HENDRIX, M. J. C. et al. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. **Nat. Rev. Cancer**, 3: 411 - 21, 2003.

HOEHLE, S. I., PFEIFFER, E., SOLYOM, A. M., METZLER, M. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. **J. Agric. Food Chem.**, 54: 756 - 64, 2006.

HUANG, M. T. et al. Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors and lymphomas/leukemias in Sencar mice. **Carcinog.**, 19: 1697 - 700, 1998.

HUBAUD, J., BOMBARDA, I., DECOME, L., WALLET, J., GAYDOU, E. Synthesis and spectroscopic examination of various substituted 1, 3-dibenzoylmethane, active agents for UVA/UVB photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biol.**, 92: 103 - 109, 2008.

HUANG, P. et al, Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells, **Nature**, 407, 6802: 390 - 395, 2000.

ISHIDA, J., OHTSU, H., TACHIBANA, Y., NAKANISHI, Y., BASTOW, K. F., NAGAI, M., WANG, H., ITOKAWA, H., LEE, K. Antitumor agents. Part 214: Synthesis and evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents. **Bioorg. Med. Chem.**, 10: 3481 - 3487, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2016: **Incidência do câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>. Acesso em: 16 abril, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer**: Tratamento do câncer. Disponível: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>. Acesso em: 16 abril, 2017.

JACKSON, K. M. et al. Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, 178: 161 - 165, 2002.

LUNG K.A et. al. Differential *in vivo* mechanism of chemoprevention of tumor formation in zoxy methane/dextran sodium sulfate mice by PEITC and DBM. **Carcinog.**, 31: 880 - 885, 2009

KAKUMANU, S. et al. A nanoemulsion formulation of dacarbazine reduces tumor size in a xenograft mouse epidermoid carcinoma model compared to dacarbazine suspension. **Nanomed.**, 7: 277 - 83, 2011.

KAUFMAN, H. L. *et al.* The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma **Nature Rev. Clin. Oncol.**, 10: 588 - 598 2013.

KRYSKO, D. V. et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, 44: 205 - 21, 2008.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275, 1951.

LIN, C. et al. Inhibition by dietary dibenzoylmethane of mammary gland proliferation , formation of DMBA ± DNA adducts in mammary glands , and mammary tumorigenesis in Sencar mice. **Cancer Let.**, 168: 125 - 32, 2001.

LIN, W., HONG, J. L., SHEN, G., WU, R. T., WANG, Y. W., HUANG, M. T., Newmark, H. L., Huang, Q. R., Khor, T. O., Heimbach, T., & Kong, A. N. Pharmacokinetics of dietary cancer chemopreventive compound dibenzoylmethane in rats and the impact of nanoemulsion and genetic knockout of Nrf2 on its disposition. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, 32: 65 - 75, 2011.

LIU, G. S., PESHAVARIYA, H., HIGUCHI, M., BREWER, A. C., CHANG, C. W., CHAN, E. C. & DUSTING, G. J. Microphthalmia-associated transcription factor

modulates expression. of NADPH oxidase type 4: a negative regulator of melanogenesis. **Free Radic Biol Med.**, 52: 1835 - 43, 2012.

LUI P, CASHIN R, MACHADO M et al. Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials. **Cancer Treat. Ver.**, 33: 665 - 8, 2007.

MACHADO, A. R. L. Intoxicações medicamentosas agudas. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica – Fundamentos da Terapêutica Racional**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koo - Gan., p.628 - 643, 1998.

MARNETT LJ, Chemistry and biology of DNA. damage by malondialdehyde. **IARC Sci. Publ.**, 150: 17 - 27, 1999.

MAGALHÃES, A. F. et al. Twenty-three Flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens* roots. **Phytochemistry**, 42: 1459 - 711996.

MANIOTIS, A. J., FOLBERG, R., HESS, A., et al. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. **Am. J. Pathol.**, 155: 739 - 52, 1999.

MATSUO, A. L., FIGUEIREDO, C. R., ARRUDA, D. C., PEREIRA, F. V., SCUTTI, J. A., MASSAOKA, M. H., TRAVASSOS, L. R., SARTORELLI, P., LAGO, J. H. Alpha-Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers anti- metastatic protection in a melanoma model. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 411: 449 - 54, 2011.

MAYOLA, E. et al. Withaferin A induces apoptosis in human melanoma cells through generation of reactive oxygen species and downregulation of Bcl-2, in: **Apoptosis**, 16: 1014 - 272011.

MCGEE, J. O. D., ISAACSON, P. G., WRIGHT, N. A. Neoplasia. In: **Oxford Textbook of Pathology. Oxford.** Oxford University Press., 569 - 718, 1992.

MEYSKENS JR FL, MCNULTY SE, BUCKMEIER JA, TOHIDIAN NB, SPILLANE TJ, KAHLON RS, et al. Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. **Free Radic. Biol. Med.**, 31: 799 - 808, 2001.

NATH, L. R. et al. *In Vitro* Evaluation of the Antioxidant, 3,5-Dihydroxy-4-ethyl-trans-stilbene (DETS) Isolated from *Bacillus cereus* as a Potent Candidate against Malignant Melanoma. **Front. Microbiol.**, 7: 452, 2016.

NOGUEIRA, M. A. et al. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. *// Farmaco*, 58: 1163 - 1169, 2003.

OBA-SHINJO, S. M. et al. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia*, 8: 231 - 41, 2006.

PALUNCIC, J., KOVACEVIC, Z., JANSSON, P. J., KALINOWSKI, D., MERLOT, A.M., HUANG, M. L., LOK, H. C., SAHNI, S., LANE, D. J. R., RICHARDSON, D. R. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863: 770 - 84, 2016.

PAULIS, Y. W. J. et al. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Bioch.Bioph. Acta*, 1806: 18 - 28, 2010.

PICARDO, M., GRAMMATICO, P., ROCCELLA, F. et al. Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 107: 322 - 6, 1996.

QI C-L, WEI B, YE J, et al. P-Selectin-Mediated Platelet Adhesion Promotes the Metastasis of Murine Melanoma Cells. Slominski AT, ed. *PLoS ONE*, 9: e 91320, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0091320.

SANTOS BERNARDES, S., DE SOUZA-NETO, F.P., PASQUAL MELO, G. et al. Correlation of TGF- β 1 and oxidative stress in the blood of patients with melanoma: a clue to understanding melanoma progression? *Tumor Biol.*, 37: 10753, 2016. doi:10.1007/s13277-016-4967-4.

SANDER, C. S., HAMM, F., ELSNER, P., THIELE, J. J. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. Br. *J. Dermatol.*, 148: 913 - 22, 2003.

SAYIN, V. I. et al. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci. Transl. Med.*, 6: 221ra215, 2014.

SCHAFER, Z. T. et al. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*, 461: 109 - 13, 2009.

SCHMITZ, I., KIRCHHOFF, S., KRAMMER, P. H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 32: 1123 - 36, 2000.

SENA, L. A., & CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Mol. Cell**, 48: 158 - 67, 2012.

SHIN, H. S., LEE, H. R., LEE, D. G., SHIM, J. Y., CHO, K. H., SUH, S.Y. Uric acid as a prognostic factor for survival time: a prospective cohort study of terminally ill cancer patients. **J. Pain Symptom Manage**, 31: 493 - 501, 2006.

SIDDARAJU, N. Clinical cytology in the diagnosis and management of melanoma. In: CAO, M. Y. (Ed.). **Current management of malignant melanoma**. Rijeka: InTech, 2011. p. 1 - 28.

SHIN, H. S., LEE, H.R., LEE, D.G., SHIM, J.Y., CHO, K. H., SUH. S. Y. Uric acid as a prognostic factor for survival time: a prospective cohort study of terminally ill cancer patients. **J. Pain Symptom Manage**, 31: 493 - 501, 2006.

SINGLETERY, K., MACDONALD, C., IOVINELLI, M., FISHER, C., WALLIG, M. Effect of the h-diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **Carcinog.**, 19: 1039 - 43, 1998

SOENGAS, M. S., LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, 22: 3138 - 3151, 2003.

SUFFNESS, M., PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Meth. Plant Biochem.**, Academic Press: 1991, p. 71 - 134.

SUN, K. W., MA, Y. Y., GUAN, T. P., XIA, Y. J., SHAO, C. M., CHEN, L. G., REN, Y. J., YAO, H. B., YANG, Q., HE, X. J.: Oridonin induces apoptosis in gastric cancer through Apaf-1, cytochrome c and caspase-3 signaling pathway. **World J. Gastroenterol.**, 18: 7166 - 7174, 2012.

TAGNE, J., KAKUMANU, S., NICOLOSI, R. J. Nanoemulsion Preparations of the Anticancer Drug Dacarbazine Significantly Increase Its Efficacy in a Xenograft Mouse Melanoma Model. **Mol. Pharmac.**, 5: 1055 - 1063, 2008.

TANRIVERDI, O., COKMERT, S., OKTAY, E. et al. Prognostic significance of the baseline serum uric acid level in non-small cell lung cancer patients treated with first-line chemotherapy: a study of the Turkish Descriptive Oncological Researches Group. **Med. Oncol.**, 31: 217, 2014.

TRACHOOTHAM, D., ALEXANDRE, J., AND HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat. Rev. Drug Discov.**, 8: 579 - 91, 2009.

TRUNZER, K. *et al.* Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. **J. Clin. Oncol.**, 31: 1767 - 74, 2013.

VERNE, R. *et al.* The cystine/cysteine cycle and GSH are independent and crucial antioxidant systems in malignant melanoma cells and represent druggable targets. **Antioxid. Redox Signal**, 15: 2439 - 2453, 2011.

WANG, M., LIAO, Y. Hydroxydibenzoylmethane induces apoptosis through repressing ornithine decarboxylase in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Exp. Mol. Med.**, 43: 189 - 96, 2011.

WILLIS, R. A. **The spread of tumors in the human body.** Butterworth e Co. Londres, 1952.

WILLIAMS, A. L. B., HOOFNAGLE, J. H. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis: relationship to cirrhosis. **Gastroenterology**, 95: 734 - 9, 1988.

WISEMAN, H., & HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem. J.**, 313: 17 - 29, 1996.

YOON, E., BABAR, A., CHOUDHARY, M., KUTNER, M., PYRSOPOULOS, N. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: a comprehensive update. **J. Clin. Transl. Hepatol.**, 4:131 - 42. 2016.

ZAWADIAK, J., MRZYCZEK, M. Influence of substituent on UV absorption and keto–enol tautomerism equilibrium of dibenzoylmethane derivatives. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 96: 815 - 819, 2012.

ZEISBERG, E. M. *et al.* Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. **Cancer Res.**, 67: 10123 - 10128, 2007.

ZHANG, S., GUO, H., ZHANG, D., ZHANG, W., ZHAO, X., REN, Z., SUN, B. Microcirculation patterns in different stages of melanoma growth. **Oncol. Rep.**, 15: 15 - 20, 2006.